



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ÉDER DA SILVA ROCHA SANTOS

**Avaliação da atividade leishmanicida de extratos de microrganismos
isolados do bioma Caatinga**

Maceió
2023

ÉDER DA SILVA ROCHA SANTOS

**Avaliação da atividade leishmanicida de extratos de microrganismos isolados do bioma
Caatinga**

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

Maceió
2023

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Éder da Silva Rocha
Avaliação da atividade leishmanicida de extratos de microrganismos isolados do bioma Caatinga / Éder da Silva Rocha Santos. – 2023.
88 f. : il.

Orientadora: Aline Cavalcanti de Queiroz.

Co-orientador: Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Co-orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2023.

Inclui produto educacional.

Bibliografia: f. 74-88.

1. Caatinga. 2. Extratos microbianos. 3. Atividade leishmanicida. I. Título.

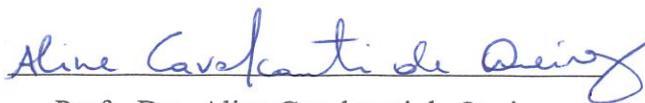
CDU: 616.993.161

Folha de Aprovação

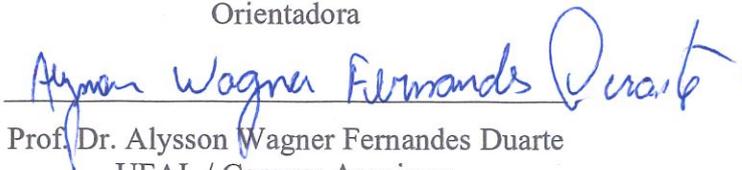
Éder da Silva Rocha Santos

Avaliação da atividade leishmanicida de extratos de microrganismos isolados do bioma Caatinga.

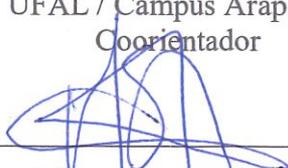
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas.



Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
UFAL / Campus Arapiraca
Orientadora



Prof. Dr. Alysso Wagner Fernandes Duarte
UFAL / Campus Arapiraca
Coorientador

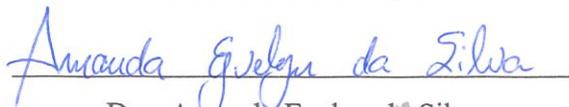


Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
UFAL / Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS
Coorientadora

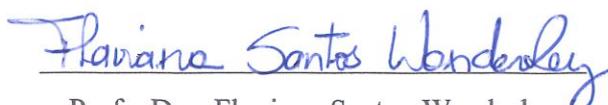
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante de Oliveira
UFAL / Faculdade de Medicina - FAMED
Examinadora interna



Dra. Amanda Evelyn da Silva
UFAL / Laboratório de Farmacologia e Imunidade - LAFI
Examinadora interna



Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley
UNCISAL/ Centro de Ciências Integradoras – CCI
Examinadora externa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço a minha família, meu pai, irmãos, cunhada, sobrinho e especialmente minha mãe, a quem eu dedico esse trabalho e porque ela é meu maior exemplo, sobretudo de perseverança.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz, pelo acolhimento, pela paciência e por todos os ensinamentos passados, serei eternamente grato!

Agradeço aos meus coorientadores, Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte e Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, sem suas contribuições não teria condições de finalizar este trabalho.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFAL, por todos os ensinamentos, em especial agradeço a Profa. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante de Oliveira, que foi a primeira a me acolher e indicar a minha orientadora.

Agradeço aos componentes das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. Michelle Jacintha Cavalcante de Oliveira, Dra. Amanda Evelyn da Silva e Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley, por terem aceitado o convite e pelas contribuições para o melhoramento desta dissertação.

Agradeço aos meus companheiros amigos do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (ICBS – UFAL), Anderson, Flávio, Suellen, Letícia, Joyce, Hilda, Shakira, Karoline, Thiago, Diogo, Ana Rachel, Cibelle, e especialmente, Amanda, Márcio, Lilyana, Fábio e Kaycke. E aos IC's: Mayná, Hamilka, Vinícius e Kamile. Vocês foram essenciais durante essa etapa da minha vida.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Campus Arapiraca): Kely, Nicolle, Emanuely e Kaline, pelo acolhimento e auxílio.

Agradeço aos meus companheiros amigos da UNCISAL, por todo o apoio e compreensão, Karina, Raphael, Alessandro, Denise, Paulo Henrique, Ewerton, Pedro e Wendell.

A todos, meu eterno agradecimento.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”.

Marie Curie

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias, negligenciadas, endêmicas em diversos países e possuem um amplo espectro clínico. Afetam principalmente populações menos favorecidas, causando graves problemas de saúde pública. O arsenal terapêutico é limitado e apresenta uma série de fatores adversos, como elevada toxicidade, eficácia variável e longos regimes de tratamento, o que torna imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas. Para tanto, a bioprospecção de microrganismos de ambientes extremos pode se configurar como uma excelente estratégia no desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de extratos microbianos de isolados do bioma Caatinga. Inicialmente, os extratos de microrganismos da Caatinga foram produzidos a partir da extração de metabólitos microbianos. Assim, foram preparados extratos das bactérias codificadas como 12UVLBC8, 2UVLLC4 (MetOH), 2UVLLC4 (ActOEt), 13UVLBC8, 2UVLBC5 e 13UVLBC3, e de fungos filamentosos com os códigos 2LCL1, 4LCEM2 e 4UVLFC2. Os extratos pigmentados bacterianos não apresentaram efeito citotóxico quando testados em macrófagos da linhagem J774.A1 no ensaio de MTT. Com relação aos extratos pigmentados fúngicos, os três apresentaram toxicidade, com CI_{50} abaixo de 50 $\mu\text{g/mL}$ e efeito citotóxico máximo superior a 70%. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism. Além disso, o extrato bacteriano 13UVLBC3 apresentou atividade leishmanicida *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, com efeito máximo de 100% e CI_{50} 8,80 $\mu\text{g/mL}$ e 81,46% e CI_{50} 12,07 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todos os extratos pigmentados fúngicos apresentaram atividade leishmanicida, contra as formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania* testadas, foi observada atividade contra *L. (L.) amazonensis* para 2LCL1 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 3,13 $\mu\text{g/mL}$), 4LCEM2 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 1,06 $\mu\text{g/mL}$) e 4UVLFC2 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 6,09 $\mu\text{g/mL}$) e atividade leishmanicida contra *L. (L.) chagasi* para 2LCL1 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 13,55 $\mu\text{g/mL}$), 4LCEM2 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 9,65 $\mu\text{g/mL}$) e 4UVLFC2 (efeito máximo de 100% e CI_{50} de 10,24 $\mu\text{g/mL}$). Também foram conduzidos testes de espectrofotometria de varredura nos extratos que apresentaram atividade leishmanicida, todos eles apresentaram picos de absorvâncias típicos de carotenoides. Os extratos pigmentados de microrganismo da Caatinga mostraram que podem possuir compostos bioativos promissores quanto a atividade leishmanicida, no entanto, outros testes como avaliar a atividade anti-amastigotas e a caracterização química precisam ser realizados.

Palavras-chave: Caatinga. Extratos microbianos. Atividade leishmanicida.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a complex of neglected parasitic diseases, endemic in several countries and have a wide clinical spectrum. The therapeutic arsenal is limited and presents a series of adverse factors, such as high toxicity, variable efficacy, and long treatment regimens, which makes the development of new leishmanicidal drugs essential. Therefore, the bioprospecting of microorganisms from extreme environments can be configured as an excellent strategy in the development of new antiparasitic drugs. Therefore, the objective of this work was to evaluate the leishmanicidal activity of microbial extracts of isolates from the Caatinga biome. Initially, extracts of microorganisms from the Caatinga were produced from the extraction of microbial metabolites. Thus, extracts of bacteria encoded as 12UVLLC8, 2UVLLC4 (MetOH), 2UVLLC4 (ActOEt), 13UVLBC8, 2UVLBC5 and 13UVLBC3, and filamentous fungi with codes 2LCL1, 4LCEM2 and 4UVLFC2 were prepared. The pigmented bacterial extracts did not show a cytotoxic effect when tested on macrophages of the J774.A1 lineage in the MTT assay. With regard to pigmented fungal extracts, all three showed toxicity, with an IC₅₀ below 50 µg/mL and a maximum cytotoxic effect greater than 70%. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism program. In addition, the bacterial extract 13UVLBC3 showed in vitro leishmanicidal activity against the promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi*, with a maximum effect of 100% and IC₅₀ 8.80 µg/mL and 81.46% and IC₅₀ 12.07 µg/ml, respectively. All pigmented fungal extracts showed leishmanicidal activity against the promastigotes of the two *Leishmania* species tested, activity was observed against *L. (L.) amazonensis* for 2LCL1 (maximum effect of 100% and IC₅₀ of 3.13 µg/mL), 4LCEM2 (maximal effect of 100% and IC₅₀ of 1.06 µg/mL) and 4UVLFC2 (maximal effect of 100% and IC₅₀ of 6.09 µg/mL) and leishmanicidal activity against *L. (L.) chagasi* for 2LCL1 (maximal effect of 100% and IC₅₀ of 13.55 µg/mL), 4LCEM2 (maximum effect of 100% and IC₅₀ of 9.65 µg/mL) and 4UVLFC2 (maximum effect of 100% and IC₅₀ of 10.24 µg/mL). Scanning spectrophotometry tests were also conducted on the extracts that showed leishmanicidal activity, all of which showed absorbance peaks typical of carotenoids. The pigmented extracts of microorganisms from the Caatinga showed that they may have promising bioactive compounds in terms of leishmanicidal activity, however, other tests such as evaluating the anti-amastigote activity and chemical characterization need to be performed.

Keywords: Caatinga. Microbial extracts. Leishmanicidal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Lutzomyia longipalpis</i>	17
Figura 2. Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 3. Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i>	19
Figura 4. Resposta imune contra leishmaniose	21
Figura 5. Evolução clínica da leishmaniose visceral	24
Figura 6. Classificação clínica da leishmaniose cutânea	25
Figura 7. Classificação clínica da leishmaniose mucosa	26
Figura 8. Casos de notificação de LTA nas Américas (2001 – 2020)	28
Figura 9. Casos de LTA por Unidade da Federação (UF) de infecção	28
Figura 10. Casos de notificação de LV nas Américas (2001 - 2020)	29
Figura 11. Casos de LV por UF de infecção no Brasil	30
Figura 12. Fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento das leishmanioses	33
Figura 13. Mapa correspondente ao bioma Caatinga	35
Figura 14. Rocha colonizada por líquens na Caatinga	37
Figura 15. Coleta de líquens no município de Santa do Ipanema/AL	40
Figura 16. Aspecto do cultivo bacteriano em caldo nutriente após incubação por 7 dias, a 25°C e 120 rpm	42
Figura 17. Pigmentos oriundos da biomassa bacteriana em soluções extrativas (A), após a secagem em dessecador de vidro (B) e solubilizado em DMSO (C).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Identificação de líquens de isolados bacterianos	41
Tabela 2 – Identificação de líquens de isolados fúngicos e identificação taxonômica	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CR	Receptor do Complemento
DCs	Células Dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
gp63	Glicoproteína 63
IFN- β	Interferon-Beta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indizível
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicanos
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PI3K/AKT	Via do fosfatidilinositol-3-quinase / Proteína Quinase B
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador-Beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Crescimento Tumoral-Alfa
MeOH	Metanol
ActOEt	Acetato de Etila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Características Gerais das Leishmanioses	17
3.1.1 Ciclo de Vida das Leishmanioses	17
3.1.2 Imunopatogenia das Leishmanioses	19
3.2 Formas Clínicas das Leishmanioses	23
3.2.1 Leishmaniose Visceral	23
3.2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	25
3.2.3 Epidemiologia das Leishmanioses	27
3.2.4 Tratamento das Leishmanioses	30
3.3 Biodiversidade e Bioprospecção de microrganismos isolados da Caatinga e seu Potencial Biotecnológico	33
3.4 Líquens como micro-habitat de microrganismos da Caatinga	35
3.5 Pigmentos extracelulares produzidos por microrganismos e suas aplicações na indústria farmacêutica	37
4 METODOLOGIA	39
4.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de microrganismos isolados da Caatinga ...	39
4.1.1 Microrganismos Isolados da Caatinga	39
4.1.2 Cultivo, reativação e produção da biomassa microbiana	41
4.1.3 Extração de pigmentos intracelulares bacterianos	42
4.1.4 Obtenção dos extratos de fungos filamentosos	44
4.2 Ensaio Farmacológicos	44
4.2.1 Manutenção da linhagem de macrófagos	44
4.2.2 Determinação da viabilidade celular	45
4.2.3 Ensaio da viabilidade em promastigotas	45
4.2.4 Espectrofotometria de varredura	46
4.2.5 Análise estatística	46
5 PRODUTOS	47

5.1 Artigo 1: Potencial leishmanicida de extratos pigmentados de microrganismos do bioma Caatinga	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são antropozoonoses provocadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, e afetam pessoas e animais domésticos e selvagens em todo o mundo. As principais formas da doença são: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LM) (AKHOUNDI et al., 2016; RIFFEL; DE OLIVEIRA VAZ, 2018; WHO, 2017).

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: a promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (NEVES, 2016; BRASIL, 2017).

A doença tem sido associada a regiões tropicais e subtropicais e é transmitida principalmente aos humanos pela picada de flebotomíneos fêmeas do Velho Mundo e por *Lutzomyia spp.* no Novo Mundo (WHO, 2016; MITRA, et al. 2017). Devido à associação das leishmanioses a condições de desnutrição, comprometimento imunológico, condições de moradia ruins, migração e aos países pobres e em desenvolvimento da África, da América Latina e da Ásia, são consideradas doenças negligenciadas (WHO, 2017). Está também associada às mudanças ambientais decorrentes do desmatamento, da construção de barragens, de esquemas de irrigação e da urbanização (WHO, 2017).

No Brasil, as leishmanioses possuem diversos agentes etiológicos, reservatórios e vetores, os quais, por sua vez, apresentam características particulares de transmissão, dificultando o controle da disseminação da doença no território brasileiro (BRASIL, 2017). Trata-se, portanto, de um grave problema de saúde pública, pois causa uma série de doenças, desde infecções auto curativas até doenças crônicas desfigurantes (SCOTT et al, 2016).

Esse grupo heterogêneo de doenças ocorre atualmente em mais de 100 países ao redor do mundo e aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção. Além disso, uma estimativa de 20.000 -- 50.000 mortes ocorrem anualmente, a OMS estima que ocorram de 700 mil a 1 milhão de novos casos por ano em todo o globo (WHO, 2017; OPAS, 2019).

Até este momento não há vacina para as leishmanioses; além disso, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento é limitado, devido a uma série de fatores, como, eficácia variável, resistência adquirida pelo parasito, toxicidade, longos cursos de tratamento e efeitos colaterais graves; sendo assim, torna-se condição imprescindível a pesquisa e desenvolvimento de novos

fármacos leishmanicidas eficazes (ARONSON et al., 2016; CHARLTON et al., 2018; DNDI, 2019).

Para a saúde pública, a importância de um medicamento novo está no valor terapêutico e no benefício que produz para o paciente e para a sociedade em termos de melhoria da qualidade e anos de vida salvos. O valor terapêutico deve ser analisado em dimensão ampla que ultrapassa a inovação química, fundamentado em uma visão ampliada de benefício clínico (WARD et. al., 2014).

Diante da busca por novas terapias leishmanicidas, o bioma Caatinga, que é o principal ecossistema da Região Nordeste e ocupa cerca de 10% do território nacional, apresenta características peculiares devido ao seu clima quente e seco, típico do semiárido, e possui uma riqueza biológica de valor inestimável. A Caatinga conta com um imenso potencial para a conservação de serviços ambientais, uso sustentável e bioprospecção que, se bem explorado, poderá ser decisivo para o desenvolvimento da região e do país (BRASIL, 2022).

A Caatinga é um bioma ainda pouco explorado, nesse sentido, uma estratégia para se buscar compostos ainda desconhecidos é isolar microrganismos a partir destes ambientes (MENDES, 2010). Assim, microrganismos isolados da Caatinga, possuem potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos leishmanicidas, gerando grandes benefícios para a sociedade e contribuindo com o desenvolvimento da inovação tecnológica (COSTA et al., 2014; AGEITEC, 2016).

Ante o exposto, o presente estudo visou investigar a atividade leishmanicida de extratos de microrganismos isolados da Caatinga fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (LABMIP) do Complexo de Enfermagem e Medicina da Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca, tendo em vista o potencial biotecnológico e farmacológico desses produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar a atividade de candidatos a fármacos leishmanicidas à base de extratos de microrganismos isolados do bioma Caatinga, que constituam opções terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento da leishmaniose.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar microrganismos isolados de líquens do bioma Caatinga;
- Produzir extratos pigmentados a partir da biomassa dos microrganismos cultivados;
- Determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos J774.A1);
- Verificar a ação dos extratos sobre formas promastigotas de *L. (L) amazonensis* e *L. (L) chagasi*;
- Determinar a seletividade entre a citotoxicidade do extrato para o macrófago e sua atividade leishmanicida;
- Investigar o perfil do espectro de infravermelho dos extratos mais ativos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais da *Leishmania*

3.1.1 Ciclo de Vida da *Leishmania*

As leishmanioses constituem importante problema de saúde pública, devido ao seu elevado número de casos registrados anualmente, ampla distribuição geográfica e a complexidade para o seu controle, que é inerente aos ciclos de transmissão que envolvem diversas espécies de vetores, agentes etiológicos e reservatórios (BRASIL, 2015). A doença tem caráter antroponótico, sendo causada por protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, e transmitidas por pequenos dípteros da subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, tatuquira, asa branca, caravela, entre outros (**Figura 1**) (GALVIS-OVALLOS, 2020).

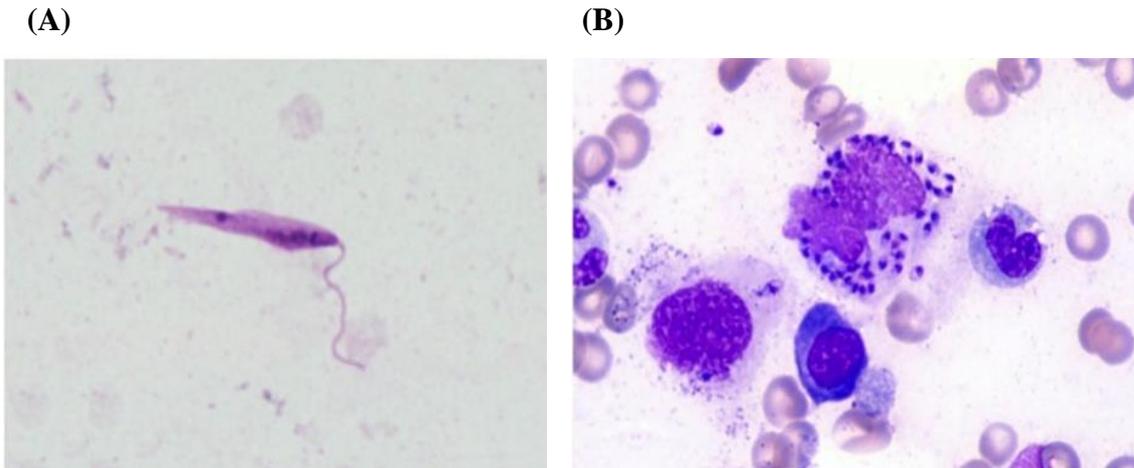
Figura 1. *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: Adaptado de VALENÇA, 2015.

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanosomatídeos, caracterizados por serem parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), com uma forma promastigota (**Figura 2-A**), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra amastigota (**Figura 2-B**) nos tecidos dos vertebrados (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011; SUNTER; GULL, 2017).

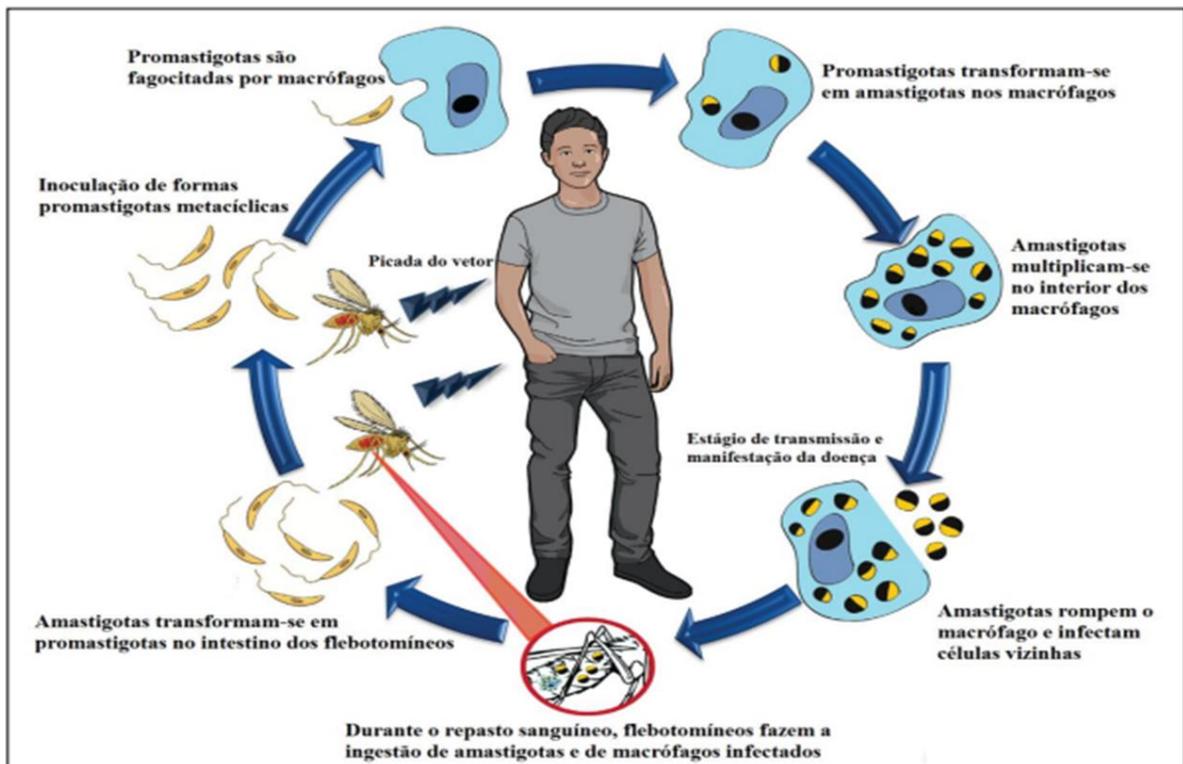
Figura 2. Formas evolutivas da *Leishmania*. (A) Promastigota; (B) Amastigota.



Fonte: Adaptado de ALEXANDRE, 2020; MALFITANO, 2021.

Os vetores responsáveis pela transmissão da leishmaniose em humanos são dípteros (insetos) nematóceros de diferentes espécies dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) que pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (SADLOVA et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016).

Durante o repasto sanguíneo, em reservatórios infectados, as fêmeas dos flebotomíneos adquirem as formas amastigotas do protozoário, que rapidamente se transformam em formas promastigotas no tubo digestivo dos vetores. Estas invadem as porções anteriores do estômago e do proventrículo do mosquito, dividem-se ativamente e se desenvolvem em formas promastigotas metacíclicas (formas finas e curtas medindo 6-10mm), que são as formas infectantes do parasito e que interagem com as células do SFM. As formas promastigotas que foram inoculadas através da picada, após um período de quatro a oito horas, são interiorizadas por células fagocíticas do hospedeiro, diferenciando-se novamente em formas amastigotas no fagolisossomo, se proliferam por divisão binária e passam a se multiplicar no interior das células, podendo invadir outros macrófagos bem como outras células fagocíticas (células dendríticas) ou não fagocíticas (fibroblastos). Após romperem os macrófagos, as amastigotas podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (**Figura 3**) (PIMENTA et al., 2018; CDC, 2020; BOCKSTAL, et al, 2020; VALERO e URIARTE, 2020).

Figura 3. Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.

Fonte: Adaptado de AVERY, 2017.

3.1.2 Imunopatogenia da leishmaniose

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro, o que determinará a expressão e a evolução clínica será o tipo e o grau de intensidade dessa resposta imunológica (SCOTT; NOVAIS, 2016). A presença das formas promastigotas desencadeia, no local da inoculação, uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células e fatores séricos –células natural killer (NK), polimorfonucleares (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e sistema complemento. Assim, a maioria de promastigotas inoculadas, que ainda estão no ambiente extracelular, são rapidamente destruídas; no entanto, o parasito inicia imediatamente sua batalha pela sobrevivência contra as defesas do hospedeiro por meio de sua interação com os componentes inatos do sistema imunológico (SCOTT; NOVAIS, 2016; TIBÚRCIO et al., 2019).

As células fagocíticas primárias no local da picada são os neutrófilos e os macrófagos. Os parasitos são captados pelos neutrófilos, que são, por sua vez, fagocitados pelos macrófagos

(REGLI et al., 2017). Os neutrófilos, que são as células leucocitárias mais abundantes no sangue, constituem a defesa celular inicial contra o parasito e modulam as respostas imunes subsequentes por meio de interações cruzadas com outras células através da secreção de moduladores imunes (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012; BARHOUMI et al., 2019).

Os neutrófilos são dotados de mecanismos poderosos para enfrentar micróbios invasivos, incluindo fagocitose e degranulação, liberando moléculas com propriedades antimicrobianas e ajudando no combate às infecções (KOLACZKOWSKA, 2013). Todavia, algumas espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos para resistir aos neutrófilos, como interferir no processo de fusão dos grânulos com o fagossomo contendo os parasitos, transformando os neutrófilos em hospedeiros temporários, favorecendo a progressão da infecção. No entanto, Guimarães-Costa et al (2009), demonstraram que a *Leishmania* induz a liberação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NET) por neutrófilos humanos e que o parasito é suscetível às histonas associadas a essas fibras.

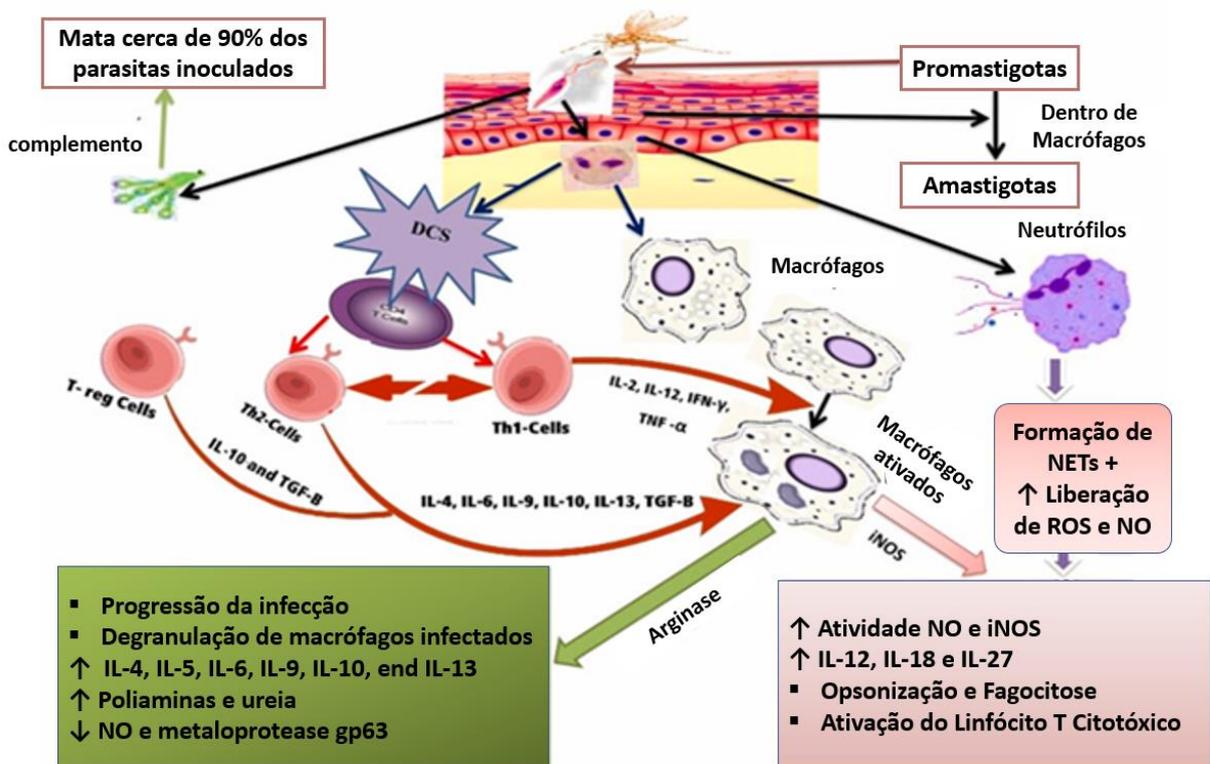
Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa desempenham papéis críticos na defesa contra a *Leishmania* (DOS-SANTOS, 2016). Mas, para sobreviver ao mecanismo de defesa ou imunidade inata, o parasito utiliza vias complexas, incluindo fagocitose por células inflamatórias e ativação do sistema complemento. Macrófagos e neutrófilos são considerados as células primárias que reagem à infecção por *Leishmania*, mas várias outras células imunes, como monócitos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK) e células T CD4+ e CD8+, além de moléculas efetoras, como citocinas como interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-12 e óxido nítrico (NO) produzidos pela NO sintase induzível (iNOS), também desempenham papéis distintos na resposta do hospedeiro (FALEIRO et al., 2014; ROMANO et al., 2017; BEHNEN, et al., 2014). A célula NK também é extremamente importante no controle da infecção, isso deve-se tanto à sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de interferon-gama (IFN- γ), o que determina um potencial para desenvolver resposta imune celular adequada, induzindo a resistência já na primeira semana de infecção (NOVAIS, 2016).

O sistema complemento auxilia no combate a infecções reconhecendo patógenos extracelulares. Essas proteínas se ativam durante cascatas de reações proteolíticas que levam à lise celular (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MURPHY, 2014; RICKLIN et al., 2010). Na infecção por *Leishmania*, a cascata do complemento é ativada diretamente após a penetração do promastigota na derme e reação com o soro, o que, por sua vez, leva à morte eficiente de mais de 90% dos parasitos inoculados (DOMINGUEZ et al., 2002; DOMINGUEZ et al., 2003; VON STEBUT, 2007; MAURER et al., 2009). Contudo, durante a infecção por *Leishmania*, o sistema complemento realiza a opsonização de parasitos por seus fragmentos (iC3b e C3b),

assim, uma vez que a *Leishmania* pode usar C3b depositado para facilitar a entrada do parasito em macrófagos e neutrófilos através do receptor do complemento (CR)2 (NYLEN; GAUTAM, 2010), o que contribui para progressão da infecção, pois a fagocitose do parasito através dos receptores CR1 e CR3, parecem ser ineficientes em desencadear a explosão oxidativa (ATAYDE et al., 2016; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012; LAUTHIER; KORENAGA, 2018).

A resposta imune à *Leishmania* depende principalmente de uma resposta imune do tipo Th1 que é caracterizada pela produção inicial de interleucina-12(IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), que são importantes para a determinação do desfecho clínico da doença. A IL-12 ativa as células Th1 secretoras de IFN- γ . Este efeito resulta na ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago, particularmente a geração de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) (WHO, 2020). Essas citocinas T helper-1 (Th1) são relatadas como neutralizadas por fatores imunossupressores, como IL-10 (SCOTT; NOVAIS, 2016; JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019). **Figura 4.**

Figura 4. Resposta imune contra as leishmanioses.



Fonte: Adaptado de ELMHALLAWY, 2021.

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania*. Nessas células os parasitos conseguem não somente sobreviver, mas também multiplicar-se. Assim, os macrófagos são essenciais para que a *Leishmania spp.* estabeleça uma infecção bem-sucedida (FALEIRO et al., 2014; ROMANO et al., 2017). Representam também as principais células efetoras que fagocitam o parasito e eliminam a infecção, se ativadas adequadamente. Seu efeito fagocitário geralmente é iniciado após sua ativação por DCs e a deposição de superfície do complemento (UENO et al., 2009). Vale ressaltar que existem dois fenótipos de macrófagos: M1 que é subtipo pró-inflamatório com propriedades microbidas e mediada pelos produtos das células Th1 e NK, e M2 que está associado à reparação tecidual e resolução da inflamação e é mediada por citocinas Th2. (ELMAHALLAWY et al., 2021).

A via clássica, que impulsiona a ativação de macrófagos M1, envolve principalmente IFN- γ , que estimula os macrófagos a produzirem espécies ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Um exemplo de formação de ROS é a reação catalisada pela enzima sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS) através da L-arginina, que resulta na geração de NO. Portanto, a iNOS desempenha um papel importante na morte do parasito (LIEW et al., 1990; ELMAHALLAWY et al., 2021). No entanto, o parasito desenvolve alguns mecanismos de proteção, como o fato do glicolípido lipofosfoglicanos (LPG) proteger a metaloprotease de *Leishmania* e a glicoproteína gp63 interferir nas vias de sinalização dos macrófagos superando o efeito microbicida do hospedeiro (OLIVIER et al., 2012; ROSSI; FASEL, 2018; ROSAZZA et al., 2020). Outras citocinas inflamatórias, como IL-1, fator de necrose tumoral (TNF), IFN- α e IFN- β também estão envolvidas na ativação de macrófagos M1 e na regulação positiva da expressão de iNOS, levando à produção de NO (BRONTE; ZANOVELLO, 2005).

Por outro lado, a ativação de macrófagos M2 que ocorre por citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-13 (GORDON, 2003), pode levar à biossíntese de poliamina induzida por IL-4, que favorece a sobrevivência do parasito em macrófagos via regulação positiva da arginase (KROPF et al., 2005; PESSENDA; SILVA, 2020). A arginase codificada pela *Leishmania* aumenta a progressão da doença aumentando as atividades de arginase da célula hospedeira, promovendo a proliferação do parasito dentro dos macrófagos infectados através da produção de poliaminas essenciais para o desenvolvimento do parasito. A infecção de macrófagos por *Leishmania* também aumenta a produção de citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF- β , que desativam as funções microbidas dos macrófagos (VON DER WEID et al., 1996; KANE, MOSSER, 2000; PESSENDA; SILVA, 2020). A IL-10 também inibe a explosão respiratória e a produção de citocinas inflamatórias, particularmente TNF- α , por macrófagos, portanto, a produção de IL-10 afeta negativamente a atividade parasiticida das células

infectadas. Em conjunto, essa evidência indica que os parasitos de *Leishmania* conduzem a via de ativação do macrófago M2 em uma determinada direção que favorece a sobrevivência e proliferação do parasito (GORDON, 2003; ELMAHALLAWY et al., 2021).

As células da resposta imune adaptativa, representadas por células B e células T, são muito importantes para determinar o curso da infecção por *Leishmania* e as manifestações clínicas da doença. As células Th1 são geralmente efetoras contra bactérias intracelulares e protozoários, e destroem parasitos intracelulares, como *Leishmania spp.*, pela ativação de macrófagos parasitados. As células Th1 desencadeadas então ativam macrófagos parasitados para matar amastigotas intracelulares. Em contraste, as células Th2 secretam citocinas não inflamatórias, como IL-4, que estão associadas à produção de anticorpos e cicatrização de feridas; portanto, essas células são consideradas os efetores da imunidade do hospedeiro contra parasitos extracelulares (NYLEN; GAUTAM, 2010; SHARMA; SINGH, 2009; LUCKHEERAM, 2012; ELMAHALLAWY et al., 2021).

3.2 Formas clínicas da leishmaniose

3.2.1 Leishmaniose Visceral

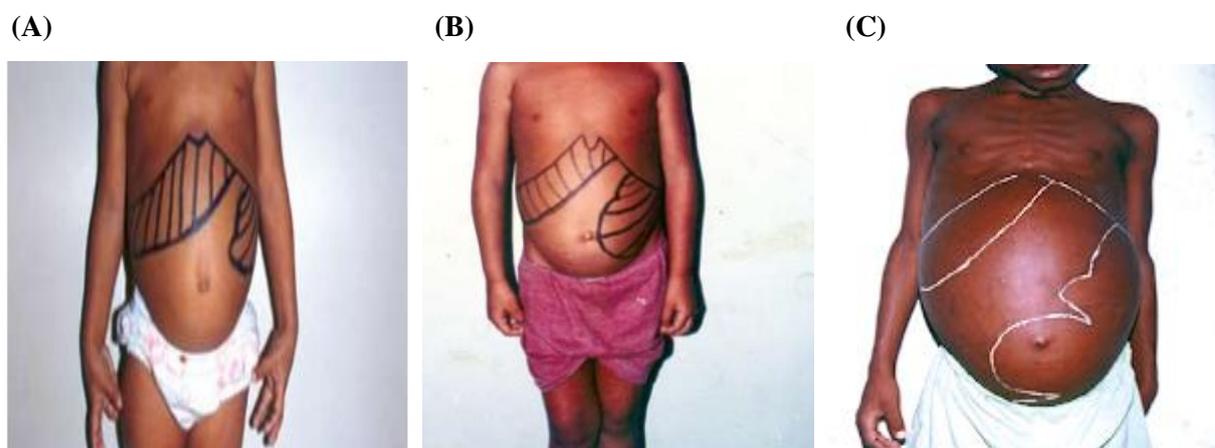
A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, com características clínicas que variam desde manifestações discretas (oligossintomáticas), moderadas ou de evolução grave, podendo levar o indivíduo à morte (BRASIL, 2014). Caracteriza-se por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada dos sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020).

No Brasil, a principal espécie causadora da doença é o protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Esta espécie, além da *Leishmania (L.) donovani*, possui um forte tropismo para a visceralização da infecção, levando ao comprometimento de diferentes órgãos, principalmente baço, fígado, medula óssea e linfonodos, onde se multiplicam em células do SFM, gerando o quadro da LV (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

Em relação ao diagnóstico clínico da LV, a hipótese diagnóstica deve ser presumida quando o paciente apresenta febre e esplenomegalia associada ou não à hepatomegalia. É importante salientar que a evolução clínica é dividida em períodos: período inicial, período de estado e período final (BRASIL, 2021).

O período inicial ou fase aguda da doença, caracteriza-se, na maioria dos casos, por febre com duração de até 4 semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (**Figura 5-A**). No período de estado, o paciente apresenta febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico arrastado geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral (**Figura 5-B**). Por fim, no período final, com o comprometimento do estado geral de forma progressiva, o paciente apresenta febre contínua, desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (**Figura 5-C**) (BRASIL, 2021).

Figura 5. Evolução clínica da leishmaniose visceral. (A) Período inicial; (B) Período de estado; (C) Período final.



Fonte: Adaptado de VASCONCELOS, 2018.

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia, além de vetores (*Lutzomyia longipalpis*), envolvem-se no ciclo de transmissão dessa doença, atribuindo-lhe a característica de uma antroponose (BRASIL, 2021).

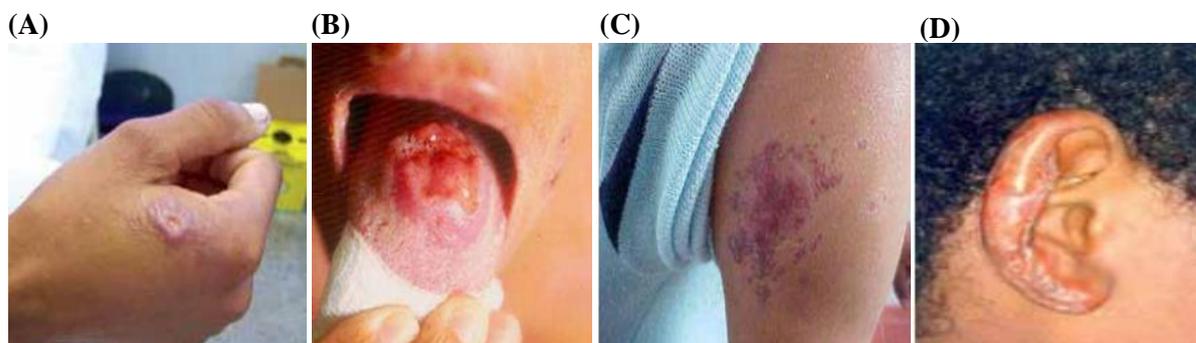
No estado de Alagoas, estudos recentes sobre a taxa de prevalência de LV entre os anos de 2010 e 2019 mostram que a maior parte dos casos foram encontrados na capital, no município de Maceió, no entanto, há relatos de casos em cidades de outras regiões do estado, como Santana do Ipanema, São José da Tapera, Maragogi, Traipu, Major Isidoro, entre outras (SOUZA BISPO, et al., 2022).

3.2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar, que engloba a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucocutânea (LM), é uma doença infecciosa, não contagiosa, de caráter zoonótico, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (FERREIRA et al., 2015). É considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas, manifestando diferentes formas clínicas (MONKI, 2019; SOUZA JÚNIOR et al., 2020), causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2017).

As lesões cutâneas causadas pela LC e LM possuem características distintas, de acordo com a sua apresentação clínica, podem ser classificadas como: a) Forma cutânea localizada (**Figura 6-A**), que representa o acometimento primário da pele, é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas, restritas ao local de infecção; b) Forma cutânea disseminada (**Figura 6-B**), caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco; c) Forma recidiva cútis (**Figura 6-C**), caracteriza-se por ativação da lesão nas bordas, após cicatrização da lesão, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial; d) Forma cutânea difusa (**Figura 6-D**), constitui-se como uma forma clínica rara e grave da *L. (L) amazonensis*, inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (BRASIL, 2017).

Figura 6. Classificação clínica da leishmaniose cutânea. (A) Forma Cutânea Localizada. (B) Forma cutânea disseminada. (C) Forma recidiva cútis. (D) Forma cutânea difusa.

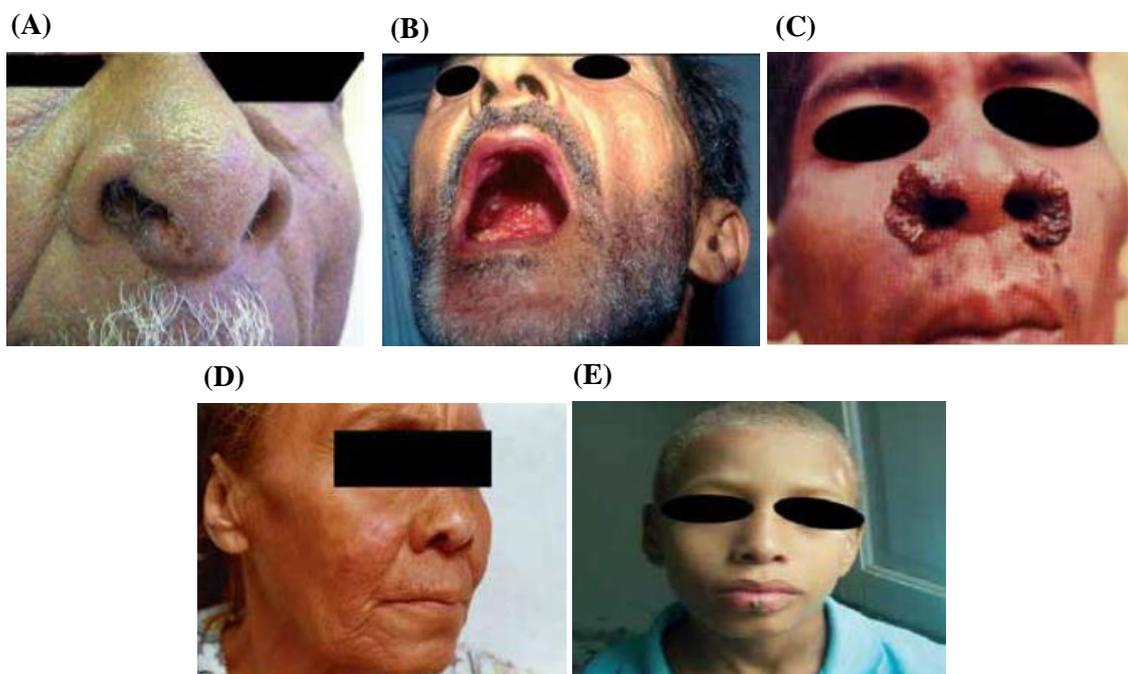


Fonte: Adaptado de VASCONCELOS, 2018.

A LM é uma lesão secundária à LC, e expressa-se por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Geralmente, casos de pacientes com LM são resultados da evolução crônica de LC curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (SOUZA JÚNIOR et al., 2020). É comum que pacientes com LM apresentem cicatriz indicativa de LC anterior, lesões cutâneas e mucocutânea concomitantemente ou, em casos ditos fugaz, não apresentam cicatriz sugestiva de LC (BRASIL, 2017).

De acordo com a apresentação clínica, a LM pode classificar-se como: a) Forma mucosa tardia (**Figura 7-A**), está associada às lesões cutâneas múltiplas ou de longa duração, às curas espontâneas ou aos tratamentos insuficientes da LC; b) Forma mucosa sem lesão cutânea prévia (**Figura 7-B**), associadas às infecções subclínicas ou lesões cutâneas pequenas, não ulceradas, de evolução rápida e que teriam passado despercebidas sem deixar cicatrizes perceptíveis; c) Forma mucosa concomitante (**Figura 7-C**), quando a lesão mucosa ocorre à distância, porém ao mesmo tempo em que a lesão cutânea ativa; d) Forma mucosa contígua (**Figura 7-D**), ocorre por propagação direta de lesão cutânea localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas; e) Forma mucosa primária (**Figura 7-E**), ocorre eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou submucosa de lábios e genitais (BRASIL, 2017).

Figura 7. Classificação clínica da leishmaniose mucosa. (A) Forma mucosa tardia. (B) Forma mucosa sem lesão cutânea prévia. (C) Forma mucosa concomitante. (D) Forma mucosa contígua. (E) Forma mucosa primária



Fonte: Adaptado de VASCONCELOS, 2018.

No Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania*, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V) braziliensis*, *L.(V) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) lindenberg* e *L. (V) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2021).

A LTA é considerada uma das principais endemias de saúde pública no país, exatamente pela ocorrência de formas clínicas graves e a dificuldade encontrada tanto para o diagnóstico, quanto para o tratamento da doença (SOUZA JÚNIOR et al., 2020). Em Alagoas, vários municípios em todas as regiões do estado apresentaram casos de LTA entre 2010 e 2019, sendo a capital Maceió a que apresentou a maior taxa de prevalência, seguido de municípios como União dos Palmares, Novo Lino e Colônia Leopoldina (SOUZA BISPO, et al., 2022).

3.2.3 Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil

As leishmanioses são doenças tropicais consideradas negligenciadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), acometem, principalmente, pessoas em situação

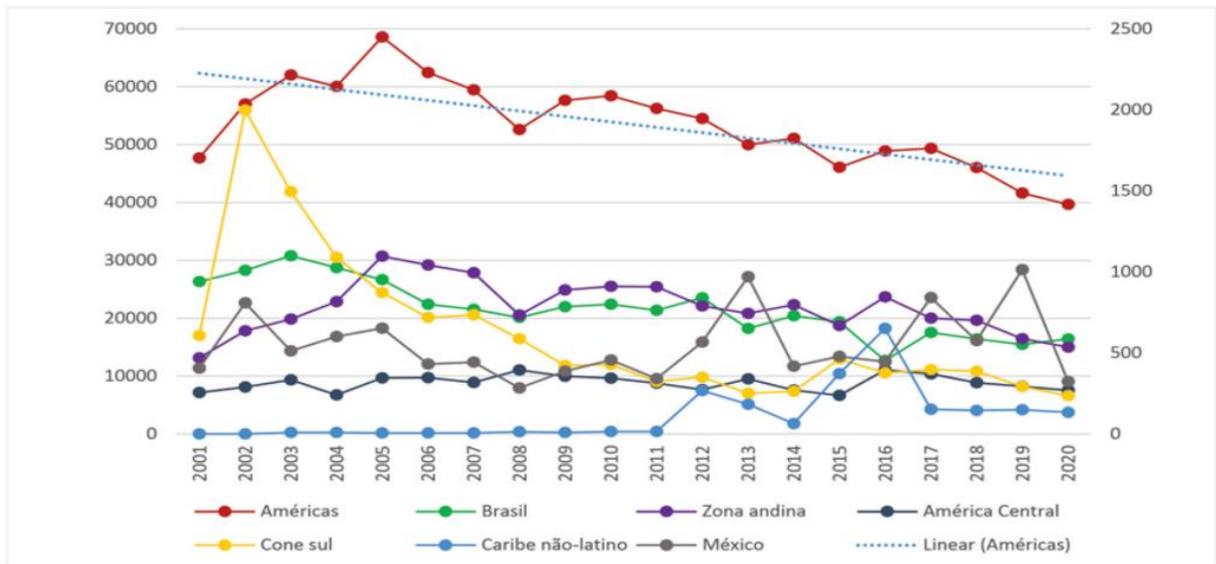
de vulnerabilidade social. No Brasil, elas são endêmicas e apresentam casos em todos os estados (OLIVEIRA, et al., 2021).

As leishmanioses apresentam circunstâncias determinantes na esfera ambiental, social e cultural, que contribuem com o avanço da doença. Entre esses determinantes, a condição socioeconômica, desnutrição, migração, condições ambientais e mudanças climáticas, têm sido considerados como os principais fatores de risco associados à ocorrência das leishmanioses (OMS, 2019).

No Brasil, a LV era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural, no entanto, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. Assim também a LTA tem aumentado as notificações devido aos mesmos fatores (BRASIL, 2021).

Em 2020, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), o Brasil foi o país onde houve o maior número de notificações de casos de LC e LM, totalizando 16.432 casos (**Figura 8**).

Figura 8. Casos de notificações de LTA nas Américas (2001 – 2020).

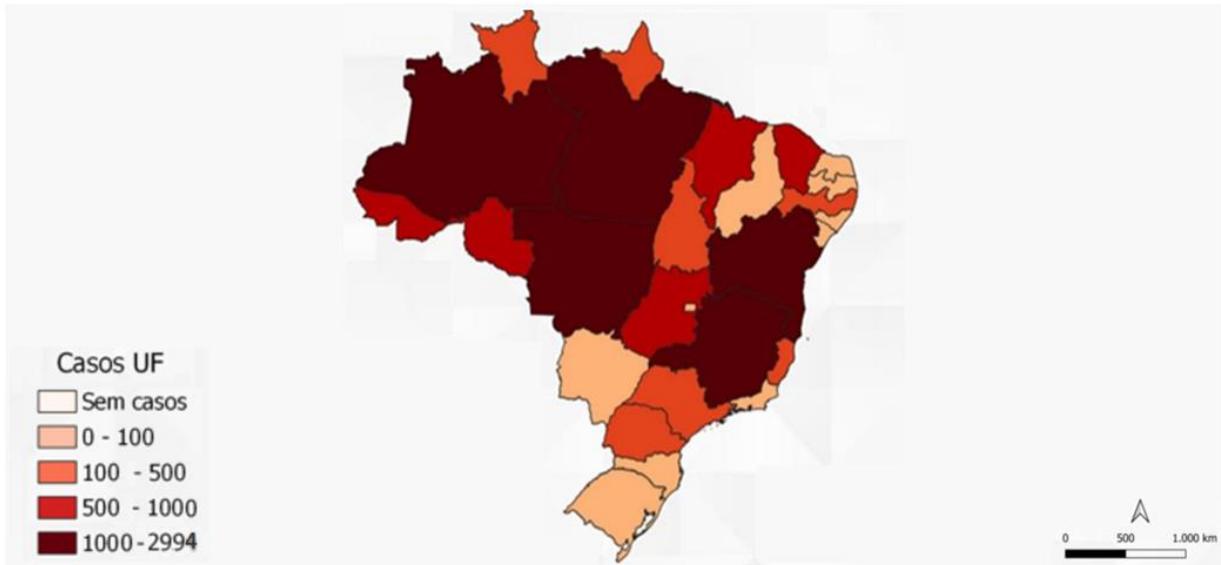


Fonte: OPAS, 2020.

De acordo com Galvis-Ovallos (2020), em relação aos fatores de riscos associados à ocorrência de casos de LTA, destacam-se a diversidade de agentes etiológicos, de vetores e de hospedeiros. As formas tegumentares podem ocorrer de acordo com aspectos bioecológicos diversos, desde florestas primárias, associadas a atividades extrativistas, bem como em

ambientes rurais, e ambientes urbanos, principalmente a proximidade de mata remanescente, o que favorece o desenvolvimento de vetores e hospedeiros (BRASIL, 2017). Na **figura 9**, observa-se a distribuição de casos de LTA no Brasil, por Unidade da Federação (UF).

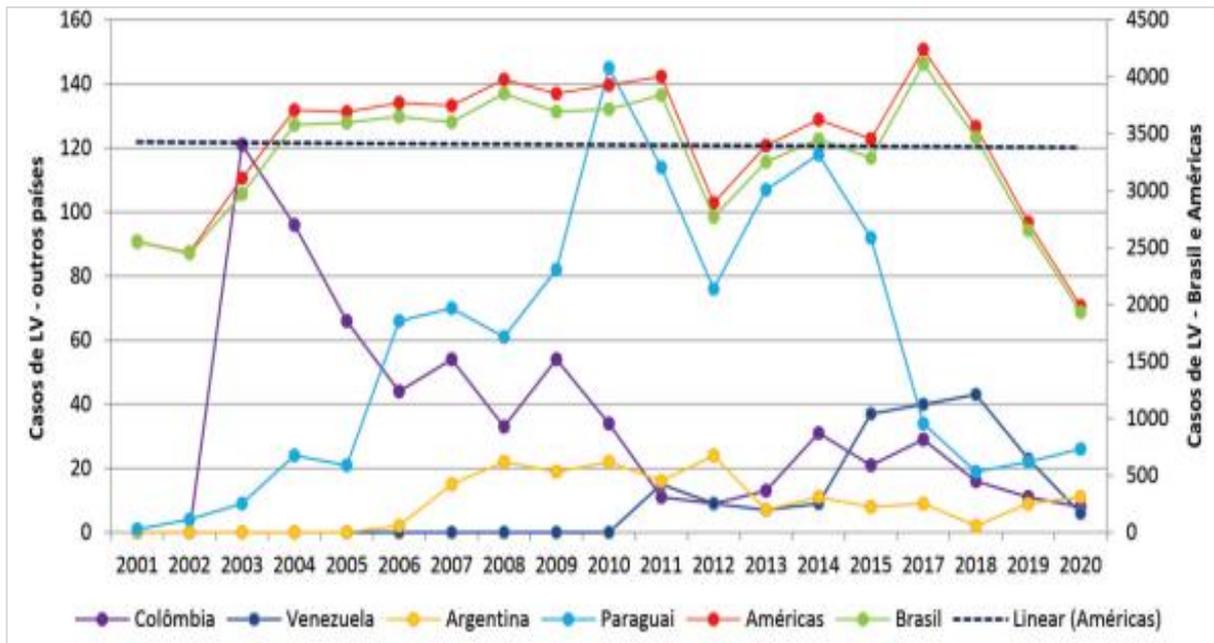
Figura 9. Casos de LTA por Unidade da Federação (UF) de infecção.



Fonte: SVS/MS, 2020.

A LV é endêmica em pelo menos 13 países das Américas, segundo os registros de notificações da OPAS (2020). Em 2020 foi registrado o menor número de casos de LV do período, devido à redução de 25% (670) de casos no Brasil. Não se sabe se essa redução se deve às consequências que a pandemia COVID-19 teve nas ações de vigilância e assistência, ou se é devido à tendência cíclica da doença, uma vez que para a LV observou-se um aumento no número de casos, conforme a **figura 10**.

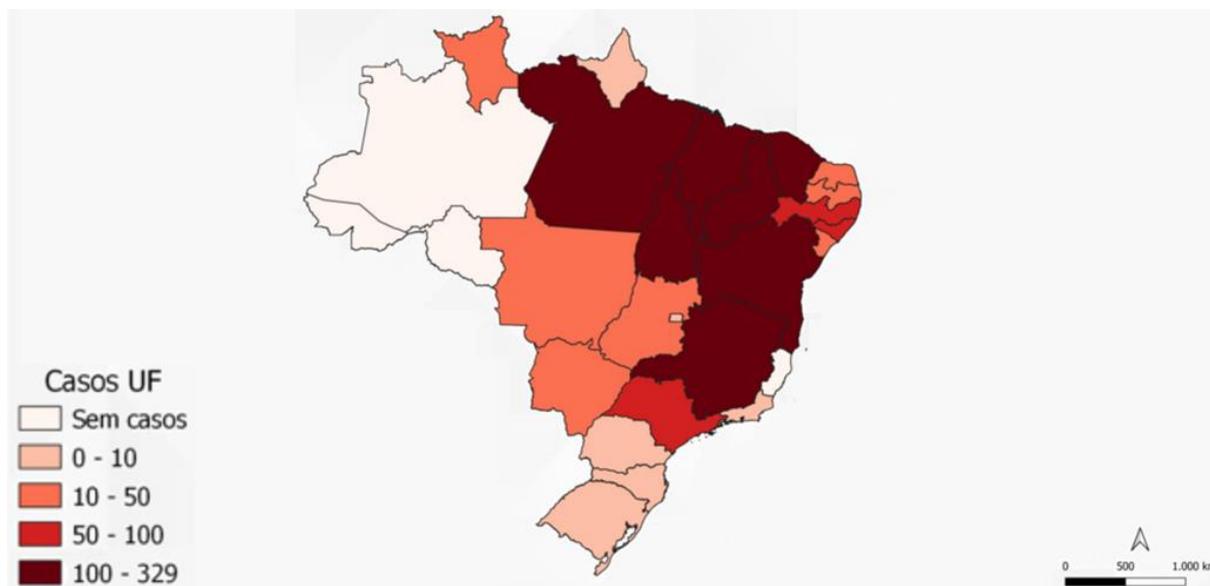
Figura 10. Casos de notificações de LV nas Américas (2001 – 2020).



Fonte: OPAS, 2020.

A incidência de LV, considerando a população das zonas de transmissão da Região, foi de três casos por 100.000 habitantes, o que mostra que, apesar da diminuição dos casos em número e distribuição geográfica, a incidência aumentou. De acordo com a OPAS (2020), o maior número e densidade de casos continuam sendo notificados pelos mesmos municípios no Brasil: Fortaleza (Estado do Ceará), São Luís (Maranhão), Belo Horizonte (Minas Gerais), Teresina (Piauí), Paraupébas (Pará), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Araguaína e Marabá (Tocantins). As maiores taxas de incidência também foram apresentadas no Brasil: Sapucaia (Pará), Mariópolis (São Paulo), Maetinga (Bahia), Uiramutã (Roraima), Darcinópolis e Lajeado (Tocantins) e Buritinópolis (Goiás). Na **figura 11**, observa-se uma ampla dispersão dos casos de LV e, em algumas áreas, uma intensa concentração.

Figura 11. Casos de LV por UF de infecção no Brasil, em 2020.



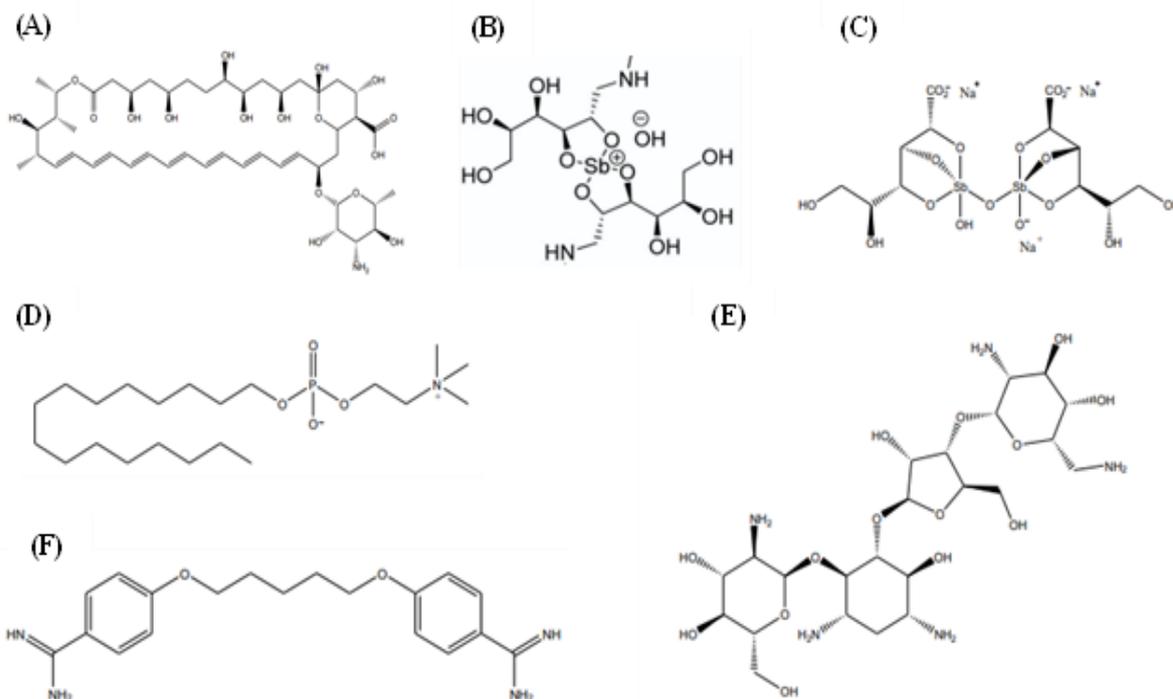
Fonte: SVS/MS, 2020.

3.2.4 Tratamento das leishmanioses

No Brasil, para todas as formas de leishmaniose, o tratamento de primeira linha são os antimoniais pentavalente Sb(V). Atualmente os antimoniais disponíveis são o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan); o primeiro é a única formulação de antimonial disponibilizada pelo Ministério da Saúde no Brasil em ampolas de 5 ml, contendo 405mg de Sb(V) (1mL = 81mg de Sb(V)), no entanto, não parece existir diferenças quanto a eficácia terapêutica destas formulações. Seu mecanismo de ação atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (BRASIL, 2019).

Outros fármacos são utilizados como sendo de segunda escolha para os tratamentos das leishmanioses: a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina, a paramomicina e a sitamaquina são alguns deles (**Figura 12**) (OLIVEIRA et al., 2011; WHO, 2015).

Figura 12. Fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento da leishmaniose. (A) Anfotericina B. (B) Antimoniato de meglumina. (C) Estibogluconato de sódio. (D) Miltefosina. (E) Paromomicina. (F) Pentamidina.



Fonte: Adaptado de YAMAMOTO, 2019; SILVA, 2016.

A anfotericina B é o fármaco de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimônio pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. É importante esclarecer que a medicação deve ser feita sob orientação e acompanhamento médico, com o paciente hospitalizado, em serviço de referência devido à sua toxicidade. A apresentação lipossomal da anfotericina B, com menos efeitos colaterais, está disponível para o tratamento de casos selecionados de LV grave (BRASIL, 2019; CDC, 2020; MOSIMANN et al., 2018; RODRIGO et al., 2018).

A anfotericina B tem alta correlação com o ergosterol presente na membrana dos fungos. Ao ligar-se ao ergosterol, o fármaco possibilita a formação de poros que alteram a permeabilidade da membrana por conduzir o escape descontrolado de íons, resultando na morte da célula fúngica. No entanto, a anfotericina B possui baixa afinidade pelo colesterol presente nas células de mamíferos, isso faz com que sua ação seja seletiva às células com ergosterol. Parasitos da *Leishmania* também apresentam ergosterol como principal esteroide de membrana, e por isso são sensíveis à anfotericina B. Desse modo, seu mecanismo de ação é semelhante nos parasitos (SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

A pentamidina é usada como medicamento alternativo nos casos que não respondem ou nos quais o paciente apresenta contraindicação aos antimoniais pentavalentes e à Anfotericina B convencional e lipossomal. No entanto, sua eficácia é bastante variável e pode causar efeitos colaterais graves (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; KATZUNG; TREVOR, 2017). A pentamidina pode entrar nos parasitos por meio de transportadores de alta afinidade dependentes de prótons, e ligar-se ao DNA mitocondrial, influenciando nos processos de replicação e transcrição (SOARES- BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Além disso, pode inibir transportadores de poliaminas, como LmPOT1, causando uma diminuição na captação de substratos importantes para rotas biossintéticas nos parasitos (DIAZ et al., 2014).

A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como agente antineoplásico para tratar o câncer de mama e outros tumores sólidos (BENNETT; DOLIN; BLASER, 2015; REIMÃO; PITA PEDRO; COELHO, 2020). No entanto, possui efeitos adversos como toxicidade gastrointestinal (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Acredita-se que esse fármaco apresenta mais de um sítio molecular de ação. De maneira geral, sua atividade antileishmania envolve: a perturbação do metabolismo lipídico (diminuição na fosfatidilcolina e aumento de fosfatidiletanolamina); morte celular semelhante a apoptose (inibição da via PI3K/AKT); disfunção mitocondrial (inibição do citocromo c oxidase); além de efeitos imunomoduladores (promove resposta Th1) (DORLO et al. 2012).

A paramomicina, também conhecida como aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo anteriormente usado para infecções intestinais e que mostrou atividade leishmanicida na década de 60 (MONZOTE, 2009). Age principalmente sobre o ribossomo citoplasmático da *Leishmania*, inibindo a síntese proteica e consequentemente causando efeitos deletérios no parasito (SHALEV-BENAMI et al., 2017). O fármaco deve ser administrado por via intramuscular. Alguns efeitos secundários foram relatados como cólicas abdominais e náuseas, além de reações adversas mais significativas como hepatotoxicidade, ototoxicidade reversível e mais raramente, nefrotoxicidade (SUNDAR, JHA e THAKUR, 2007; JAMESON, 2020).

A sitamaquina é um fármaco desenvolvido para tratamento oral da LV, porém, não é ativa por via tópica para o tratamento de LTA. Embora este fármaco tenha demonstrado uma taxa de cura de 50% na Índia, estudos posteriores revelaram efeitos secundários, como vômitos, dispepsia, cianose, síndrome nefrótica e glomerulonefrite. Em outro estudo, no Quênia, verificou-se eficácia idêntica, no entanto, os efeitos secundários observados foram dor abdominal, dor de cabeça e disfunção renal. Seu mecanismo de ação envolve a inibição do complexo II da cadeia respiratória (succinato-Q redutase), o qual desencadeia o estresse

oxidativo pela produção de ROS e aumento do Ca^{2+} intracelular, gerando uma morte semelhante a apoptose dos parasitos (CARVALHO et al., 2011; CHAKRAVARTY, 2015; JHA et al., 2017).

Além da toxicidade que possuem os medicamentos antileishmania, outros graves problemas que dificultam o tratamento da doença recaem no desenvolvimento de resistência pelo parasito, o que representa grande obstáculo para o sucesso da terapia (CONCEIÇÃO - SILVA, 2014). Portanto, torna-se urgentemente necessária a busca por compostos ativos, que possam dar origem a novos medicamentos que tenham alvos bioquímicos e rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência do parasito (SINGH et al., 2012).

3.3 Biodiversidade e bioprospecção de microrganismos isolados da Caatinga e seu Potencial Biotecnológico.

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro. Sua extensão compreende os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (**Figura 13**). Compreende uma área de 844.453 mil km^2 , que corresponde a cerca de 11% do território nacional. Representa uma das maiores florestas sazonais do mundo com seu clima semiárido e apresenta ecossistemas únicos para microrganismos adaptados às altas temperaturas, excesso de radiação UV, estresse hídrico e escassez de nutrientes (EMBRAPA, 2012; MELO et al., 2014; IBGE, 2019).

Figura 13. Mapa correspondente ao Bioma Caatinga.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2015.

O nome Caatinga significa “mata ou floresta branca” no tupi, nome dado pelos primeiros habitantes desta região, os indígenas. Na estação seca, a maior parte das plantas perdem as folhas, a paisagem se torna clara e os troncos esbranquiçados, por isso o seu nome, no entanto, durante o período chuvoso, a paisagem apresenta diferentes tonalidades de verde (EMBRAPA, 2012; IBAMA; 2012; IBGE, 2019; CONAFER, 2022).

Este bioma possui um patrimônio biológico imensurável, em nenhum outro lugar do mundo se encontra esta diversidade biológica, justamente por ser exclusivamente brasileira, o que faz com que esta região esteja entre um dos mais importantes cenários para a bioprospecção do planeta, tornando-se extremamente relevante a sua preservação (EMBRAPA, 2012; MOURA et al., 2021).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, a Caatinga abriga uma variedade de espécies pouco conhecidas, quase mil espécies de plantas ocupam o seu solo, todas elas formadas pelos 3 estratos vegetais: as espécies arbóreas, as arbustivas e as herbáceas, com destaque para as bromélias e os cactos que constituem as principais famílias de vegetais da região (BRASIL, 2018). Estas plantas possuem como característica a alta resistência aos períodos de seca, tal característica confere às plantas adaptações para sua sobrevivência em períodos de longa estiagem e temperaturas altas (KAVAMURA, 2012; LISBOA et al., 2020).

Estas adequações das plantas podem incluir controle estomático, diferenciação da cutícula, armazenamento de água e associação com microrganismos, aos quais também se encontram bem adaptados ao clima do semiárido (SIQUEIRA FILHO, 2012; CABRAL et al., 2013). Estudos indicam que, principalmente em relação aos seus potenciais compostos bioativos, diversas espécies vegetais vêm se mostrando como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente antimicrobianos e antiparasitários (FERNANDES e QUEIROZ, 2018). Isso acontece porque parte destes compostos bioativos são provenientes de metabólitos secundários dos vegetais, resultado da interação das plantas com o seu ambiente, incluindo microrganismos (NETO e LOPES, 2007; ROCHA et al., 2019).

A Caatinga possui também uma grande diversidade de microrganismos, sobretudo de solo, que é um ambiente complexo, caracterizado por processos químicos, físicos e biológicos, influenciado por fatores ambientais. Este ecossistema oferece grande suporte para a manutenção da microfauna, tendo a diversidade microbiológica como sua principal característica (MICHEREFF et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2017; GARDA et al., 2018).

A rizosfera, que é uma região de solo bastante influenciada pelas raízes de solo, é uma região de abundante diversidade microbiana, como essa superfície é enriquecida por substâncias provenientes do metabolismo das plantas, possui máxima atividade de bactérias, fungos,

actinobactérias, que vivem um processo de constante simbiose com as plantas, onde ambos se beneficiam (RASCHE et al., 2006; MELO e AZEVEDO, 2008; BERG e SMALLA, 2009; EMBRAPA, 2012; OLIVEIRA et al., 2013)

A biodiversidade da Caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrícolas e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (BRASIL, 2020). Enzimas e propriedade bioativas produzidas por microrganismos e plantas exclusivas deste bioma são considerados promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, pois possuem grande variabilidade nas suas composições químicas, têm o potencial de possuir propriedades fisiológicas e bioquímicas únicas, que podem agir como agentes antimicrobianos ou antifúngicos, redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, entre outros (MELO et al., 2014; SILVA et al., 2015; SANTOS et al., 2018; FERNANDES; QUEIROZ, 2018). A possibilidade de bioprospecção destes metabólitos secundários oriundos do bioma Caatinga são de grande necessidade para o tratamento das doenças infecciosas e parasitárias, que apresentam relatos constantes de resistência aos medicamentos utilizados na rotina, como as leishmanioses, o que representa um grande problema econômico e de saúde pública (BRITO, 2015; OLIVEIRA, 2016; HOFER, 2019).

3.4 Líquens como micro-habitat de microrganismos da Caatinga

Líquens podem ser considerados como miniecosistemas que encerram a junção de dois organismos diferentes em uma associação estável e autossustentável que se constitui basicamente de um fungo, o componente micobionte, e um ou mais componentes fotossintetizantes (fotobiontes), que podem ser algas verdes e, ou cianobactérias (NASH 2008; JESUS et al, 2011).

Nesta associação, o micobionte produz diversos metabólitos secundários, denominados ácidos liquênicos, enquanto o fotobionte, por sua vez, produz dióxido de carbono através da fotossíntese e fornece compostos orgânicos para o fungo e para seu próprio consumo. As algas ou cianobactérias são beneficiadas na associação pelo abrigo de luz excessiva e pela possibilidade de se estabelecer em ambientes secos (FLEIG et al., 2008; LIMA, 2013).

Os líquens geralmente apresentam crescimento lento e frequentemente habitam regiões com alta radiação, temperatura extrema e clima seco (SANCHO; PINTADO, 2004). São capazes de colonizar diferentes substratos (SANTIAGO, 2015) e possuem ampla distribuição incluindo casca de árvore (líquens corticosos), solo (líquens terrícolas), rochas (líquens saxícolas) (**Figura 14**) e madeira em decomposição (líquens lignícolas) (BOCH et al., 2013).

Figura 14. Rocha colonizada por líquens na Caatinga.



Fonte: DUARTE, 2019.

Bactérias associadas a líquens estão presentes essencialmente em biocrostas, que são camadas densas que se desenvolvem na superfície do solo, sendo formadas por partículas fragmentadas pela erosão e pelo envelhecimento de vários grupos de microrganismos (RAANAN et al., 2016). Diversos componentes são comumente relacionados a estas camadas, dentre os filos caracterizam-se a Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria (em maioria, Alphaproteobacteria) (DA ROCHA et al. 2019; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016).

Os fungos liquenizados são formados por uma associação simbiótica de fungos com clorofíceas unicelulares e /ou cianobactérias e em alguns casos formado pelos três organismos (HAWKSWORTH, 2001; SANTIAGO, 2015). Líquens, tem ampla distribuição incluindo casca de árvore (líquens corticosos), solo (líquens terrícolas), pedras (líquens saxícolas) e madeira em decomposição (líquens lignícolas) (BOCH et al., 2013) Apresentam um crescimento lento (SANCHO & PINTADO, 2004) e frequentemente habitam regiões com alta radiação, temperatura extrema e clima seco (SANTIAGO, 2015).

Algumas funções desenvolvidas por fungos de ambientes extremos podem gerar aplicações biotecnológicas importantes, tais como produzir enzimas e metabólitos secundários com grande potencial farmacológico, principalmente na produção de imunossupressores e antibióticos (CHRISTENSEN, 1989; SINGH et al., 2006; SANTIAGO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012, FURBINO et al., 2014; GODINHO et al., 2015). Além disso, os fungos adaptados às condições extremas são frequentemente investigados pela capacidade de

produção de fotoprotetores (micosporinas e pigmentos), antioxidantes e enzimas ativas a baixas temperaturas (GOMES et al., 2000; LIBKIND et al., 2005; VAZ et al., 2011, ZHAN et al., 2011, GESSLER et al., 2014).

O bioma Caatinga, predominantemente semiárido, de relevo heterogêneo, caracterizado por apresentar longos períodos de seca e curtos períodos chuvosos, radiação solar intensa e estresse hídrico, com peculiaridades de diversidade funcional que favorece a adaptação de organismos extremófilos e raros, apresenta uma maior abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio (MACHADO DE LIMA et al., 2021), no entanto, acredita-se que nesse extenso território nordestino, estejam presentes uma diversidade inexplorada de microrganismos, ricas em enzimas e substâncias bioativas, com inestimável potencial biotecnológico, capazes de produzir fármacos antimicrobianos e antiparasitários (WEBER et al., 2016).

3.5 Pigmentos extracelulares produzidos por microrganismos e suas aplicações na indústria farmacêutica.

Os pigmentos naturais são metabólitos oriundos de organismos vivos como plantas, bactérias e fungos. Estes pigmentos de origem microbiana representam uma promissora alternativa em relação a outros aditivos extraídos de vegetais uma vez que não apresentam problema de sazonalidade (SOUZA, 2018), ou seja, não há necessidade de períodos específicos para a extração.

Além disso, estes pigmentos estão relacionados a diversidade bioquímica destes organismos, pois devido as suas interações metabólicas e ambientais constantes, podem originar metabólitos secundários de importância biotecnológica. No entanto, não somente a estrutura química apresenta variabilidade, estes pigmentos também apresentam uma gama de cores que podem ser produzidos, das quais podemos destacar indigo, melaninas, flavinas, carotenoides, fenazinas, quinonas, violaceína e prodigiosinas (KRAMER et al., 2022; SANTOS-EBINUMA, 2013).

Dentre os microrganismos produtores de pigmentos de interesse biotecnológico, podemos citar a *Serratia marcescens*, que é uma bactéria gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, responsável pela produção de prodigiosina e compostos carotenoides. A prodigiosina, por exemplo, é um pigmento vermelho, que apresenta excelente atividade biológica com ação antifúngica, antibacteriana, antitumoral e antimalárico. Sua produção depende de vários fatores como sais inorgânicos, fonte carbono, nitrogênio, temperatura

adequada, numa faixa de 12 a 36°C e pH pouco influente (MORAES, 2009; CANTALICE, 2014; SOUZA, 2018).

Por sua vez, os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pela cor vermelha, laranja ou amarela de muitos vegetais, flores e plantas em geral. São sintetizados por plantas, algas, fungos tipo leveduras e procariotos (bactérias e arqueas). A atividade biológica dos carotenoides encontra-se associada à sua estrutura e sua produção biotecnológica apresenta grande relevância devido à possibilidade de utilização de substratos de baixo custo. Além disso, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes, destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (VALDUGA et al., 2009; GARCIA-PICHEL, F.& GAO, Q, 2011; MALDONADE, 2007; BHOSALE, 2004).

Os carotenoides também se destacam por suas propriedades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, antiprotozoárias, antioxidantes, anticâncer e muito mais atividades (VENIL, 2020). Ademais, os pigmentos bacterianos são considerados seguros e podem ser utilizados como corantes naturais que beneficiarão a saúde humana e salvarão o ecossistema (MALIK et al., 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de microrganismos isolados da Caatinga.

Os microrganismos coletados na Caatinga alagoana foram cedidos pelo Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte (Campus Arapiraca/UFAL), coordenador do projeto “Antártica e Caatinga: Diversidade Microbiana e Bioprospecção de Enzimas e Pigmentos”. Após o crescimento microbiano, os microrganismos foram submetidos à extração utilizando solventes como acetato de etila e metanol, conforme metodologia descrita por GODINHO et al. (2013).

4.1.1 Microrganismos isolados da Caatinga

Para este estudo, as bactérias resistentes a radiação Ultravioleta curta (UV-C) e os fungos filamentosos utilizados foram disponibilizados pelo Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (LABMIP), vinculado à Universidade Federal de Alagoas, campus Arapiraca. A coleta dos líquens ocorreu no dia 16 de novembro de 2019 e foi realizada na Reserva da Tocaia, situada em uma área de conservação, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), que se localiza entre as coordenadas 9° 22.944’ de latitude Sul e 37° 15.315’ de longitude oeste e altitude média de 250 metros (MASCARENHAS, 2005), encontra-se sem exploração antrópica há mais de 80 anos e por isto atualmente apresenta-se bastante preservada, localizada no município de Santana do Ipanema, Estado de Alagoas (**Figura 15**).

Figura 15. Coleta de líquens no município de Santana do Ipanema/AL.



Fonte: DUARTE, 2019.

As espécies de líquens coletadas e isoladas foram devidamente identificadas, conforme a **tabela 1**. Os isolados foram colocados em criotubos com glicerol (20%) e submetidos a ultra freezer -80°C. No total, foram avaliados 5 isolados bacterianos, sendo dois de uma mesma espécie e 3 isolados fúngicos. Com relação aos isolados bacterianos, os líquens testados foram os coletados da Reserva da Tocaia (LC3, LC4, LC5 e LC8) pertencentes às espécies *Xanthoparmelia plittii* (Gyeln.) Hale, *Peltula clavata* (Kremp.) Wetmore, *Dirinaria applanata* (Fée) D. D. Awasthi e *Peltula euploca* (Ach.) Poelt, respectivamente. Dois fungos filamentosos foram identificados como sendo da espécie *Xanthoparmelia plittii* (Gyeln.) Hale (LC2), o líquen 4LCEM2 foi identificado como *Fusarium sp.*, porém, não foi possível realizar a identificação taxonômica do líquen 4UVLFC2. O líquen 2LCL1 foi identificado como *Penicillium sp.*, no entanto, não foi possível identificar a espécie deste líquen, conforme mostra a **tabela 2**. Todos os isolados apresentaram fotossensibilidade, portanto, foram manipulados em cabine de segurança biológica em condições mínimas de luminosidade.

Tabela 1. Identificação dos líquens de isolados bacterianos.

LIQUENS DE ISOLADOS BACTERIANOS	
LC3	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale
LC4	<i>Peltula clavata</i> (Kremp.) Wetmore
LC5	<i>Dirinaria applanata</i> (Fée) D.D. Awasthi
LC8	<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 2. Identificação de líquens de isolados fúngicos e identificação taxonômica.

LIQUENS DE ISOLADOS FÚNGICOS FILAMENTOSOS		
LC1	Não identificado	<i>Penicillium sp.</i>
LC2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	-
LC2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	<i>Fusarium sp.</i>

Fonte: O autor, 2022.

4.1.2 Cultivo, reativação e produção de biomassa microbiana

Para a reativação dos isolados bacterianos, foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente (AN), com as seguintes especificações: 3g/1 L de Extrato de levedura, 1g/1L de Extrato de carne, 5 g/1 L de Peptona, 5g/1 L de Cloreto de Sódio, 5g/1 L de Glicose e 20g/1 L de Ágar,

todos os nutrientes foram colocados em Erlenmeyer com a quantidade de água destilada correspondente a desejada para cada placa, em seguida os Erlenmeyers foram vedados e levados para a autoclave por 20 minutos a 121°C, a 1 atm. Após a esterilização, o Erlenmeyer foi levado para a cabine de segurança biológica. Verteu-se o meio em placas de Petri, ligou-se a UV-C até que solidificasse, depois foram vedadas com parafilme e submetidas a incubadora a 25 °C por 7 dias.

Logo após o período de incubação, os isolados bacterianos (codificados como 12UVLBC8, 2UVLLC4, 13UVLBC8, 2UVLBC5 e 13UVLBC3) foram cultivados em placas de Petri contendo AN. O cultivo de isolados bacterianos foi baseado no método descrito por Silva et al. (2019) com algumas modificações. A técnica utilizada foi a de estria de esgotamento, logo após mergulhar a alça no microtubo contendo a amostra do isolado. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas em estufa por 7 dias, a 25°C. Depois do crescimento bacteriano, 3 a 6 colônias com a mesma morfologia foram inoculadas em 6 mL de solução salina (0,95%), agitados em vórtex em velocidade máxima para formar uma suspensão padronizada em um espectrofotômetro UV-visível de 0.9 e 1.0 (10^7 cel/mL). Em seguida, 3 mL da alíquota padronizada foi transferido para Erlenmeyer contendo 150 mL de caldo nutriente e submetido a agitação em incubadora Shaker a 120 rpm, durante 7 dias, a 25°C (**Figura 16**). Após esse período, as amostras foram transferidas para tubos falcon e submetidos à centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos. A biomassa bacteriana formada foi submetida a lavagem com solução salina estéril. Por fim, as biomassas foram congeladas em freezer até sua posterior extração.

Figura 16. Aspecto do cultivo bacteriano em caldo nutritivo após incubação por 7 dias a 25°C e 120 rpm.

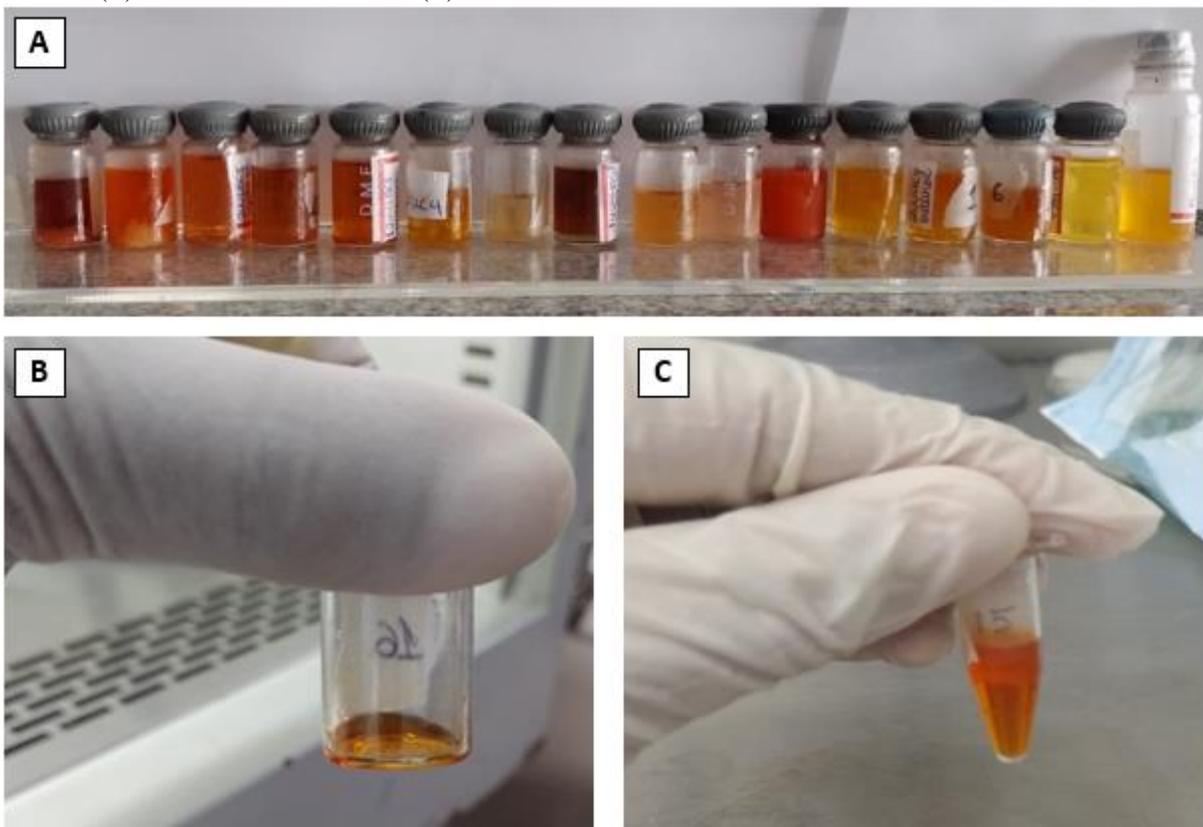


Fonte: O autor, 2021.

4.1.3 Extração de pigmentos intracelulares bacterianos

Inicialmente, foram adicionados 30 mL de acetato de etila à biomassa bacteriana, no entanto, observou-se que este solvente não produziu o efeito esperado na extração, logo, o solvente foi substituído pelo metanol, considerando o mesmo volume, contudo, as soluções extraídas foram devidamente separadas em falcons distintos. Em seguida, as amostras foram agitadas com auxílio de um vórtex em velocidade máxima e submetidas a banho ultrassônico de 30 minutos a 1 hora para otimizar a lise celular. As amostras centrifugadas durante 10 minutos, a 4.500 rpm repetidas vezes, até a máxima despigmentação da biomassa. Os sobrenadantes com os pigmentos extraídos da biomassa bacteriana foram transferidos para falcons estéreis e devidamente identificados. Foi adicionado Sulfato de Sódio (Na_2SO_4) em cada falcon com os pigmentos extraídos, para a evaporação dos resíduos de água, logo após, as soluções obtidas foram transferidas para balões volumétricos devidamente identificados, onde passou pelo rotaevaporador para evaporar o solvente e concentrar o pigmento (GODINHO et al., 2013). Os conteúdos obtidos após essa etapa foram secados em um dessecador de vidro sob vácuo protegido da luz em capela de exaustão de gases (**Figuras 17 e 18**). Em seguida ressuspendidos em dimetilsufóxido (DMSO) (**Figura 19**).

Figura 17. Pigmentos oriundos da biomassa bacteriana em soluções extrativas (A), após a secagem em dessecador de vidro (B) e solubilizado em DMSO (C).



Fonte: O autor, 2023.

4.1.4 Obtenção dos extratos de fungos filamentosos

Extratos acetato de etila de fungos filamentosos foram selecionados para serem avaliados no presente estudo quanto a sua atividade leishmanicida, uma vez que demonstraram atividade antifúngica em estudos preliminares (dados não publicados), conduzidos por nosso grupo de pesquisa. Para tanto, os extratos foram produzidos e cedidos pela mestrandia Vannêssa Rodrigues Teles Maia e pelo Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte. Após o cultivo dos fungos filamentosos 2LCL1, 4LCEM2 e 4UVLFC2, foi realizada a extração utilizando acetato de etila por 7 dias, com posterior secagem do extrato utilizando rotaevaporador e em seguida ressuspendidos em dimetilsufóxido (DMSO).

4.2 Ensaio farmacológicos

4.2.1 Manutenção da linhagem macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura em 5 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640) suplementado com L-glutamina, piruvato, aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (Roche), e mantidos em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% CO₂. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado, na concentração de 1 x 10⁵ células/mL e 200 µL dessa suspensão foi distribuída em placa de 96 poços (Nunc, Denmark) ou 1 x 10⁵ células /poço de placa de 24 poços com lamínulas.

4.2.2 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 5 x 10⁴ células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e posteriormente preenchidos em triplicata com 200 µL dos extratos testados diluídos em meio RPMI nas concentrações de 100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 mg/mL e reincubados por 48h. Os poços controles com células foram cultivados somente com meio de cultura e 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT (MOSMANN et al.,1993), realizando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular dos macrófagos tratados com os extratos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle. Para calcular o Índice de Seletividade (IS), foi utilizado a razão entre CC₅₀ e CI₅₀, conforme descrito por Ribeiro et. al., (2014), através do seguinte cálculo: $IS=CC_{50}/CI_{50}$.

4.2.3 Ensaio de viabilidade de promastigotas

Promastigotas de *L (L). amazonensis* e *L (L). chagasi* foram cultivadas numa concentração de 1x10⁵ parasitos/poço e volume de 100 µL/poço em placa de 96 poços com meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana. Foram adicionadas em triplicatas diferentes concentrações (0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) dos

nove extratos pigmentados e anfotericina B desoxicolato (Sigma-Aldrich) (fármaco padrão) aos poços contendo as formas promastigotas até a obtenção do volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. Após esse período, os parasitos de *L (L). amazonensis* e *L (L). chagasi* foram homogeneizados e o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer e microscopia óptica em aumento de 400x (Nikon Eclipse Ci) (TIUMAN et al., 2005).

4.2.4 Espectrofotometria de Varredura

Os pigmentos foram submetidos à varredura e quantificados em Espectrofotômetro UV-Vis – 200 a 1000 - Série 2000, no intervalo de comprimentos de onda de 200nm a 1000nm. Os resultados foram dados em unidade de absorvância (AU), para avaliar as características do espectro correspondente aos constituintes que compõem o extrato. Foi utilizado 20 µL de (DMSO, sigma), como controle, e 20 µL de cada amostra a uma temperatura de 26°C.

4.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio in vitro foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Tukey, utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Os dados foram considerados significativos quando *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 e ****p <0,0001 em relação ao diluente dos extratos DMSO 0,1% e DMSO 0,2%.

5 PRODUTOS

1. Potencial leishmanicida de extratos pigmentados de microrganismos do bioma Caatinga, submetido aos anais da Academia Brasileira de Ciências, que apresenta QUALIS (2017-2020) A2 para a área de Medicina I.

5.1 PRODUTO 1

Leishmanial potential of pigmented extracts of microorganisms from the Caatinga biome

Éder da Silva Rocha Santos^{1,4}, Maria Nicolle Pereira da Silva⁵, Vannêssa Rodrigues Teles Maia¹, João Kaycke Sarmiento da Silva^{2,4}, Márcio Thomaz dos Santos Varjão^{2,4}, Fábio Souza Moura^{3,4}, Emanuely Beatriz Tenório Sampaio⁵, Amanda Evelyn da Silva⁴, Alysson Wagner Fernandes Duarte^{1,5}, Magna Suzana Alexandre Moreira^{2,3,4}, Aline Cavalcanti de Queiroz^{1,3,4,5}.

Affiliations:

¹Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine – FAMED, Federal University of Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Campus A. C. Simões, 57072-900, Cidade Universitária, Maceió, AL, Brazil.

²Postgraduate Program in Health Sciences, Institute of Biological and Health Sciences - ICBS, Federal University of Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Campus A. C. Simões, 57072-900, Cidade Universitária, Maceió, AL, Brazil.

³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences - ICF, Federal University of Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Campus A. C. Simões, 57072-900, Cidade Universitária, Maceió, AL, Brazil.

⁴Pharmacology and Immunity Laboratory, Institute of Biological and Health Sciences – ICBS, Federal University of Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Campus A. C. Simões, 57072-900, Cidade Universitária, Maceió, AL, Brazil.

⁵Microbiology, Immunology and Parasitology Laboratory, Medical Sciences and Nursing Complex – CCME, Federal University of Alagoas, Av. Manoel Severino Barbosa, S/N, 57309-005, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, Brazil.

*Corresponding author: Aline Cavalcanti de Queiroz
E-mail address: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Address: Microbiology, Immunology and Parasitology Laboratory, Medical and Nursing Sciences Center, Federal University of Alagoas - Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa - Bom Sucesso, Arapiraca - AL, 57309-005, Brazil.

EDER S. R. SANTOS: <http://orcid.org/0009-0005-0333-407>

MARIA N. P. SILVA: <http://orcid.org/0000-0003-3573-9369>

VANNÊSSA R. T. MAIA: <http://orcid.org/0009-0009-7521-5253>

JOÃO K. S. SILVA: <http://orcid.org/0000-0002-5962-785>

MÁRCIO T. S. VARJÃO: <http://orcid.org/0000-0002-9916-1490>

FÁBIO S. MOURA: <http://orcid.org/0000-0002-7705-0159>

EMANUELLY B. T. SAMPAIO: <http://orcid.org/0000-0002-2174-5197>

AMANDA EVELYN DA SILVA: <http://orcid.org/0000-0002-5652-532X>

ALYSSON W. F. DUARTE: <http://orcid.org/0000-0001-9626-7524>

MAGNA S. A. MOREIRA: <http://orcid.org/0000-0002-9979-1994>

ALINE C. QUEIROZ*: <http://orcid.org/0000-0002-6362-272>

ABSTRACT: As leishmaniasis is a neglected disease, with limited therapy and high toxicity, there is a need to develop new forms of treatment for this disease. In this context, microorganisms from the Caatinga, a typical Brazilian biome, represent an interesting source of useful metabolites in the development of new drugs, as they are still little explored. Thus, in this work we produce and pharmacologically evaluate extracts of microorganisms isolated from the Caatinga. The extracts of intracellular pigments of lichen microorganisms from the Caatinga biome were produced in specific culture media, the bacterial isolates were cultivated in Nutrient Agar and the isolates of filamentous fungi in Sabouraud Dextrose Agar. Subsequently, it was observed that most of the extracts tested were not cytotoxic for macrophages of the J774.A1 lineage, except for fungal extracts 4UVLFC2 and 4LCEM2, which showed cytotoxicity with IC₅₀ of 1.61 and 22.11 µg/mL, respectively. In addition, the bacterial extract 13UVLBC3 and the fungal extracts 2LCL1, 4UVLFC2, and 4LCEM2 showed leishmanicidal activity against the promastigotes of *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis*, with a maximum effect greater than 80%. Thus, the data obtained so far show the great leishmanicidal potential of extracts of microorganisms from the Caatinga, supporting the continuity of studies.

KEYWORDS: Caatinga, Leishmanial activity, Microbial extracts.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is caused by protozoan parasites of the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae, genus *Leishmania* and transmitted through the bite of insects of different species of sandflies. They can produce alterations in the skin, mucous membranes, and cartilage, characterizing the integumentary form of the disease. The parasites are obligatorily intracellular, and mainly infect the macrophages of the skin and organs of the endothelial reticulum such as the liver, spleen, bone marrow and lymph nodes, in their visceral form (Oliveira et al. 2013, Carneiro, 2013).

In Brazil, leishmaniasis constitutes a serious public health problem, due to the high number of cases registered annually, the wide geographic distribution and the complexity of its control, which is inherent to the transmission cycles that involve several species of vectors, etiological agents, and reservoirs (Brasil 2015). They are considered tropical diseases that

mainly affect people in situations of social vulnerability and are considered neglected diseases according to the World Health Organization (Who 2019).

As these are neglected diseases, the clinical manifestations of cutaneous and visceral lesions tend to worsen. Failure to treat it can increase the lethality rate due to impairment of vital organs and possible secondary infections. In addition, current treatments are performed with obsolete drugs and contribute to the infeasibility or abandonment by the patient, favouring the progression of the disease (CDC 2020, Roatt et al. 2020, DNDI 2019).

The expansion of leishmaniasis is related to several factors, such as therapeutic failure and high incidence of adverse effects with first-line drugs, high toxicity of second-line drugs, emergence of parasite-resistant strains, almost exclusively parenteral treatment, with daily injections, low adherence of patients to the treatment scheme and insufficient amount to treat patients in endemic areas (Oliveira et al. 2011, DNDI 2019).

In this context, natural products, such as microorganisms from extreme environments, can be potential sources of a wide variety of substances with biological activity, including leishmanicidal ones. The bioprospecting of these products is a promising tool for the advancement of biotechnology and the modernization of pharmacotherapy for infectious diseases (Giudice 2016, Danilovich et al. 2018).

Thus, the microorganisms of the Caatinga biome can be sources of still unknown compounds, in addition to living in poorly explored environments, making their isolation and study of the pharmacological properties of their extracts and isolates an important strategy for the discovery of substances. with different biotechnological and medically useful applications (Mendes 2010; Liu et al. 2013).

Therefore, the present study was carried out with the objective of producing pigmented extracts of the biomass of bacteria and fungi isolated from lichens of the Caatinga biome, as

well as evaluating their leishmanicidal properties against the promastigotes forms of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining bacteria and filamentous fungi from the Caatinga

For this study, the bacteria resistant to UV-C and the filamentous fungi used were provided by the Laboratory of Microbiology, Immunology and Parasitology (LABMIP), linked to the Federal University of Alagoas, Arapiraca campus. The collection of lichens took place on November 16, 2019 and was carried out in the Tocaia Reserve, located in a conservation area, the Private Natural Heritage Reserve (RPPN), which is located between the coordinates 9° 22.944' South latitude and 37° 15.315' west longitude and average altitude of 250 meters (Mascarenhas 2005), has been without anthropic exploitation for over 80 years and for this reason is currently quite preserved, located in the municipality of Santana do Ipanema, State of Alagoas.

The collected and isolated species of lichens were duly identified, as shown in **Table I**. The isolates were placed in cryotubes with glycerol (20%) and submitted to an ultra-freezer at -80°C. In total, 5 bacterial isolates were evaluated, two of the same species and 3 fungal isolates. Regarding bacterial isolates, the lichens used to obtain these isolates were collected from the Tocaia Reserve (LC3, LC4, LC5 and LC8) belonging to the species *Xanthoparmelia plittii* (Gyeln.) Hale, *Peltula clavata* (Kremp.) Wetmore, *Dirinaria applanata* (Fée) D. D. Awasthi and *Peltula euploca* (Ach.) Poelt, respectively. Two filamentous fungi were of the species *Xanthoparmelia plittii* (Gyeln.) Hale (LC2): the fungus 4LCEM2 was identified as *Fusarium sp.*, however, it was not possible to carry out the taxonomic identification of the fungus 4UVLFC2. From lichen LC1, the isolated fungus 2LCL1 was identified as *Penicillium sp.*, however, it was not possible to identify the species of this lichen, as shown in **Table II**. All

isolates showed photosensitivity; therefore, they were manipulated in a biological safety cabinet under conditions minimum brightness.

Table I. Lichen identification of bacterial isolates.

BACTERIAL ISOLATE LICHENS	
LC3	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale
LC4	<i>Peltula clavata</i> (Kremp.) Wetmore
LC5	<i>Dirinaria applanata</i> (Fée) D.D. Awasthi
LC8	<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt

Source: The author 2023.

Table II. Lichen identification of fungal isolates and taxonomic identification.

FILAMENTOUS FUNGAL ISOLATE LICHENS		
LC1	Não identificado	<i>Penicillium sp.</i>
LC2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	-
LC2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	<i>Fusarium sp.</i>

Source: The author 2023.

Biomass production of bacterial isolates

For the reactivation of bacterial isolates, Nutrient Agar (NA) culture medium was used. After sterilization, the bacteria were incubated at 25°C for 7 days. Right after the incubation period, the isolates 12UVLBC8, 2UVLLC4, 13UVLBC8, 2UVLBC5 and 13UVLBC3 were cultivated in Petri dishes containing AN. The cultivation of bacterial isolates was based on the method described by Silva et al (2019) with some modifications. The technique used was the exhaustion streak. The plates were sealed with parafilm and incubated in an oven for 7 days at 25°C. After bacterial growth, 3 to 6 colonies with the same morphology were inoculated into 6 mL of saline solution (0.95%), vortexed at maximum speed to form a standardized suspension in a UV-visible spectrophotometer of 0.9 and 1.0 (10^7 cell/mL). Then, 3 mL of the standardized aliquot was transferred to an Erlenmeyer flask containing 150 mL of nutrient broth and stirred in a Shaker incubator at 120 rpm for 7 days at 25°C. After this period, the samples were transferred to falcon tubes and subjected to centrifugation at 3,500 rpm for 10 minutes. The

formed bacterial biomass was washed with sterile saline solution. Finally, the biomasses were frozen in a freezer until their subsequent extraction.

Extraction of bacterial intracellular pigments

Initially, 30 mL of ethyl acetate (ActOEt) were added to the bacterial biomass, however, it was observed that this solvent did not produce the expected effect in the extraction, so the solvent was replaced by methanol (MetOH), considering the same volume, however, the extracted solutions were separated into distinct falcons. Then, the samples were stirred using a vortex at maximum speed and subjected to an ultrasonic bath for 30 minutes to 1 hour to optimize cell lysis. The samples were centrifuged for 10 minutes at 4,500 rpm repeatedly, until the maximum depigmentation of the biomass. Supernatants with pigments extracted from bacterial biomass were transferred to sterile falcons and duly identified. Sodium Sulphate (Na_2SO_4) was added to each falcon with the extracted pigments, for the evaporation of water residues. Soon after, the obtained solutions were rotary evaporated to evaporate the solvent and concentrate the pigment. The contents obtained after this step were dried in a glass desiccator under vacuum protected from light in a gas exhaust hood. The extracts were dried in a desiccator coupled to a vacuum pump and, after weighing the difference in weight of the flasks before and after drying, they were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at a final concentration of 100mg/mL and filtered through 0.22 μm filter membranes. μM . Next, the samples were stored in an eppendorf tube and kept in a freezer (-20°C).

Cultivation of filamentous fungi

The 2LCL1, 4LCEM2 and 4UVLFC2 isolates were reactivated in Sabouraud Dextrose Agar culture medium. After solidification of the culture medium, each Petri dish received a disc of the fungus. Petri dishes were incubated at 30°C for 7 days for purity analysis.

Biomass production of fungal isolates

The Czapek Agar culture medium was made with 2% glucose as a supplement, according to Oliveira (2013), with a small modification. After sterilizing the material and the culture medium, a 20 mL glass pipette was used, with the aim of standardizing the volume in the Petri dishes (90x15mm). Subsequently, the isolates that had been reactivated were transferred to Petri dishes with the already solidified culture medium. In each plate, three discs of the fungus were added, each with 6 mm in diameter, corresponding to the size of the perforator used, spaced in such a way that they drew a triangle. The Petri dishes were incubated in a bacteriological oven at a temperature of 30°C for 14 days.

Extraction of fungal secondary metabolites

After 14 days of growth of filamentous fungi and production of pigments, the plates of biomass production were used for the extraction of metabolites, where each fungus was removed from the plate and transferred to an Erlenmeyer with extraction solvent. For that, the fungal mycelia with Agar were divided using a sterilized spatula and transferred to an Erlenmeyer and soaked with 100 mL of ethyl acetate PA, followed by sealing with parafilm and protected with aluminum foil to avoid photodegradation, then they were stored in refrigeration for seven days for subsequent extraction of the ethyl acetate fraction.

Filtration, concentration, drying and resuspension of fungal extracts

After 7 days of extraction of the secondary metabolites in ethyl acetate, the samples were submitted to filtration with the aid of Whatman filter paper, right after that the Erlenmeyer flasks with the metabolites were properly sealed with parafilm and involved with aluminum foil. Next, the samples were subjected to concentration in a rotary evaporator coupled to a vacuum pump. Then, the already concentrated pigments were transferred to small, sterilized bottles and placed in a freezer (-20°C). The extracts were dried in a desiccator coupled to a vacuum pump and after weighing the difference in weight of the flasks before and after drying,

they were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at a final concentration of 50mg/mL and filtered through 0.22 μm filter membranes. μM . Next, the samples were stored in an eppendorf tube and kept in a freezer (-20°C).

Macrophage Cytotoxicity Assay

Macrophages of the J774.A1 strain were cultured in 96-well plates at a concentration of 5×10^4 cells/well and incubated in an oven at 37°C with a humid atmosphere containing 5% CO_2 . Then, the wells were washed to remove non-adherent cells and subsequently treated in triplicate with 200 μL of extracts of 12UVLBC8, 2UVLLC4, 13UVLBC8, 2UVLBC5, 13UVLBC3, diluted in RPMI medium at concentrations of 100, 30, 10, 3, 1 and 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, after incubation for 48 hours, the control wells were cells cultivated only with supplemented culture medium or cells cultivated in the presence of the substances diluent (DMSO, Sigma). Cell viability was determined by a colorimetric Methyltetrazolium (MTT) reduction assay (Mosmann, 1983), reading the absorbances in a spectrophotometer at 550 nm. The cell viability of the macrophages treated with the substances was compared with the death pattern obtained in the control cultures. To calculate the Selectivity Index (SI), the ratio between CC_{50} and IC_{50} was used, as described by Ribeiro et. al (2014), through the following calculation: $\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$.

Promastigotes viability assay

Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi* were cultivated at a concentration of 1×10^5 parasites/well and volume of 100 μL /well in a 96-well plate with Schneider medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 2% human urine. Different concentrations (0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the nine pigmented extracts and amphotericin B deoxycholate (Sigma-Aldrich) (standard drug) were added in triplicates to the wells containing the promastigotes forms until obtaining of the final volume of 200 μL . The

plate was incubated in a BOD oven at 27°C for 48 hours. After this period, the parasites of *L (L.) amazonensis* and *L (L.) chagasi* were homogenized and the number of parasites was determined using a Neubauer chamber and optical microscopy at 400x magnification (Nikon Eclipse Ci) (Tiuman et al. 2005).

Scanning Spectrophotometry

The pigments were scanned and quantified in a UV-Vis Spectrophotometer – 200 to 1000 - Series 2000, in the range of wavelengths from 200nm to 1000nm. The results were given in absorbance units (AU), to evaluate the characteristics of the spectrum corresponding to the constituents that make up the extract. 20 µL of (DMSO, sigma) was used as a control, and 20 µL of each sample at a temperature of 26°C.

Statistical analysis

Statistical analysis of data obtained in vitro was performed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc tests, using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA statistics). Data were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ in relation to the diluent of the 0.1% and 0.2% DMSO extracts.

RESULTS AND DISCUSSION

The isolation of bacteria and fungi from the Caatinga, through cultivation techniques, allowed the production of biomass and pigmented extracts with their secondary metabolites. The identification of pigmented bacterial and fungal microorganisms is presented in **Table III**. The use of two solvents, ethyl acetate (ActOEt) and methanol (MetOH), allowed the complete extraction of pigments present in the bacteria's biomass. For the extraction of pigments in the biomass of filamentous fungi, only ethyl acetate (ActOEt) was used as solvent. After drying, the extracts showed the same colorimetric aspects of pigments extracted from bacterial and fungal biomass.

The extracts of bacteria isolated from lichens from Serra da Tocaia (13UVLBC3, 2UVLCC4, 12UVLBC5, 12UVLBC8 and 13UVLBC8) showed golden yellow, orange, red, pink, and orange pigments, respectively. Fungal lichen extracts (2LCL1, 4LCEM2 and 4UVLFC2) showed light brown, dark yellow and dark brown pigments, respectively.

Tabela III. Bacteria and fungi isolated from lichens from the Caatinga biome.

Lichen (Code)	Code of Bacterial Microorganisms	Species	Origin	Colony color
LC3	13UVLBC3	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	Reserve Tocaia	Golden yellow
LC4	2UVLCC4	<i>Peltula clavata</i> (Kremp.) Wetmore	Reserve Tocaia	Orange
LC5	2UVLBC5	<i>Dirinaria applanata</i> (Fée) D. D. Awasthi	Reserve Tocaia	Red
LC8	12UVLBC8	<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt	Reserve Tocaia	Pink
LC8	13UVLBC8	<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt	Reserve Tocaia	Orange
Lichen (Code)	Code of Fungal Microorganisms	Species	Origin	Colony color
LC1	2LCL1	Not identified	Reserve Tocaia	Light brown
LC2	4LCEM2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	Reserve Tocaia	Dark yellow
LC2	4UVLFC2	<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale	Reserve Tocaia	Dark brown

Source: The author, 2023.

Organic solvents are known for their performance in the extraction of secondary metabolites from various microorganisms, including bacteria isolated from extreme environments and pigments. Methanol has been commonly used for this purpose. Accordingly, from members belonging to the genera *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Zobellia*,

Planococcus, *Arthrobacter*, *Salinibacterium* and *Cryobacterium*, isolated from different substrates in the Fildes Peninsula in Ilha do Rei, Antártica, Vila et al. (2019) identified several carotenoids, the from biomass lyophilization and methanol extraction.

UV-C resistant bacteria isolated from Antarctica had their biomass subjected to lyophilization and were susceptible to extraction with the same solvent (Órdenes-Aenishanslins et al. 2016). In addition, methanol was also used for the extraction, from *Kocuria palustres* isolated from the Caatinga, of sarcinaxanthin, a carotenoid considered rare due to its carbon skeleton, with remarkable antioxidant ($76.53 \pm 0.09\%$) and photoprotective ($SPF = 9.36 \pm 0.52$) of this isolate (Silva et al. 2021).

In recent tests (unpublished data), the antifungal action against *Candida albicans* was observed in three pigment extracts of the isolates: 2LCL1, 4LCEM2 and 4UUVLFC2, presenting an inhibition halo: 7mm, 14mm and 10mm, respectively, demonstrating its antifungal action for a future application in pharmaceuticals. These extracts were also selected to be evaluated for their leishmanicidal activity in the present study, since fungi and *Leishmania* have ergosterol in their plasmatic membrane.

Regarding antifungal activity, some studies have reported the antimicrobial activity of fungal lichen substances, especially the greater sensitivity of Gram-positive bacteria, using chloroform extracts and acetone extracts (Srivastava et al. 2013, Ramos et al. 2014, Sariözlü et al. 2016, Kemegne et al. 2017, Moura et al. 2017). Antimicrobial activity tests with lichenized fungal extracts performed with strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Mycobacterium phlei* showed greater sensitivity, with inhibition halos ranging from 8 to 12 mm (Vieira et al. 2019). Still regarding the antifungal activity, some studies have reported the sensitivity of *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum gypseum* and *Epidermophyton floccosum* to lichen extracts from different species (Vieira et al. 2019).

Enzymes of the ergosterol biosynthetic pathway are important targets of several classes of antifungals, since ergosterol is present in the membrane of these protozoa. Polyenes such as amphotericin B act at the level of ergosterol by strongly binding to this molecule. This effect damages the cell's plasma membrane, resulting in leakage of intracellular ions. Azoles such as fluconazole, itraconazole or voriconazole inhibit a cytochrome P450 (Erg11p) responsible for the 14 α demethylation of lanosterol and, thus, block the biosynthesis of ergosterol, resulting in changes in the fluidity and permeability of the fungal cytoplasmic membrane (Kubiça 2016, Berto et al. 2018).

After producing the extracts, the cytotoxicity of the microbial extracts 12UVLBC8, 2UVLLC4 (MetOH), 13UVLBC8, 2UVLBC5, 13UVLBC3 and 2UVLLC4 (ActOEt) and fungal extracts 2LCL1, 4LCEM2 and 4UVLFC2 were evaluated. In the present study, the MTT assay was used to evaluate the effect of bacterial and fungal extracts on the viability of J774.A1 strain macrophages after 48h of treatment (**Table IV**). The control group was established as cells cultured only in the presence of the vehicle used to dilute the extracts (0.1% DMSO for bacterial pigmented extracts and 0.2% DMSO for fungal pigmented extracts).

Table IV. Effect of bacterial extracts and filamentous fungi of Caatinga lichens (100, 30, 10, 3, 1, and 0.3 $\mu\text{g/mL}$) and Amphotericin B (100 to 0.001 μM) on the viability of J774.A1 macrophages in the MTT assay.

Treatment	IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$ (CI 95%) ^a	Maximum Effect \pm S.E.M. ^b
12UVLBC8 (MetOH)	>100	NC
2UVLLC4 (MetOH)	>100	NC
13UVLBC8 (MetOH)	>100	NC
2UVLBC5 (MetOH)	>100	NC
13UVLBC3 (ActOEt)	>100	NC
2UVLLC4 (ActOEt)	>100	NC
2LCL1 (ActOEt)	44.24 (34.96 – 53.52)	86.58 \pm 0.15****
4UVLFC2 (ActOEt)	45.24 (39.47 – 51.01)	77.56 \pm 1.14****
4LCEM2 (ActOEt)	38.08 (25.15 – 51.00)	71.53 \pm 3.50****
Amphotericin B	3.11 (2.15 – 4.57)	85.70 \pm 0.14****

^aA 50% inhibitory concentration (95% confidence interval) of J774.A1, calculated using concentration-response curves. ^bmean \pm standard error of the mean of the maximum effect on the viability of J774.A1, in triplicate of a representative experiment. Maximum effect values were significant when ****p < 0.0001 compared to 0.1% DMSO group 0.1% DMSO (bacterial extracts), 0.2% DMSO (fungal extracts). NC: non-cytotoxic effect determined up to the maximum concentration tested, when compared to the group. ND: Not determined.

The MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide) determines the metabolic activity of cells through indirect quantification, through spectrophotometry, promoted by mitochondrial enzymes. Thus, cultures that present macrophages with viable mitochondria can reduce MTT to formazan crystals (Mosmann 1983). The results obtained in cultures treated with extracts were compared with the results obtained in cultures treated with DMSO 0.1% for bacterial extracts and with 0.2% DMSO for fungal extracts.

According to the results obtained, cytotoxicity was not observed in bacterial extracts, both in methanolic and ethyl acetate extracts, the six tested extracts showed IC_{50} greater than $100\mu\text{g/ml}$, and did not show cytotoxic activity, when compared to the DMSO 0,1% group. About pigmented fungal extracts, all three showed toxicities, with an IC_{50} below $50\mu\text{g/mL}$ and a maximum cytotoxic effect greater than 70%.

Amphotericin B deoxycholate (Sigma-Aldrich), a polyene antibiotic widely administered as a second-line treatment for leishmaniasis, was chosen as the standard drug in this trial and showed a maximum cytotoxicity of $85.70 \pm 0.14\%$ and an IC_{50} of $3.11\mu\text{g/ml}$.

The bacterial extracts were then tested for biological activity against the promastigote's forms of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis* species, during 48 hours of treatment, as shown in **Table V**.

Table V. Effect of bacterial and fungal extracts of Caatinga lichens (100, 30, 10, 3, 1 and 0.3 $\mu\text{g/mL}$) and Amphotericin B (100 to 0.001 μM) on the viability of *Leishmania* spp.

Treatment	Promastigote of <i>L. chagasi</i>		Promastigote of <i>L. amazonensis</i>	
	CI ₅₀ (CI 95%) ^a	Maximum Effect \pm S.E.M ^b	CI ₅₀ (CI 95%) ^a	Maximum Effect \pm S.E.M ^b
12UVLBC8 (MetOH)	>100	NA	>100	NA
2UVLLC4 (MetOH)	>100	NA	>100	38.12 \pm 1.34****
13UVLBC8 (MetOH)	>100	NA	>100	NA
2UVLBC5 (MetOH)	>100	NA	>100	NA
13UVLBC3 (ActOEt)	12.07 (4.69 – 35.46)	81.46 \pm 1.69****	8.80 (5.96 – 12.92)	100 \pm 0.00****
2UVLLC4 (ActOEt)	>100	28.57 \pm 8.24**	>100	26.23 \pm 2.83
2LCL1 (ActOEt)	13.55 (5.84 – 36.92)	100 \pm 0.00****	3.13 (2.18 – 4.46)	100 \pm 0.00****
4UVLFC2 (ActOEt)	10.24 (6.64 – 15.65)	100 \pm 0.00****	6.09 (3.00 – 12.44)	100 \pm 0.00****
4LCEM2 (ActOEt)	9.65 (5.93 – 15.63)	100 \pm 0.00****	1.06 (0.37 – 2.55)	100 \pm 0.00****
Amphotericin B	0.02 (0.01 – 0.04)	100 \pm 0.00****	0.12 (0.08 – 0.18)	100 \pm 0.00****

^a50% inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of *Leishmania* promastigotes, calculated using concentration-response curves. ^bmean \pm standard error of the mean (%) of the maximum effect on *Leishmania* promastigote viability, in triplicate of a representative experiment. Maximal effect values were significant when *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001, compared to DMSO 0.1% (bacterial extracts) and DMSO 0.2% group (fungal extracts). NA: the extract is not active, when compared to the DMSO group.

Altogether, nine pigmented extracts obtained from bacteria and filamentous fungi isolated from lichens from the Caatinga biome were tested to evaluate their anti-promastigote activity. Of these, 13UVLBC3 stood out among the pigmented bacterial extracts, as it showed activity for the promastigotes forms of both species tested *L. (L.) chagasi*, maximum effect of 81.46% and IC₅₀ 12.07 $\mu\text{g/mL}$; *L. (L.) amazonensis* maximum effect of 100% and IC₅₀ 8.80 $\mu\text{g/mL}$. Regarding activity on *L. (L.) amazonensis*, both 13UVLBC3 and the standard drug amphotericin B, showed a maximum effect of 100%, with IC₅₀ less than 10 $\mu\text{g/mL}$. However, in *L. (L.) chagasi*, the activity of said extract was slightly lower than amphotericin B. The extract was also less potent than amphotericin B against the *Leishmania* species tested. showed no activity at any of the tested concentrations.

On the other hand, all fungal pigmented extracts were able to kill the promastigotes forms of the two tested species: the 2LCL1 extracts had a maximum effect of 100% and an IC₅₀ of 13.55 $\mu\text{g/mL}$ against *L. (L.) chagasi* and a maximum effect of 100% and IC₅₀ of 3.13 $\mu\text{g/mL}$

against *L. (L.) amazonensis*, 4UVLFC2 100% maximum effect and IC₅₀ of 10.24 µg/ml against *L. (L.) chagasi* and 100% maximum effect and IC₅₀ of 6.09 µg/mL against *L. (L.) amazonensis* and 4LCEM2 100% maximum effect and IC₅₀ of 9.65 µg/mL against *L. (L.) chagasi* and 100% maximum effect and IC₅₀ of 1.06 µg/ml against *L. (L.) amazonensis*. The standard drug amphotericin B inhibited, up to the maximum concentration tested, 100% of the viability of both *Leishmania* species tested, being more potent than the fungal extracts. However, it is noteworthy that the fungal extracts showed a pharmacological effect like this standard drug.

Gamboa-Angulo et al. (2012) tested fungal extracts of the genus *Fusarium sp.* against two strains (GS and PC) of *Leishmania mexicana* promastigotes, from fungal samples obtained from the culture collection of the Biotechnology Unit and Scientific Research Center of Yucatan, Mexico. *Fusarium sp.* TA50 and *Fusarium sp.* TA54, inhibited the target strains against both, however, the isolate *Fusarium sp.* TA54 demonstrated remarkable inhibition with an IC₅₀ of 14.23 µg/mL and IC₁₀₀ of 50 µg/mL against the GS strain of *L. mexicana* and IC₅₀ = 22.16 µg/mL and IC₁₀₀ of 50 µg/mL against the PC strain of *L. mexican*

Son et al. (2008) demonstrated that *Fusarium moniliforme*, which depending on the conditions and the specificity of the strain, can produce a wide spectrum of bioactive metabolites (Brückner et al., 1989), produces bikaverin, which is an effective quinone in the control of *Leishmania brasiliensis*.

In another study, Campos et al. (2015) demonstrated that isolates of *Fusarium spp.*, collected from stems and bark of *Caesalpinia echinata*, showed leishmanicidal activity (IC₅₀ = 1.86 µM) against promastigotes of *Leishmania braziliensis* (Nascimento et al. 2012), attributed to beauvericin, which is a mycotoxin produced by many fungi, including *Fusarium spp.* (Wang & Xu 2012).

In the present study, the fungal extract 4LCEM2 was identified as belonging to the genus *Fusarium sp.*, as shown in **Table II**. This extract showed leishmanicidal activity against

the promastigote's forms of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*, shown in **Table V**. The result found was the best among all extracts, showing greater sensitivity against the strains tested, making it a promising drug candidate.

In recent studies, Ogaki et al. (2020) identified several species of fungi of the genus *Penicillium sp.*, the genus to which the 2LCL1 extract belongs, capable of producing bioactive metabolites from samples collected from different substrates on the Antarctic continent, among them, *Penicillium allii-sativi*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium solitum*, originating from marine sediments of different depths, which showed leishmanicidal activity against *L. amazonensis*. The 4UVLFC2 extract was the only one that did not have its taxonomic identification defined.

Considering the cytotoxic effect for macrophages and promastigotes of the two species of *Leishmania* tested on treatment with bacterial and fungal extracts, the calculation of the selectivity index (SI) of the extracts was performed (**Table VI**). This index measures the ratio between the cytotoxicity of the extract for the macrophage and its leishmanicidal activity.

Table VI. Selectivity Index (SI) of bacterial extracts (12UVLBC8, 2UVLLC4 (MetOH), 13UVLBC8, 2UVLBC5, 13UVLBC3 and 2UVLLC4 (EtOAc)) and fungal extracts (2LCL1, 4LCEM2 and 4UVLFC2).

Treatment	IS <i>L. (L.) chagasi</i>	IS <i>L. (L.) amazonensis</i>
12UVLBC8 (MetOH)	ND	ND
2UVLLC4 (MetOH)	ND	ND
13UVLBC8 (MetOH)	ND	ND
2UVLBC5 (MetOH)	ND	ND
13UVLBC3 (ActOEt)	>8.29	>11.35
2UVLLC4 (ActOEt)	ND	ND
2LCL1 (ActOEt)	3.26	14.13
4UVLFC2 (ActOEt)	4.42	7.42
4LCEM2 (ActOEt)	3.95	35.62
Amphotericin B	155.5	25.92

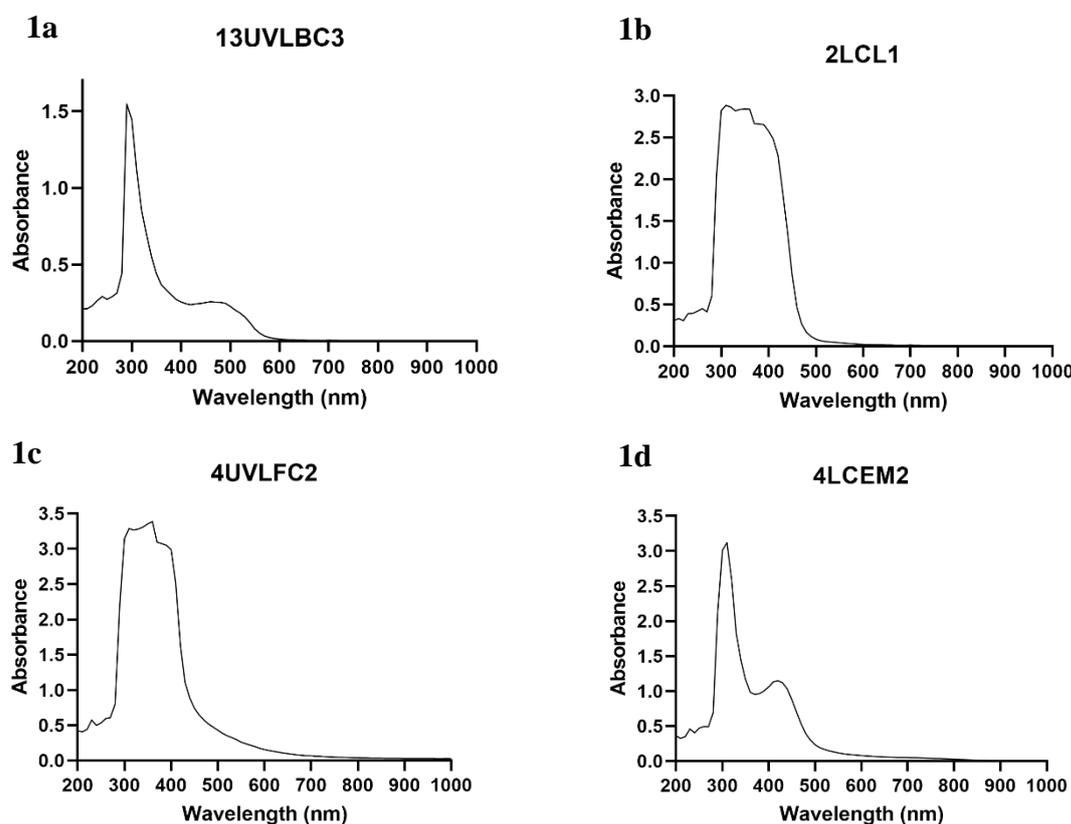
SI: Selectivity Index = $CC_{50}(\text{macrophages}) / IC_{50}(\text{Leishmania spp.})$. (-): Substance without activity above 50% or with CC_{50} less than IC_{50} . ND = Not determined.

SI calculation showed that 13UVLBC3, 2LCL1 and 4LCEM2 extracts were more selective for promastigotes *L. (L.) amazonensis* when compared to macrophages, as they

presented SI greater than 10. Moreover, amphotericin B was more selective for both *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*. In this sense, the mentioned extracts present a more favorable profile for the development of new leishmanicidal prototypes. Furthermore, compounds isolated from these extracts, if tested separately in the future, may have a pharmacological activity profile superior to that of the extracts.

The active extracts were submitted to the scanning spectrophotometry technique, to verify their absorbance peaks, as can be seen in **Figure 1**.

Figure 1 – UV-Vis* scanning spectrophotometry of bacterial and fungal extracts from the Caatinga that were active against promastigotes of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*.



*Absorption spectra obtained for the pigmented bacterial extract (13UVLBC3) and for the pigmented fungal extracts (2LCL1, 4UVLFC2 and 4LCEM2), in the wavelength range from 200nm to 1000nm, containing 20 μ L of extract.

Regarding the results obtained, the bacterial extract 13UVLBC3 (ActOEt), which presented a yellow-gold color, had an absorbance peak that varied between 400 and 500 nm, which may be indicative of the presence of carotenoids in its composition. Solieve et al. (2011)

reported that as a characteristic of the bioactive compounds of bacteria, yellow pigments have antiviral, antitumor, antiprotozoal, antioxidant, antibacterial activity, among other activities.

According to Venil et al. (2020), the prospection of bacterial pigments in the health area has stimulated attention to the search for alternative natural dyes, including for pharmaceutical use, mainly because they are ecological and non-toxic (Chiba et al. 2006). Although the production of pigments depends on the microorganism itself and the extraction conditions (Usman et al. 2017), bacterial pigments are considered safe and can benefit human health, as they have several activities such as antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiobesity, antibiotic and antiparasitic (Malik et al. 2012, Fernandez-Orozco et al. 2011, Kim et al. 2011).

Bacteria produce different shades of color depending on the taxonomic group they belong to, such as red, red-yellow, yellow, green, blue and purple. The bacterial pigment can be identified with the aid of the Munsell color system (Venil 2020). Among the bacterial pigments, astaxanthin, canthaxanthin, carotenoids, melanins, garnet, indigoidin, flavins and quinones stand out. of food and beautification (Fernandez-Orozco et al. 2011, Kim et al. 2011, Sathasivam and Ki 2018). In addition, carotenoids comprise a family of natural compounds, among which bacteria are present, and normally have two to three absorption bands located in the blue-violet region of the spectrum. Carotenes have absorption peaks (nm) ranging from 420 to 495, while xanthophylls have nm from 425 to 524 (Govindje 1969), depending on the type of carotenoid and dilution.

In relation to the three fungal extracts, they also showed absorbance peaks typical of carotenoids (450nm). According to Lopes (2011), filamentous fungi have secondary metabolites of great pharmacological interest. Several filamentous fungi with biotechnological applications are found in the Caatinga, some genera have been cataloged as *Acremonium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Monilia sitophila*,

Penicilium sp., *Scedosporium sp.*, *Scopulariopsis sp.* and *Sepedonium sp.*, among others (Santos 2012).

The results obtained in this study prove the importance of bioprospecting in this uniquely Brazilian biome. Although it is still little studied, it is known that the Caatinga is rich in biodiversity, with high therapeutic potential, and has microorganisms that produce natural bioactive compounds, especially fungi. Studies suggest that fungi have been the major producers of active secondary metabolites and are used as antibiotics, antiparasitics, antitumors, antifungals, among other compounds, including compounds produced by endophytic microorganisms, such as alkaloids and terpenes, which protect plants from arthropod attacks (Busby et al. 2016, Macheleidt et al. 2016; Abraham et al. 2016; Shymanovich et al. 2019, Zhang et al. 2019).

The data obtained so far have shown the need to continue the study of the leishmanicidal activity of these active microbial extracts, with the performance of more in-depth tests to understand the mechanism of leishmanicidal action, as well as the effects of these natural extracts on macrophages infected with *Leishmania spp.* regarding the production of nitric oxide, in addition to carrying out tests to evaluate the anti-amastigote activity and chemically characterizing the extracts to identify and pharmacologically test their bioactive metabolites.

CONCLUSION

Of the six bacterial extracts and three fungal extracts evaluated against promastigotes of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*, the ethyl acetate extract of the bacteria 13UVLBC3 was the only bioactive bacterial extract, not showing cytotoxicity to the host cell (macrophages). Regarding fungal extracts, all of them showed leishmanicidal activity, with emphasis on the ethyl acetate extract of the fungus 4LCEM2, which showed the best pharmacological profile, with a leishmanicidal effect of 100% and IC₅₀ lower than 10ug/mL,

against the two tested species. The scanning spectrophotometry analysis of the active extracts showed that they had absorbance peaks that suggest the presence of carotenoids in their composition. The fungus that showed the best leishmanicidal activity belongs to the genus *Fusarium sp.* From this identification, and through the results of the antifungal action (unpublished data) against *Candida albicans*, a hypothesis to be considered is the possibility that pigmented fungal extracts have ergosterol inhibitors among their secondary metabolites.

Thus, it becomes essential to consider the biotechnological potential of the Caatinga. The microorganisms that are found only in this biome may have the potential to produce secondary bioactive metabolites that can be used in medicine, in the production of new drugs, especially capable of controlling diseases considered neglected, such as leishmaniasis.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S.; BASUKRIADI, A.; PAWIROHARSONO, S.; SJAMSURIDZAL, W. The potency of active compound from mangrove fungal endophyte *Emericella nidulans* BPPTCC 6038 as bioinsecticide. In: Anais 2016.

BERTO, C.; WIRTH, F.; BARTH, N.; HERMES, D. M. Bases of antifungal resistance: a commented review. Rev. UNINGÁ, Maringá, v. 55, n. 3, p. 52-71, jul./set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 1 a ed. rev. e ampl., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 109 p., 2015.

BRÜCKNER B, BLECHSCHMIDT D, SCHUBERT B. *Fusarium moniliforme* Sheld. A fungus producing a broad spectrum of bioactive metabolites. Zentralbl Mikrobiol. 1989;144(1):3-12. doi: 10.1016/s0232-4393(89)80019-8. PMID: 2652945.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMB, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. Plant Molecular Biology, v. 90, n. 6, p. 645-655, 2016.

CAMPOS, FERNANDA FRAGA et al. 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, vol. 110, n. 1, p. 65-74. 2015.

CARNEIRO, DDMT.; Estudo epidemiológico sobre a Leishmaniose Visceral em centro urbano de médio porte com transmissão antiga e persistente de *Leishmania Leishmania infantum*, 2013. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, 2013. 175p.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Leishmaniasis. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, 2020. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 15 de junho de 2023.

CHIBA, S., TSUYOSHI, N., FUDOU, R., OJIKI, M., MURAKAMI, Y., OGOMA, Y., et al. Pigmento magenta produzido por fungo. J. Gen. Appl. 2006, 52–201. DOI: 207.10/jgam.2323.52.

DANILOVICH, Mariana Elizabeth et al. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. Polar Biology, v. 41, n. 7, p. 1417-1433, 2018.

DNDI - DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Inovação e acesso para populações negligenciadas. Rio de Janeiro: DNDi, 2019. Disponível em: <https://www.dndial.org/comunicacao/publicacoes/>, Acesso em: 26/07/2022.

FERNANDEZ-OROZCO, R., ROCA, M., GANDUL-ROJAS, B., e GALLARDO-GUERRERO, L. (2011). Capacidade sequestradora de DPPH de pigmentos cloroplásticos e compostos fenólicos de frutos de oliveira (cv. Arbequina) durante o amadurecimento. J. Alimentos Comp. 24, 858–864. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.05.003.

FLEIG, M. & GRÜNINGER, W. 2008. Líquens da Floresta com Araucária no Rio Grande do Sul. **Pró-Mata: Guia de Campo 3**. Tübingen, University of Tübingen.

GAMBOA-ANGULO M, MOLINA-SALINAS GM, CHAN-BACAB M, PERAZA-SÁNCHEZ SR, HEREDIA G, DE LA ROSA-GARCÍA SC, REYES-ESTEBANEZ M. Antimycobacterial and antileishmanial effects of microfungi isolated from tropical regions in México. Parasitol Res. 2013 Feb;112(2):559-66. doi: 10.1007/s00436-012-3167-4. Epub 2012 Oct 21. PMID: 23086442.

GIUDICE, Angelina Lo; FANI, Renato. Antimicrobial potential of cold-adapted bacteria and fungi from polar regions. In: Biotechnology of Extremophiles: Springer, Cham, 2016. p. 83-115.

GOVINDJEE, R and E. RABINOWITCH. Photosynthesis. Wiley, 1969.

KEMEGNE GA, MKOUNGA P, NGANG JJE, KAMDEM SLS, NKENGFACK AE. Antimicrobial structure activity relationship of five anthraquinones of emodine type isolated from *Vismia laurentii*. BMC Microbiol. 2017 Feb.17:41. Doi: 10.1186/s12866-017-0954.

KIM, HW, KIM, JB, CHO, SM, CHUNG, MN, LEE, YM E CHU, SM (2012a). Mudanças de antocianina na batata-doce de polpa roxa coreana, Shinzami, afetadas por vapor e cozimento. Química Alimentar. 130, 966–972. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.031.

KUBIÇA, T. F. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PROSPECÇÃO DE COMBINAÇÕES ANTIFÚNGICAS SINÉRGICAS “IN VITRO” FRENTE A *Trichosporon asahii*, ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO PROLONGADA DE FLUCONAZOL. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), 2016.

LIU, Jing-Tang et al. Bioactive natural products from the antarctic and arctic organisms. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, v. 13, n. 4, p. 617-626, 2013.

LOPES, F. C. Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A.; Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. Annual Review of Genetics, v. 50, n. 1, p.371-392, 23 nov. 2016.

MALIK, K., TOKKAS, J., E GOYAL, S. (2012). Pigmentos microbianos: uma revisão. Int. J. Microb. Res. Technol. 361–365.

MASCARENHAS, J.C.; BELTRÃO, B.A. & SOUZA JUNIOR, L.C. 2005. Diagnóstico do Município de Santana do Ipanema. Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água Subterrânea, Estado de Alagoas. Recife, CPRM/PRODEEM.

MENDES, T. D. Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Atinni (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983. J. Immunol. Methods, v. 65, p. 55-63, 198.

MOURA JB, VARGAS AC, GOUVEIA GV, GOUVEIA JJS, RAMOS-JUNIOR JC, BOTTON SA, et al. In vitro antimicrobial activity of the organic extract of *Cladonia substellata* Vainio and usnic acid against *Staphylococcus spp.* obtained from cats and dogs. Pesq Vet Bras. 2017 Apr;37(4):368-78. Doi: 10.1590/s0100-736x2017000400011.

NASCIMENTO, A. M.; CONTI, R.; TURATTI, I. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J. S.; CRUZ, A. K.; PUPO, M. T. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(6): 1276-1281, Nov./Dec. 2012.

OGAKI, M.B., COELHO, L.C., VIEIRA, R., NETO, A.A., ZANI, C.L., ALVES, T.M.A., JUNIOR, P.A.S., MURTA, S.M.F., BARBOSA, E.C., OLIVEIRA, J.G., CERAVOLO, I.P., PEREIRA, P.O., COTA, B.B., VIANA, R.O., ALVES, V.S., ROSA, L.H., 2020. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: Taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles*. 24, 227-238.

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. 2011 - Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118:87-96.

OLIVEIRA, L.G.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, v. 95, p. 49-54, 2013. DOI: 0.1016/j.jaridenv.2013.03.007.

OLIVEIRA, LFG.; GILBERT, B.; BÔAS, GKV. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2013.192>.

WHO. World Health Organization. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS, 2019.

ÓRDENES-AENISHANSLINS, N. et al. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 162, p. 707-714, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004>.

RAMOS DBM, GOMES FS, NAPOLEÃO TH, PAIVA PMG, SILVA MDC, COELHO LCBB. Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. *Chin J Biol*. 2014 Jan;2014. Doi: 10.1155/2014/219392.

RIBEIRO T, et. al. Learning Delayed Influences of Biological Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2:81; 2014.

ROATT BM, DE OLIVEIRA CARDOSO JM, DE BRITO RCF, COURA-VITAL W, DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES RD, REIS AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Nov;104(21):8965-8977. doi: 10.1007/s00253-020-10856-w. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32875362.

SANTOS, S. N. Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2012.

SARIÖZLÜ NY, CANKILIÇ MY, CANDAN M, TURGAY T. Antimicrobial activity of lichen *Bryoria capillaris* and its compound barbatolic acid. *Biomed Res.* 2016:S419-23.

SATHASIVAM, R., e KI, J. S. (2018). Uma revisão das atividades biológicas de carotenoides microalgais e seu potencial uso nas indústrias de saúde e cosméticos. *Drogas* 16:26. DOI: 10.3390/md16010026.

SHYMANOVICH, T.; MUSSO, A. M.; CECH, N. B.; FAETH, S. H. Epichloë endophytes of *Poa alsodes* employ alternative mechanisms for host defense: insecticidal versus deterrence. *Arthropod-Plant Interactions*, v. 13, n.1, p. 79-90, 2019.

SILVA TR, TAVARES RSN, CANELA-GARAYOA R, et al. Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. *Mar Biotechnol.* 2019; 21(3): 416-429. doi:10.1007/s10126-019-09892-z.

SILVA, T. C. D. M, et al. Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 53, p. 44-53, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.05.004>.

SOLIEVE, A. B., HOSOKAWA, K., e ENOMOTO, K. (2011). Pigmentos bioativos de bactérias marinhas: aplicações e funções fisiológicas. *Evide baseado Compl Alternat Med.* 670349:17. DOI: 10.1155/2011/670349.

SON SW, KIM HY, CHOI GJ, LIM HK, JANG KS, LEE SO, LEE S, SUNG ND, KIM JC (2008) Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *J Appl Microbiol* 104:692–698.

SRIVASTAVA P, LOGESH AR, UPRETI DK, DHOLE TN, SRIVASTAVA A. In-vitro evaluation of some Indian lichens against human pathogenic bacteria. *Mycosphere.* 2013 Aug;4(4):734-43. Doi: 10.5943/mycosphere/4/4/10.

TIUMAN, T. S.; UEDA, T. N.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* V 49:176-182. 2005.

USMAN, H. M., ABDULKADIR, N., GANI, M., e MAITURARE, H. (2017). Pigmentos bacterianos e seu significado. *MOJ Bioequiv. Aproveita.* 4, 285–288. DOI: 10.15406/mojbb.2017.04.00073.

VENIL, C. K.; DUFOSSÉ, L.; DEVI, P. R. Bacterial Pigments: Sustainable Compounds With Market Potential for Pharma and Food Industry. Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2020. Doi. 10.3389/fsufs. 2020.00100.

VIEIRA, Victor Hugo de Carvalho et al. Atividade antimicrobiana de fungos liquenizados ocorrentes no campus Belém da Universidade Federal do Pará, estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [online]. 2019, vol.10, e201900037. Epub 05-Nov-2019. ISSN 2176-6215. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223201900037>.

VILA, E. et al. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnology Reports*, v. 21, p. e00306, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306>.

WANG Q, XU L 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 17: 2367-2377.

ZHANG, P.; YUAN, X.-L.; DU, Y.-M.; ZHANG, H.-B.; SHEN, Z.-M.; ZHANG, Z.-F.; LIANG, Y.-J.; ZHAO, D.-L.; XU, K. Angularly Prenylated Indole Alkaloids with Antimicrobial and Insecticidal Activities from an Edaphytic Fungus *Fusarium sambucinum* TE-6L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. acs.jafc. 9b05827, 21 out. 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destaca-se que foi possível extrair metabólitos pigmentados de microrganismos isolados da Caatinga. Além disto, os extratos pigmentados de bactérias 12UVLBC8, 2UVLLC4, 13UVLBC8, 2UVLBC5, 13UVLBC3 não induziram efeito deletério para macrófagos da linhagem J774.A1, mostrando-se menos citotóxico que o fármaco-padrão anfotericina B. Já os extratos fúngicos 2LCL1, 4LCEM2 e 4UVLFC2 apresentaram atividade citotóxica para os macrófagos quando comparados ao DMSO 0,2%.

A avaliação da atividade leishmanicida foi conduzida contra as formas promastigotas das duas espécies de parasitos, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. O extrato bacteriano de acetato de etila 13UVLBC3 apresentou atividade contra ambas as espécies testadas, no entanto, foi menos potente que a anfotericina B. Com relação aos extratos fúngicos, os três apresentaram atividade leishmanicida, apresentando efeito farmacológico similar ao fármaco padrão, porém, o extrato 4LCEM2, pertencente ao gênero *Fusarium sp.*, foi o que apresentou maior sensibilidade contra as cepas testadas, tornando-o um candidato a fármaco promissor.

Os resultados obtidos evidenciaram a extrema necessidade de explorar o potencial biotecnológico da Caatinga. Os compostos bioativos encontrados em microrganismos deste bioma podem ser fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos contra doenças negligenciadas como as leishmanioses, logo, a partir deste trabalho, vê-se a possibilidade de produzir um fármaco com microrganismos isolados de um bioma exclusivamente brasileiro, que seja menos tóxico e mais eficiente.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

- ❖ Informações limitadas sobre extratos de microrganismos da Caatinga com atividade antiparasitária.
- ❖ Como perspectiva, estes extratos precisam ser testados contra as formas amastigotas das duas espécies de *Leishmania* testadas. É necessário também, realizar a caracterização química deles para identificar os seus metabólitos bioativos e testá-los farmacologicamente.

REFERÊNCIAS

AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Bioma caatinga: medicinais. Disponível em: [Link] Acesso em: 23 de outubro de 2022.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.

ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

ASSIS TSM, BRAGA ASC, PEDRAS MJ, BARRAL AMP, SIQUEIRA IC, COSTA CHN et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Jun 2008;17(2):107-16.

ATAYDE, Vanessa Diniz et al., Leishmania exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7-18, 2016.

BARHOUMI, Mourad et al. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 153, 2019.

BEHNEN, M., LESCHCZYK, C., MOLLER, S., BATEL, T., KLINGER, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. (2014) Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. **J. Immunol.** 193, 1954–1965.

BENNETT, John E.; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases. 8. ed. **Elsevier Health Sciences**, 2015.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**. v.68, p.1–13, 2009.

BERMAN, J. Amphotericin B Formulations and Other Drugs for Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V 92(3):471-73. 2015.

BHOSALE, P.; Appl. **Microbiol. Biotechnol.** 2004, 63, 351

BOCH, S.; PRATI, D.; HESSENMO LLER, D.; SCHULZE, E.D.; FISCHER, M. Richness of lichen species, especially of threatened ones, is promoted by management methods furthering stand continuity. **PLOS ONE**, v.8(1), e55461, 2013.

BOCKSTAL, L. V.; HENDRICKX, S.; MAES, L.; CALJON, G. Sand Fly Studies Predict Transmission Potential of Drug-resistant *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 9, 2020. DOI:10.1016/j.pt.2020.06.006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento da Caatinga. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. Caatinga. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico Número Especial Mar. 2021 - Doenças tropicais negligenciadas. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKY, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science** **303**, 1532–1535.

BRITO, S.M.O; et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chem**, v. 186, n. 21, p. 185-191, 2015.

BRONTE, V; ZANOVELLO, P. Regulação das respostas imunes pelo metabolismo da L - arginina **Nat. Rev. Immunol.**, 5 (8) (2005), págs. 641 – 654.

BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman. 13. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2018.

CABRAL G. A. L., SAMPAIO E. V. S. B., ALMEIDA-CORTEZ J. Estrutura Espacial e Biomassa da Parte Aérea em Diferentes Estádios Sucessionais de Caatinga, Santa Terezinha - PB. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, n. 3, p. 566-574, 2013.

CANTALICE, Jeanne Cristina Lapenda Lins. Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *serratia marcescens* ufpeda 398. 2014. 216. f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado, Ufpe, Recife, 2014.

CARVALHO, Luis et al. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4204-4210, 2011.

CAVALCANTE, MZB. DULTRA, DFS. SILVA, HLC. COTTING, JC. SILVA, SDP. SIQUEIRA FILHO, JA. Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. **Comunicata Scientiae** 8(1): 43-58, 2017. DOI: 10.14295/CS. V. 8i1.2649.

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

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CHARLTON, Rebecca L. et al. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 219-236, 2018.

CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**. v.81, p.1-19, 1989.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis, **J. Glob. Infect. Dis.** 2 (2) (2010) 124-126.

COHEN, Joshua P. et al. Progress report on neglected tropical disease drug donation programs. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1193-1204, 2016.

CONAFER. Confederação Nacional de Agricultores Familiares e Empreendedores Familiares Rurais. CONAFER NA CAATINGA: Celebramos hoje o mais brasileiro dos biomas e a região mais ruralizada do país. 2022.

CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: **Editores FIOCRUZ**, 2014, 511 p. ISBN 978-85-7541-568-9.

COSTA, M. M; YANO-MELO, A. M; MELO, N. F; GOUVEIA, G. V; GOUVEIA, J. J. S. Potencial dos micro-organismos da caatinga: uma abordagem molecular. XX ENGENE - ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014.

COURRET, N., FREHEL, C., GOUHIER, N., POUCHELET, M., PRINA, E., ROUX, P., ANTOINE, J. C., Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stage of the parasites, **J. Cell Sci.** 115 (Pt11) (2002) 2303-2316.

DA ROCHA, W.R.V. and others, Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome, **Journal of Applied Microbiology**, Volume 126, Issue 5, 1 May 2019, Pages 1426–1437, <https://doi.org/10.1111/jam.14221>.

DELGADO-BAQUERIZO M, MAESTRE FT, REICH PB, JEFFRIES TC, GAITAN JJ, ENCINAR D, BERDUGO M, CAMPBELL CD, SINGH BK. Microbial diversity drives

multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nat Commun.** 2016 Jan 28;7:10541. doi: 10.1038/ncomms10541. PMID: 26817514; PMCID: PMC4738359.

DIAZ, M. V.; MIRANDA, M. R.; CAMPOS-ESTRADA, C.; REIGADA, C.; MAYA, J. D.; PEREIRA, C. A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.** v 134:1-9. 2014.

DNDI - DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses. Rio de Janeiro: DNDi, 2019b. Disponível em: <https://dndi.org/resources/publications/>.

DOMINGUEZ, M., MORENO, I., AIZPURUA, C., TORANO, A., Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood, **Microbes Infect. / Inst. Pasteur** 5 (6) (2003) 507–513.

DOMINGUEZ, M., MORENO, I., LOPEZ-TRASCASA, M., TORANO, A., Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum, **J. Exp. Med.** 195 (4) (2002) 451–459.

DORLO, Thomas PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.

DRUMOND KO, COSTA FAL. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo. Fev 2011;53(1):3-11.

DUNKELBERGER, Jason R.; SONG, Wen-Chao. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34, 2010.

ELMAHALLAWY, E, K; ABDUSALALAM, A. M. A; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Volume 139, 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Biodiversidade e Bioprospecção de Microrganismos da Caatinga. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/29362/biodiversidade-e-bioprospeccao-de-microrganismos-da-caatinga>> Acesso em: 19 de julho de 2022.

FALEIRO, Rebecca J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

FERNANDES, M.F; QUEIROZ, L.P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciênc Cult**, v. 70, n. 4, p. 51- 56, 2018.

FERREIRA, L. T.; GOMES, A. H. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Genotype characterization *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies

with American cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 257-262, 2015.

FLEIG, Mariana; GRUNINGER, Werner; MAYER, Walter-Erich; HAMPP, Rudiger. Líquens da Floresta com Araucária do Rio Grande do Sul. Pró-Mata: Guia de Campo nº 3, **ediPUCS**. 2008.

FRANCO, Luis H.; BEVERLEY, Stephen M.; ZAMBONI, Dario S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FURBINO, L.E.; GODINHO, V.M.; SANTIAGO, I.F.; PELLIZARI, F.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A.J.; CARVALHO, A.G.O.; GIL, L.H.V.G. ROSA, C.A.; MINNIS, A.M.; ROSA, L.H. Diversity Patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, v.67, p. 775-787, 2014.

GALVIS-OVALLOS, F., SILVA, R., GUSMON, V., SABIO, P., APARECIDA, E., BIANCHI, G. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: **Protozoários** 227 leishmanioses no brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. 2020/06/08. 226. SN - 978-65-86283-13-6.

GARCIA-PICHEL, F.& GAO, Q. Microbial ultraviolet sunscreens. **Reviews Nature/Microbiology**, 9: 791-802, 2011.

GARDA, Adrian Antonio, LION, Marília Bruzzi, LIMA, Sérgio Maia de Queiroz, MESQUITA, Daniel Oliveira, ARAUJO, Helder Farias Pereira de, & NAPOLI, Marcelo Felgueiras. (2018). Os animais vertebrados do Bioma Caatinga. **Ciência e Cultura**, 70(4), 29-34.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review) Applied **Biochemistry and Microbiology**, v. 50, No. 2, pp. 125–134, 2014.

GODINHO, V.M.; VIVIAN N. GONÇALVES, V.N.; SANTIAGO, I.F.; FIGUEREDO, H.M.; VITORELI, G.A.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; ROMANHA, A.J.; KROON, E.G. CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E.; DUKE, S. O.; ABBAS ALI, A.; ROSA, C.A.; ROSA L.H..Diversity and bioprospection of fungal Community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, 2015.

GOMES, J.; GOMES I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. **Extremophiles**, v.4, p. 227-235, 2000.

GONÇALVES, V.N.; VAZ, A.B.M.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v.82, p.459–471, 2012.

GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R., Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Jan 2004; 36(1):71-80.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (1) (2003) 23–35.

GORLACH-LIRA, K. COUTINHO, HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Braz J. Microbiol.* 2007;38(1):135-141.

GUIMARÃES-COSTA, A. B., NASCIMENTO, M. T., FROMENT, G. S., SOARES, R. P., MORGADO, F. N., CONCEIÇÃO-SILVA, F., SARAIVA, E. M. (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6748–6753.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, v.105, ed.12, p. 1422-1432, 2001.

HERWALDT, B. L., Leishmaniasis, *Lancet* 354 (9185) (1999) 1191-1199.

HOFER, U. The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*, v.17, n. 1, p. 3-3, 2019.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ecossistemas brasileiros: Caatinga. 2010. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/caatinga>> Acesso em: 19 de julho de 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/informacoes-ambientais/15842-biomas.html?=&t=acesso-ao-produto>> Acesso em: 19 de julho de 2022.

JAMESON, J. Larry. et al. *Medicina Interna de Harrison*. 20. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2020.

JAWED, Junaid Jibrán; DUTTA, Sayanika; MAJUMDAR, Subrata. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 117, p. 109098, 2019.

JESUS, L. S. de; VIEIRA, T.; CÁCERES, M. E. da S. Riqueza de espécies de líquens crostosos em uma Unidade de conservação em área de Caatinga do alto sertão sergipano. X Congresso de Ecologia do Brasil, 2011, São Lourenço – MG.

JHA, AP., WITKIN, JE., MORRISON, AB et al. O treinamento de mindfulness de forma curta protege contra a degradação da memória de trabalho em intervalos de alta demanda. *J Cogn Aprimoramento* 1, 154–171 (2017).

KAMHAWI S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.* 2000; 2:1765–1773. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01331-9.

KANE, M. M; MOSSER, D. M. Parasitas de *Leishmania* e suas estratégias para interromper a ativação de macrófagos atual Opinião. *Hematol.*, 7 (1) (2000) , pp. 26 – 31.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. *Farmacologia Básica e Clínica*. 13. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2017.

KAVAMURA, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob stress hídrico. 2012. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Esalq/USP, Piracicaba.

KRAMER, Sasha J., SIEGEL, David A., MARITORENA, Stéphane, CATLETT, Dylan. Modeling surface ocean phytoplankton pigments from hyperspectral remote sensing reflectance on global scales, **Remote Sensing of Environment**, v. 270, 2022, 112879, ISSN 0034-4257, <https://doi.org/10.1016/j.rse.2021.112879>.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** 13, 159–175.

KROPF, P., FUENTES, J. M., FAHRNICH, E., ARPA, L., HERATH, S., WEBER, V., SOLER, G., CELADA, A., MODOLELL, M., MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo, **FASEB J.** 19 (8) (2005) 1000–1002.

KUMAR, Awanish; PANDEY, Satish Chandra; SAMANT, Mukesh. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, p. e12727, 2020.

LAUTHIER, Juan José; KORENAGA, Masataka. Immunological and Immunopathological Aspects. In: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. **Springer**, Cham, 2018. p. 107-125.

LEAL IR, SILVA JMC, TABARELLI M, LACHER, TE. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology**. 2005;19(3):701-706.

LIBKIND, D.; SOMMARUGAB, R.; ZAGARESEC, H.; VAN BROOCK, M. *Mycosporines* in carotenogenic yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28p. 749-754, 2005.

LIEW, F. Y., LI, Y., MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine, **Immunology** 71 (4) (1990) 556–559.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; FALCÃO, H.S.; JESUS, N. Z. T.; CABRAL, A. G. S.; GOMES, I. F.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexanephrase of *Combretum duarceanum* Cambess. (Combretaceae). **Journal of Natural Medicines**. v. 67, 2013. p.492–502.

LISBOA, MC. WILTSHIRE, FMS. FRICKS, AT. DARIVA, C. CARRIÈRE, F. LIMA, AS. SOARES, CMF. Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie**, v. 178, p. 96-104, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.002>.

LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D., XIA, B. CD4(+) T cells: differentiation and functions, **Clin. Dev. Immunol.** 2012 (2012), 925135-12.

MACHADO DE LIMA, Náthali, MUÑOZ-ROJAS, Miriam, VÁZQUEZ-CAMPOS, Xabier, BRANCO, Luis Henrique Zanini. Biocrust cyanobacterial composition, diversity, and environmental drivers in two contrasting climatic regions in Brazil, **Geoderma**, v. 386, 2021, 114914, ISSN 0016-7061, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114914>.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; **Brazilian J. Microbiol.** 2007, 38, 65.

MALIK, K., TOKKAS, J., e GOYAL, S. (2012). Pigmentos microbianos: uma revisão. **Int. Microb. Res. Technol.** 361–365.

MASCARENHAS, J.C.; BELTRÃO, B.A. & SOUZA JUNIOR, L.C. 2005. Diagnóstico do Município de Santana do Ipanema. Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água Subterrânea, Estado de Alagoas. Recife, CPRM/PRODEEM.

MAURER, M., DONDI, B., VON STEBUT, E., What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis, **Med. Microbiol. Immunol.** 198 (3) (2009) 137–146.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 2ª Ed. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2008. 647 p.

MELO, IS. MORAES, LAB. QUEIROZ, SC. MENDES, R. FIORE, M. PELIZARE, VH. TAKETANI, R. MELO, S. SOUZA, AO. KAVAMURA, VN. SANTOS, SN. OLIVEIRA, VM. NAKAYAMA, CR. Biodiversidade e Bioprospecção de Microrganismos da Caatinga. **Embrapa Meio Ambiente**, 2014.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Recife, **UFRPE**, 2005, 388 p.

MILLER, M. A., MCGOWAN, S. E., GANTT, K. R., CHAMPION, M., NOVIK, S. L., ANDERSEN, K. A., BACCHI, C. J., YARLETT, N., BRITIGAN, B. E., WILSON, M. E., Indicible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*, **J. Biol. Chem.** **275** (43) (2000) 33883-33889.

MITRA, Amal; MAWSON, Anthony. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MONKI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales Dermatologie et de Vénérologie**. v. 146, n. 3, p. 232-246, 2019. DOI: 10.1016/j.annder.2019.02.002.

MONZOTE, L. 2009 - Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v.1, p.9-19.

MORAES, J. R. E. Pigmentos. 2009. 3p. Medicina Veterinária. FCAVJ/Unesp.

MOSIMANN, Vincent et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: a literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246-250, 2018.

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

MOURA, L. B. Produção Vegetal e Quantificação de Flavonoides e Taninos da Droga Vegetal de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande. 2021.

MULLER, I., Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*, **Eur. J. Immunol.** **22** (12) (1992) 3063-3069.

MURBACK, N. D. N. et al. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 55-68, 2011.

MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2014.

NASH, T.H. III. 2008. Introduction. Pp. 1-8. In: Nash, T.H. III (Ed.) **Lichen Biology 2 ed. Cambridge**, Cambridge University Press.

NATHAN, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182.

NETO, L.G.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO O., *Parasitologia Humana*. 12ª ed. São Paulo: **Atheneu**; 2012.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. n. 13. p. 41-47; 69-90; 399-409. **Atheneu**, 2016.

NOVAIS, F. O., SCOTT, P., CD8+ T Cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bads, and the ugly, **Semin. Immunopathol.** **37** (3) (2016) 251-259.

NYLEN, S., GAUTAM, S., Immunological perspectives of leishmaniasis, **J. Glob. Infect. Dis.** **2** (2) (2010) 135–146.

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. 2011 - Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, 118:87-96.

OLIVEIRA, L.G.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, v. 95, p. 49-54, 2013. DOI: 0.1016/j.jaridenv.2013.03.007

OLIVEIRA, R. S. et al. Clinical, epidemiological and climatic factors related to the occurrence of cutaneous leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Brazilian Journal Of Biology**. 2021. [S.L.], v. 81, n. 3, p. 557-565.

OLIVEIRA, C. B.S; et al. Anti-Toxoplasma Activity of Estragole and Thymol in Murine Models of Congenital and Noncongenital Toxoplasmosis. **J Parasitol**, v. 102, n. 3, p. 369-376, 2016.

OLIVIER, M; ATAYDE, V. D; ISNARD, A; HASSANI, K; SHIO, M. T. Fatores de virulência de *Leishmania*: foco na metaloprotease GP6 *Micróbios Infectam.*, 14 (15) (2012), pp. 1377 – 1389.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: 25 jun. 2022.

PESSENDA, G; SANTANA DA SILVA, J. Arginase e seus mecanismos na persistência de *Leishmania Parasita* **Immunol.**, 42 (2020), pág. 12722.

PIMENTA, P. F.; DE FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C. M.; SECUNDINO F.C. Biology of the 72 *Leishmania* – Sand Fly Interaction. In: EF Rangel, JJ Shaw (Org.). *Brazilian Sand Flies*. 1. ed.: **Springer International Publishing**, 2018: 319-339.

QUEIROZ, M. J. A., ALVES, J. G. B., CORREIA, J. B., Leishmaniose visceral: característica clínico-epidemiológica em crianças de área endêmica. **J. Pediatr.** V. 80, n. 2. Rio de Janeiro. 2004.

RAANAN, H., OREN, N., TREVES, H., KEREN, N., OHAD, I., BERKOWICZ, S. M., & KAPLAN, A. (2016). Towards clarifying what distinguishes cyanobacteria able to resurrect after desiccation from those that cannot: The photosynthetic aspect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1857(6), 715-722.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 219–235, 2006

REGLI Ivo B., PASSELLI Katuska, HURRELL Benjamin P., TACCHINI-COTTIER Fabienne. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. **Frontiers in Immunology**. 8 2017. DOI=10.3389/fimmu.2017.01558. ISSN=1664-3224.

REIMÃO, Juliana Q.; PITA PEDRO, Débora P.; COELHO, Adriano C. The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1-12, 2020

RIBEIRO T, et. al. Learning Delayed Influences of Biological Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2:81; 2014.

RIBEIRO-GOMES, F. L; SACKS, D. (2012) The influence of early neutrophil *Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2, 59.

RICKLIN, Daniel et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785, 2010.

RIFFEL, Raquel; DE OLIVEIRA VAZ, Natália Carolina. Meio Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento: uma abordagem acerca das implicações causadas por um desenvolvimento desequilibrado com enfoque na saúde. **RELAcult-Revista Latino-Americana de Estudos em Cultura e Sociedade**, v. 4, 2018.

ROCHA, AA. ALMEIDA, MF. COELHO, BS. SANTOS, LS. VELOSO, CM. Efeito da adição de óleo de licuri (*Syagrus coronata*) e Tween 80 em filme de amido de araruta (*Maranta arundinacea* L.). **Higiene alimentar**, v.33, n.288/289, p.1400-1404, 2019.

RODRIGO, C. et al. Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 591-598, 2018.

ROMANO A., CARNEIRO M.B.H., DORIA N.A., ROMA E.H., RIBEIRO-GOMES F.L., INBAR E., LEE S.H., MENDEZ J., PAUN A., SACKS D.L., et al. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. **PLoS Pathog.** 2017;13:e1006479. doi: 10.1371/journal.ppat.1006479.

ROMERO, H. D., SILVA, A., SILVA-VERGARA, M. L., RODRIGUES, V., COSTA, R. T., GUIMARÃES S. F., ALECRIM W., MORAES-SOUZA, H., PRATA, A., Comparative study of serologic tests of the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **81** (1) (2010) 27-33.

RODRIGUEZ, N. E., GAUR, U., WILSON, M. E., Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages, **Cell. Microbiol.** **8** (7) (2006) 1106-1120.

ROSAZZA, T; LECOEUR, H; BLISNICK, T; MOYA-NILGES, M; PESCHER, P; BASTIN, P; PRINA, E; SPATH, G. F. A imagem dinâmica revela a exposição da superfície de amastigotas virulentos de *Leishmania* durante a piroptose de macrófagos infectados **J. Cell Sci.**, 134 (5) (2020).

ROSSI, M.; FASEL, N. Como dominar o sistema imunológico do hospedeiro? Os parasitas da *Leishmania* têm as soluções! **Int. Immunol.**, 30 (3) (2018), pp. 103 – 111.

SADLOVA, Jovana et al. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 186, 2013.

SANCHO, L. G. & PINTADO, A. Evidence of high annual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. **Polar Biology**, v.27, p. 312-319, 2004.

SANGSHETTI, J. N.; KHAN, F. A. K.; KULKARNI, A. A.; AROTE, R.; PATIL, R. H. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 32376–32415, 2015.

SANTIAGO, I.F.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; SALES JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperm. *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v.16, p. 95-103, 2011.

SANTOS, W. B. Vegetação lenhosa em altitudes no semiárido pernambucano: estrutura, potencial energético e fatores ambientais. 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SANTOS-EBINUMA, Valéria de Carvalho. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* **DPUA 1275**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-07102013-142544/>.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SHALEV-BENAMI, Moran et al. Atomic resolution snapshot of Leishmania ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

SHARMA, U., SINGH, S., Immunobiology of leishmaniasis, **Indian J. Exp. Biol.** 47 (6) (2009) 412–423.

SILVA TR, TAVARES RSN, CANELA-GARAYOA R, et al. Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. **Mar Biotechnol.** 2019; 21(3): 416-429. doi:10.1007/s10126-019-09892-z.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, 2015, p. 464-468.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drugs targets. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, p. 485-497, 2012.

SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis East Antarctica. **Current Science**, v. 90, p. 1.388-1392, 2006.

SIQUEIRA FILHO, J. A et al. Flora das Caatingas do Rio São Francisco. In: SIQUEIRA FILHO J. A. (org). A Flora das Caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação. Rio de Janeiro: **Andrea Jakobsson Estúdio Editorial**, p. 446-542, 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos da **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, 2004.

SOUZA, N.S., CONCEIÇÃO, H.E.O., SILVA, M.K.F., OLIVEIRA, L.J.S., MAIA, W. J. M., Filho, M.S., 2018. Crescimento e desenvolvimento de plantas jovens de ipê-amarelo

submetidas a diferentes regimes hídricos. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, Fortaleza v. 12 n. 7 p. 3108-3117.

SOUZA BISPO, M. R., MACHADO, J. P. V., ALENCAR, V. J. B., BEZERRA, L. P., RAMOS, R. E. S., & SANTOS, I. G. de A. (2022). A Caracterização epidemiológica e análise espaço-temporal dos casos de leishmaniose visceral e tegumentar em Alagoas, Brasil: Epidemiological characterization and spatiotemporal analysis of visceral and tegumentary leishmaniasis cases in Alagoas, Brazil. **Diversitas Journal**, 7(3).

SOUZA-JÚNIOR, A. C.; GONÇALVES, N. V.; MIRANDA, C. S. C.; SANTOS, B. O.; OLIVEIRA, R. A. C.; COSTA, R. J. F.; NOGUCHI, S. K. T.; OLIVEIRA, J. S. S.; MATSUMURA, E. S. S.; PALÁCIOS, V. R. C. M. Cutaneous leishmaniasis spatial distribution and epidemiological and environmental risk factors in Cametá, state of Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, 2020. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.06.008.

SUNDAR, S., JHA, TK., THAKUR, CP., SINHA, PK., BHATTACHARYA, SK. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med**. 2007 Jun 21;356(25):2571-81. doi: 10.1056/NEJMoa066536. PMID: 17582067.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 43-59, 2015.

SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

TIBÚRCIO, M., YANG A. S. P., YAHATA, K., SUÁREZ-CORTÉS, P., BELDA, H., BAUMGARTEN, S., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., VAN GEMERT, G. J., VAN WAARDENBURG, Y., LEVASHINA, E. A., SAUERWEIN, R. W., TREECK, M. A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the *Plasmodium falciparum* Life Cycle. **mBio**. 2019 Sep 17;10(5):e01170-19. doi: 10.1128/mBio.01170-19. PMID: 31530668; PMCID: PMC6751054.

TIUMAN, T. S.; UEDA, T. N.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V 49:176-182. 2005.

UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

URBAN, C. F., ERMERT, D., SCHMID, M., ABU-ABED, U., GOOSMANN, C., NACKEN, W., BRINKMANN, V., JUNGBLUT, P. R., ZYCHLINSKY, A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathog**. 5, e1000639.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, 32(9): 2429-2436, 2009.

- VALERO, N. N.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology research**, v. 119, n. 365, 2020. DOI: 10.1007/s00436-019-06575-5.
- VASCONCELOS, J. M. et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 8, p. 221-227, 2018.
- VAZ, A. B. M.; ROSA L. H.; VIEIRA, M. L. A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L. R.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; MARIA, VAN B.; ROSA C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective 1 compounds of yeasts isolated in **Antarctica**. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011.
- VENIL, C. K.; DUFOSSÉ, L.; DEVI, P. R. Bacterial Pigments: Sustainable Compounds With Market Potential for Pharma and Food Industry. Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. 2020. Doi. 10.3389/fsufs. 2020.00100.
- VON DER WEID, T; BEEBE, A. M; ROOPENIAN, D. C; COFFMAN, R. L. A produção precoce de IL-4 e a indução de respostas Th2 no linfonodo originam-se de uma população de células T CD4+NK1.1- independente de MHC classe II. **Immunol.**, 157 (10) (1996), pp. 4421-4427.
- VON STEBUT, E., Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity, **Eur. J. Dermatol.** 17 (2) (2007) 115–122.
- WARD DJ, SLADE A, GENUS T, MARTINO OI, STEVENS AJ. How innovative are new drugs launched in the UK? A retrospective study of new drugs listed in the British National Formulary (BNF) 2001–2012. **BMJ** 2014; 4(10): e006235.
- WASUNNA, M. K. et al. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73, 871–876 (2005).
- WEBER, B.; BOWKER, M.; ZHANG, Y. & BELNAP, J. Natural recovery of biological soil crusts after disturbance. In: WEBER, B.; BÜDEL, B.; BELNAP, J.(eds) **Biological Soil Crusts: an organizing principle in drylands**. Springer Switzerland, 2016. 479-498 p.
- WHEELER, Richard J.; GLUENZ, Eva; GULL, Keith. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2017.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.

WHO. Organização Mundial da Saúde, Leishmaniose Fact sheet Details.<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Acessado em 9 de maio de 2020), 2020.

ZHAN, F.; HE, Y.; ZU, Y.; LI, T.; ZHAO, Z. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p.2483–2489, 2011.