

**Prospecção química, avaliação biológica e uso de redes  
moleculares como ferramenta na busca por substâncias  
bioativas de microrganismos marinhos**

**Thaiz Rodrigues Teixeira**

**Ribeirão Preto  
2022**

**THAIZ RODRIGUES TEIXEIRA**

**Prospecção química, avaliação biológica e uso de redes  
moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas  
de microrganismos marinhos**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais  
e Sintéticos

**Orientadora:** Profa. Dra. Hosana Maria  
Debonisi

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências Farmacêuticas no dia 18/05/2022. A versão original encontra-se  
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2022

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

Teixeira, Thaiz Rodrigues

Prospecção química, avaliação biológica e uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas de microrganismos marinhos. Ribeirão Preto, 2022. 221 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Debonsi, Hosana Maria.

1. Produtos naturais marinhos.
2. Substâncias bioativas.
3. Fungo marinho.
4. *Penicillium echinulatum*.
5. Cianobactérias.
6. *Geitlerinema* sp.
7. Cultivo misto.
8. Rede molecular.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Thaiz Rodrigues Teixeira

Título do trabalho: Prospecção química, avaliação biológica e uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas de microrganismos marinhos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais Nivia e Wilson,  
e ao meu marido Rodrigo  
que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, vibrando e compartilhando  
todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS**

Aos meus pais, irmãos e familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim. Obrigada pelo amor e incentivo.

Ao meu marido, Rodrigo, por todo apoio, carinho, atenção e paciência. Obrigada por me encorajar e sempre mostrar que eu sou capaz.

A minha orientadora Profa. Dra. Hosana Maria Deboni pela paciência, atenção e acolhimento. Obrigada pela confiança e oportunidade da realização deste trabalho.

Aos professores colaboradores pela atenção, disponibilidade e conhecimentos compartilhados para enriquecimento deste trabalho.

Aos professores e alunos do grupo NPPNS pela atenção, acolhimento, conselhos, conhecimentos compartilhados e risadas em momentos de descontração.

Aos técnicos e funcionários, Cris, Tomaz, Ludmila, Karina, Dani, Telma (FCFRP) e Vinícius (FFCLRP) por toda atenção, sugestões e disponibilidade em ajudar sempre.

A FCFRP-USP, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela infraestrutura e materiais fornecidos, e aos atenciosos funcionários pela dedicação.

Aos meus colegas de laboratório Ana Carolina, Márcia, Vitor, Mariana, Bianca, Letícia, Beatriz, Verônica, em especial aos meus amigos Gustavo e Karen. Muito obrigada a todos pelas ricas discussões e conhecimentos compartilhados, além de propiciarem um ambiente de trabalho agradável e divertido, que certamente, sentirei saudades.

Aos meus colegas de pós-graduação, Vitor, Péricles, Mário, Leandro, Nathália, Adryane, Valdeline, Jennyfer, Gabriel, Camila, Carla, Renata e Kamila que fizeram parte desse momento sempre me dando muito incentivo e força. Muito obrigada por tornarem essa caminhada mais leve.

To professors Dr. William H. Gerwick and Dr. Lena Gerwick (Scripps – Institute of Oceanography – UCSD) for the incredible opportunity to work with such a competent and welcoming group. Thank you so much for all the knowledge shared.

To my labmates from Prof. Gerwick's Lab, especially Dr. Evgenia, Dr. Nicole, Dr. Hyunwoo, and Sebastian who welcomed me with open arms, contributed a lot to my development in the activities carried out.

To Prof. Dr. Jair L. Siqueira-Neto, Dr. Miriam Giardini and Dr. Elany Barbosa from Skaggs-School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences-UCSD for their collaboration and for having welcomed and received me so well in the laboratory. Thanks for all the knowledge shared.

Aos meus queridos amigos do Brasil, Pâmela e Camila e também dos Estados Unidos, Mirna, Lucas, Thales, Iohan, Arabela, Daniela e Jéssica pelo companheirismo durante o doutorado no Brasil e no estágio sanduíche, vocês tornaram esse momento mais especial e foram muito importantes para toda essa trajetória.

A CAPES (Bolsa de doutorado - PROEX-0487) e ao CNPq (Bolsa no exterior – SWE 203271/2019-0) pelo auxílio financeiro recebido durante todo o doutorado.

***O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.***

*“Nunca desista de um sonho só por causa do tempo que  
você vai levar para realizá-lo.  
O tempo vai passar de qualquer forma.”*

*Earl Nightingale*



## RESUMO

TEIXEIRA, T. R. **Prospecção química, avaliação biológica e uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas de microrganismos marinhos.** 2022. 221f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O ambiente marinho é considerado como uma fonte de produtos naturais bioativos singulares, altamente complexos, os quais são biossintetizados por uma diversidade de macro e microrganismos, muitas vezes via associações entre eles. Neste contexto, os fungos algícolas, aqueles associados a macroalgas e as cianobactérias marinhas destacam-se como fontes promissoras de novas substâncias bioativas. Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho foi realizar a prospecção química e avaliar o potencial biológico do fungo *Penicillium echinulatum* isolado da macroalga antártica *Adenocystis utricularis*. Foram isoladas oito substâncias, identificadas como ciclopenina, ciclopenol, desidrociclopeptina, ciclopeptina, viridicatina e viridicatol, além de um par de diastereoisômeros inéditos. Para os ensaios antiparasitários, viridicatina e viridicatol apresentaram atividade leishmanicida frente a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*, parasita causador da Leishmaniose; apenas viridicatina inibiu a proliferação do parasita *Neospora caninum*, agente etiológico da Neosporose e os metabólitos ciclopenina e desidrociclopeptina foram considerados ativo e moderadamente ativo, respectivamente, contra a cepa multirresistente de *Plasmodium falciparum*, principal parasita que causa Malária. Além disso, as substâncias viridicatina e viridicatol apresentaram potencial fotoprotetor e antioxidante e podem ser considerados uma nova classe de moléculas para fotoproteção. A viridicatina também foi capaz de modular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos. Concomitantemente, foi realizado o cultivo misto entre o fungo marinho *P. echinulatum* e a linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp. CENA 556, onde foi avaliada a interação química entre eles e a atividade larvicida dos extratos brutos obtidos das monoculturas e do cultivo misto contra larvas de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da Dengue. Os resultados demonstraram que houve interação química entre os organismos, visto que foi evidenciado atividade promissora do extrato bruto e de uma das frações obtidas a partir do cultivo misto quando comparados com o extrato e frações da monocultura de *P. echinulatum*. Ainda, a partir dos dados de perfil químico em conjunto com análise da rede molecular obtida foi possível sugerir que a atividade larvicida pode estar relacionada com a substância desidrociclopeptina. Adicionalmente, redes moleculares foram utilizadas para identificar classes de metabólitos com atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (parasita que causa a Doença de Chagas) de uma biblioteca de extratos e frações de cianobactérias pertencentes ao Prof. Dr. William H. Gerwick do Instituto de Oceanografia da Universidade da Califórnia, San Diego (EUA). Cerca de 2.800 amostras tiveram atividade tripanocida avaliada e dentre estas, dez frações apresentaram inibição do crescimento do parasita *T. cruzi*. A partir do estudo químico dessas frações mais ativas foi possível observar que os ácidos graxos e seus derivados foi a principal classe de substâncias relacionada com a atividade antiparasitária. Além disso, por meio da análise dos dados da rede molecular foram identificadas cinco substâncias conhecidas, como vatiamida C, curacina D, viequeamida A, aeruciclâmida A e formidolida, além de *clusters* de moléculas desconhecidas que podem ser inéditas e bioativas. Os resultados deste trabalho acrescentam dados químicos e biológicos para as espécies estudadas, enriquecendo a área de química de produtos naturais marinhos.

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos, Substâncias bioativas, Fungo marinho, *Penicillium echinulatum*, Cianobactérias, *Geitlerinema* sp., Cultivo misto, Rede molecular

## ABSTRACT

TEIXEIRA, T. R. **Chemical prospecting, biological evaluation and use of molecular networking as tool for searching bioactive compounds in marine microorganisms.** 2022. 221p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The marine environment is considered as unique, highly complex, bioactive natural products source, which are biosynthesized by a diversity of macro- and microorganisms, often via associations between them. In this context, algicolous fungi, those associated with macroalgae and marine cyanobacteria stand out as promising sources of new bioactive compounds. Thus, one of the objectives of this work was to perform a chemical prospecting and evaluate the biological potential of the fungus *Penicillium echinulatum* isolated from the Antarctic macroalgae *Adenocystis utricularis*. Eight compounds were isolated, identified as cyclophenin, cyclophenol, dehydrocyclopeptin, cyclopeptin, viridicatin, and viridicatol, in addition to a pair of novel diastereomers. For the antiparasitic assays, viridicatin and viridicatol showed leishmanicidal activity against the amastigote form of *Leishmania amazonensis*, the parasite that causes Leishmaniasis; only viridicatin inhibited the proliferation of the parasite *Neospora caninum*, the etiologic agent of Neosporosis, and the metabolites cyclophenine and dehydrocyclopeptin were considered active and moderately active, respectively, against the multidrug-resistant strain of *Plasmodium falciparum*, the main parasite that causes Malaria. In addition, viridicatin and viridicatol showed photoprotective and antioxidant potential and can be considered a new class of molecules for photoprotection. Viridicatin was also able to modulate the production of reactive oxygen species (ROS) by human neutrophils. Simultaneously, a mixed culture between the marine fungus *P. echinulatum* and the cyanobacterial strain *Geitlerinema* sp. CENA 556 was performed. The chemical interaction between them and the larvicidal activity of crude extracts obtained from monocultures and mixed cultures were evaluated against *Aedes aegypti* larvae, the mosquito that transmits Dengue. The results showed that there was chemical interaction between the organisms, since it was evidenced promising activity of the crude extract and of one of the fractions obtained from the mixed culture when compared with the extract and fractions of the monoculture of *P. echinulatum*. Furthermore, from the chemical profile data together with the molecular networking analysis obtained, it was possible to suggest that the larvicidal activity may be related to the compound dehydrocyclopeptin. Additionally, molecular networking analysis were used to identify classes of metabolites with antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* (the parasite that causes Chagas Disease) from a library of cyanobacterial extracts and fractions belonging to Prof. Dr. William H. Gerwick of the Institute of Oceanography at the University of California, San Diego (USA). About 2,800 samples had trypanocidal activity evaluated, and among these, ten fractions showed inhibition of *T. cruzi* parasite growth. From the chemical study of these more active fractions, it was possible to observe that fatty acids and their derivatives was the main class of compounds related to antiparasitic activity. In addition, through the analysis of the molecular networking data, five known compounds were identified, such as vatiamide C, curacin D, viequeamide A, aerucyclamide A and formidolide, in addition to clusters of unknown molecules that may be novel and bioactive. The results of this work provide chemical and biological information about species studied, enriching the area of chemistry of marine natural products.

Keywords: Marine natural products, Bioactive compounds, Marine fungus, *Penicillium echinulatum*, Cyanobacteria, *Geitlerinema* sp., Mixed culture, Molecular Networking

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografia da macroalga antártica <i>Adenocystis</i> sp. (A) e <i>A. utricularis</i> (B). Barra representa 1 cm.....	07
<b>Figura 2.</b> Substâncias isoladas de fungos do gênero <i>Penicillium</i> com propriedades farmacêuticas e micotoxinas.....	10
<b>Figura 3.</b> Proposta de rota biossintética para formação da viridicatina e viridicatol (ZHANG et al., 2022).....	12
<b>Figura 4.</b> Antimaláricos mefloquina e candidato artefenomel.....	15
<b>Figura 5.</b> Medicamentos utilizados para tratamento da leishmania.....	17
<b>Figura 6.</b> Medicamentos utilizados para tratamento da malária.....	19
<b>Figura 7.</b> Medicamentos que estão sendo redirecionados para tratamento da Neosporose.....	20
<b>Figura 8.</b> Substâncias comumente utilizadas como filtros solares.....	22
<b>Figura 9.</b> Local de coleta da macroalga <i>Adenocystis utricularis</i> na Península Antártica (a); Arquipélago Shetland do Sul (b). Adaptação de mapas de Simões et al. (2004); Muñoz et al. (2011); Teixeira et al., (2019a); Visualizador de Mapas de Banco de Dados Antárticos Digitais - SCAR ( <a href="https://www.add.scaPlar.org/">https://www.add.scaPlar.org/</a> , acessado em março de 2022).....	28
<b>Figura 10.</b> Esquema de cultivo e obtenção dos extratos brutos do fungo <i>P. echinulatum</i> .....	31
<b>Figura 11.</b> Fluxograma representando o fracionamento e isolamento dos metabólitos do fungo <i>P. echinulatum</i> cultivado em meio CBD (EB CBD).....	32
<b>Figura 12.</b> Morfologia externa (A) e fotomicrografia do fungo (B); Morfologia externa (C) e fotomicrografia do fungo <i>Penicillium echinulatum</i> (D) ambos isolados da macroalga <i>A. utricularis</i> .....	46
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico em CCDC dos extratos brutos EB Czapek controle (1) e EB Czapek (2), EB CBD controle (3) e EB CBD (4). Eluente: n-hexano:acetato de etila (6:4). Reveladores: A) Luz UV 254 nm; B) Iodo	

ressublimado; C) Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato bruto EB CBD controle (azul claro) e EB CBD (azul escuro) em 254 nm; D) Ampliação do cromatograma na região entre 10 e 25 minutos.....	48
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico das frações CLV E (A), F (B), G (C), H (D) e I (E) obtidos por CLAE-DAD em 225 nm.....	51
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa das subfrações CLV E3-4 (A) e CLV E6-20 (B) em 275 nm	53
<b>Figura 16.</b> Estruturas químicas da ciclopenina, desidrociclopeptina e viridicatina.....	53
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa da fração CLV F em 225 nm (A). Espectros de absorção no UV do ciclopenol – $t_R$ : 7,84 min. (B), da ciclopenina - $t_R$ : 14,78 min. (C), do viridicatol - $t_R$ : 18,73 min. (D), da ciclopeptina - $t_R$ : 21,08 min. (E), da viridicatina - $t_R$ : 18,73 min. (F) e do pico 6 - $t_R$ : 31,98 min. (G).....	58
<b>Figura 18.</b> Estruturas químicas do ciclopenol, viridicatol e ciclopeptina.....	59
<b>Figura 19.</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa da fração CLV H em 225 nm (A). Espectros de absorção no UV do pico 1 – $t_R$ : 20,83 min. (B), do pico 2 - $t_R$ : 22,44 min. (C), do viridicatol - $t_R$ : 25,66 min. (D) e da viridicatina - $t_R$ : 29,21 min. (E).....	63
<b>Figura 20.</b> Propostas estruturais das substâncias CLV H p1 e p2.....	63
<b>Figura 21.</b> Correlações de COSY $^1H$ - $^1H$ e HMBC das substâncias CLV H p1 e p2.....	65
<b>Figura 22.</b> A) Espectros de varredura dos extratos brutos (EB CBD e EB Czapek) e seus controles (C EB CBD e C EB Czapek), sendo: EB BDC (linha azul), controle EB BDC (linha azul pontilhada), EB Czapek (linha vermelha) e controle EB Czapek (linha vermelha pontilhada); B) Espectros de varredura das frações obtidas por CLV (CLV C-I); C) Espectro de varredura da viridicatina e do viridicatol.....	73
<b>Figura 23.</b> A) Ensaio de fotoestabilidade do extrato bruto EB CBD; B) da fração CLV E; C) da viridicatina e; D) do viridicatol. Amostras irradiadas (linhas azuis) e amostras não irradiadas (linhas vermelhas).....	74

- Figura 24.** Quantificação de ERO intracelular induzidos por radiação UVA em células HaCaT, resultados expressos em % de fluorescência. As células foram não-tratadas irradiadas (NT + UV) ou não-irradiadas (NT – UV) e; pré-tratadas com: quercetina (Q: 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), norfloxacina (N: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), extrato bruto EB CBD, fração CLV E, viridicatina e viridicatol (10; 5 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferente do grupo NT + UV (p < 0,05)..... 80
- Figura 25.** Quantificação de ERO intracelular induzidos por radiação UVA em modelo de pele reconstituída (3D), resultados expressos em % de pixels/área de intensidade de fluorescência. Os modelos de pele foram pré-tratados com: óleo de gergelim como controle do veículo (Óleo +UV), viridicatina (VD +UV) e viridicatol (VL +UV) a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em óleo de gergelim ou não tratadas para os controles +UV (NT +UV) e -UV (NT -UV). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média em triplicata, em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo NT +UV (p < 0,05)..... 81
- Figura 26.** Avaliação do efeito do extrato bruto EB CBD na produção de ERO pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média em triplicata, em três experimentos independentes. Controle negativo: neutrófilos e controle positivo: neutrófilos + PMA. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle positivo (p < 0,05)..... 83
- Figura 27.** Avaliação do efeito das frações CLVAB-I (A) e das substâncias viridicatina e viridicatol (B) na produção de ERO pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos. Controle negativo: neutrófilos e controle positivo: neutrófilos + PMA. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle positivo (p < 0,05)..... 83

<b>Figura 28.</b> Curva de sobrevivência das larvas <i>Galleria mellonella</i> após inoculação de diferentes concentrações das substâncias viridicatina (A) e viridicatol (B).....	88
<b>Figura 29.</b> Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com atividade citotóxica.....	94
<b>Figura 30.</b> Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com atividades neuromoduladora e anti-infecciosa.....	95
<b>Figura 31.</b> Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas que apresentaram resultados promissores em estudos clínicos de fase II ou III..	95
<b>Figura 32.</b> Fotomicrografia da linhagem de cianobactéria CENA 556 <i>Geitlerinema</i> sp. isolada do perifíton no litoral brasileiro. Barra representa 20 µm.....	97
<b>Figura 33.</b> Substâncias isoladas de cianobactérias do gênero <i>Geitlerinema</i> .....	97
<b>Figura 34.</b> Esquema de cultivo misto entre a cianobactéria CENA 556 <i>Geitlerinema</i> sp. e o fungo marinho <i>P. echinulatum</i> e obtenção do extrato bruto.....	106
<b>Figura 35.</b> Fluxograma representando o fracionamento do extrato bruto EB co CENA 556 + PENE.....	106
<b>Figura 36.</b> Cromatogramas de pico base dos extratos brutos EB CENA 556 (A, verde), EB CBD (B, amarelo) e EB co CENA + PENE (C, roxo) em modo de ionização positivo.....	112
<b>Figura 37.</b> Cromatogramas de pico base do extrato bruto EB CBD (A, amarelo) e das frações EB CBD_CLV E (B, vermelho) e EB co CENA + PENE_CLV E (C, azul) em modo de ionização positivo.....	113
<b>Figura 38.</b> Rede molecular dos extratos brutos e frações analisados por CL-EM/EM em modo de ionização positivo. Os nodos representam as substâncias detectadas e estão coloridos de acordo com o tipo de amostra. Os traços entre os nodos representam a semelhança estrutural molecular entre as substâncias e os nodos sem correspondência espectral com outras substâncias da biblioteca do GNPS estão representados como <i>self-loops</i> .....	116

<b>Figura 39.</b> Esquema representando a formação da rede molecular a partir de espectros EM/EM na plataforma GNPS.....	122
<b>Figura 40.</b> Medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.....	124
<b>Figura 41.</b> Gráfico de dispersão demonstrando os resultados de inibição do crescimento in vitro de <i>T. cruzi</i> (atividade antiparasitária normalizada %) e citotoxicidade (viabilidade celular – C2C12 normalizada %) de extratos e frações da biblioteca avaliada.....	131
<b>Figura 42.</b> Cromatogramas de pico base das frações 1927A (A), 1927B (B), A2142F (C), A2142G (D), 1704A (E), A2141E (F), 1646F (G) e A2143B (H) em modo de ionização positivo.....	133
<b>Figura 43.</b> Rede molecular das frações mais ativas frente ao parasita <i>T. cruzi</i> analisadas por CL-EM/EM em modo de ionização positivo. Os nodos representam as substâncias detectadas e estão coloridos de acordo com o tipo de amostra e o tamanho representa a abundância relativa do íon precursor. Os traços representam o grau de similaridade entre os nodos e os nodos sem correspondência espectral na biblioteca do GNPS estão representados como <i>self-loops</i> .....	136
<b>Figura 44.</b> Substâncias anotadas para as amostras analisadas na plataforma GNPS.....	138

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Gradientes de solventes utilizados para análise das frações CLV E3-4, CLV E6-20, CLV F e CLV H.....	34
<b>Tabela 2.</b> Tempo de retenção e absorção no UV dos picos observados no cromatograma do EB CBD do fungo <i>P. echinulatum</i> .....	48
<b>Tabela 3.</b> Massa, cor e aspecto das frações obtidas após submissão do EB CBD à cromatografia líquida a vácuo (CLV).....	49
<b>Tabela 4.</b> Substâncias identificadas nas frações CLV AB, C e D do fungo <i>P. echinulatum</i> por análises de CG-EM.....	50
<b>Tabela 5.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ ciclopenina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) comparados com dados na literatura (DMSO- $d_6$ , 150 MHz para $^{13}\text{C}$ e 600 MHz para $^1\text{H}$ ).....	54
<b>Tabela 6.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ da desidrociclopeptina (CD $_3$ OD, 500 MHz) comparados com dados da literatura (CD $_3$ OD, 100 MHz para $^{13}\text{C}$ e 400 MHz para $^1\text{H}$ ).....	56
<b>Tabela 7.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ da viridicatina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	57
<b>Tabela 8.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ do ciclopenol (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 150 MHz para $^{13}\text{C}$ e 600 MHz para $^1\text{H}$ ).....	59
<b>Tabela 9.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ do viridicatosol (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 600 MHz).....	61
<b>Tabela 10.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ dos confórmeros da ciclopeptina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) comparados com dados da literatura (CDCl $_3$ , 500 MHz).....	62
<b>Tabela 11.</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ , COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMBC de CLV H p1 e p2 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	66
<b>Tabela 12.</b> Ensaio da atividade leishmanicida dos extratos brutos (EB CBD e EB Czapek) e frações CLV frente à forma promastigota de <i>L. amazonensis</i> .....	69



<b>Tabela 13.</b> Ensaio da atividade leishmanicida das substâncias isoladas da fração CLV E frente às formas promastigota e amastigota de <i>L. amazonensis</i> .....	69
<b>Tabela 14.</b> Inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> das amostras avaliadas.....	71
<b>Tabela 15.</b> Concentração inibitória 50 % (CI <sub>50</sub> ) <i>in vitro</i> frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i> .....	71
<b>Tabela 16.</b> Ensaio da atividade anti- <i>Neospora</i> do extrato bruto, frações CLV e substâncias isoladas frente ao parasita <i>Neospora caninum</i> .....	72
<b>Tabela 17.</b> Porcentagem relativa (%) da área sob a curva da amostra irradiada em relação a não irradiada (100%) na região do UVA e UVB do extrato bruto EB CBD, fração CLV E e das substâncias viridicatina e viridicatol.....	75
<b>Tabela 18.</b> Ensaio de fototoxicidade em cultura de fibroblastos 3T3 expressos em MPE em dois experimentos independentes (n= 2).....	76
<b>Tabela 19.</b> Ensaio de fototoxicidade em modelo de pele humana reconstituída 3D.....	77
<b>Tabela 20.</b> Ensaio de fotorreatividade das soluções teste contendo as substâncias viridicatina e viridicatol. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média.....	78
<b>Tabela 21.</b> Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos EB CBD e EB Czapek e seus controles.....	86
<b>Tabela 22.</b> Resultados da atividade antimicrobiana das frações CLVAB-I frente ao microrganismo <i>P. mirabilis</i> ATCC 29906.....	87
<b>Tabela 23.</b> Gradiente de solventes utilizado para análise em CLAE-DAD-IES-EM.....	108
<b>Tabela 24.</b> Resultados do ensaio larvicida (taxa de mortalidade) dos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD, EB co CENA + PENE (250 µg mL <sup>-1</sup> ), frações (125 µg mL <sup>-1</sup> ) e substâncias isoladas: ciclopenina e viridicatina (25 µg mL <sup>-1</sup> ) contra <i>A. aegypti</i> após exposição de 24, 48 e 72 horas.....	110
<b>Tabela 25.</b> Massa, cor e aspecto das frações obtidas após submissão do EB co CENA + PENE à cromatografia líquida a vácuo (CLV).....	111
<b>Tabela 26.</b> Metabólitos identificados nos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD e EB co CENA + PENE por CLAE-DAD-IES-EM em modo de ionização positivo.....	117

<b>Tabela 27.</b> Códigos e dados das frações selecionadas pertencentes a biblioteca do Prof. William H. Gerwick – Scripps-SIO-UCSD.....	130
<b>Tabela 28.</b> Resultados de atividade antiparasitária (porcentagem de inibição do crescimento do parasita <i>T. cruzi</i> ), viabilidade celular (C2C12) e massa remanescente das frações mais ativas da biblioteca de extratos e frações de cianobactérias do Prof. William Gerwick.....	132

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
L	litro
3T3 NRU PU	ensaio de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
AcOEt	acetato de etila
ANOVA	análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cm	centímetro
CC <sub>50</sub>	concentração citotóxica 50%
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodo
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometro de massas
CCDC	cromatografia em camada celgada comparativa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massas
CLV	cromatografia líquida à vácuo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CI <sub>50</sub>	concentração inibitória 50%
d	duplete
dd	duplo-duplete
ddd	duplo-duplo-duplete
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'- acetato de diclorodesidrofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido

ERO	espécies reativas de oxigênio
EM/EM	fragmentação em espectrometria de massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hx	hexano
Hz	hertz
J	joules
kJ	kilojoules
IV	infravermelho
m	multiplete
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
<i>m/z</i>	razão massa-carga
MHz	megahertz
MeOH	metanol
min	minuto
MPE	fotoefeito médio
mW	miliwatts

nm	nanômetro
NT	controle não tratado
NT - UV	controle não tratado não irradiado
NT + UV	controle não tratado irradiado
OEDC	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
pHL	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
Rf	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
s	simpleto
t	triplete
td	triplo-dupleto
tt	triplo-triplete
$t_R$	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
VIS	luz visível
W	watts

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1. 1 O potencial biológico e farmacológico de organismos marinhos.....	1
1. 2 Apresentação do trabalho.....	3
2. CAPÍTULO I - Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo <i>Penicillium echinulatum</i> associado a macroalga antártica <i>Adenocystis utricularis</i> .....	5
2. 1 INTRODUÇÃO.....	5
2. 1. 1 O Continente Antártico.....	5
2. 1. 2 A macroalga Antártica <i>Adenocystis utricularis</i> .....	7
2. 1. 3 O gênero <i>Penicillium</i> e seus metabólitos bioativos.....	9
2. 1. 4 Potencial biológico de fungos associados a macroalgas antárticas.....	13
2. 1. 5 Atividades biológicas avaliadas.....	15
2. 1. 5. 1 Atividades antiparasitárias.....	15
2. 1. 5. 1. 1 Leishmaniose.....	16
2. 1. 5. 1. 2 Malária.....	18
2. 1. 5. 1. 3 Neosporose.....	19
2. 1. 5. 2 Atividade fotoprotetora.....	20
2. 1. 5. 3 Atividade imunomoduladora.....	22
2. 1. 5. 4 Atividade antimicrobiana.....	23
2. 2 OBJETIVOS.....	25
2. 2. 1 Objetivo geral.....	25
2. 2. 2 Objetivos específicos.....	25
2. 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26

2. 3. 1 Material e equipamentos.....	26
2. 3. 2 Coleta da macroalga antártica <i>Adenocystis utricularis</i> (Bory) Skottsberg.....	28
2. 3. 3 Isolamento e identificação dos fungos associados à macroalgas antárticas.....	29
2. 3. 4 Cultivo e obtenção dos extratos brutos do fungo <i>Penicillium echinulatum</i> .....	30
2. 3. 5 Fracionamento e isolamento dos metabólitos do fungo <i>P. echinulatum</i> .....	31
2. 3. 6 Avaliação das atividades biológicas.....	34
2. 3. 6. 1 Atividade leishmanicida.....	34
2. 3. 6. 2 Atividade antimalárica.....	36
2. 3. 6. 3 Atividade anti- <i>Neospora</i> .....	37
2. 3. 6. 4 Atividade fotoprotetora.....	38
2. 3. 6. 4. 1 Determinação do espectro de absorção no UV-VIS e do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ).....	38
2. 3. 6. 4. 2 Avaliação da fotoestabilidade.....	39
2. 3. 6. 4. 3 Avaliação da fototoxicidade.....	39
2. 3. 6. 4. 4 Avaliação da fotorreatividade.....	40
2. 3. 6. 4. 5 Ensaio de quantificação de ERO intracelulares induzida por radiação UVA.....	41
2. 3. 6. 5 Atividade imunomoduladora.....	42
2. 3. 6. 6 Atividade antimicrobiana.....	43
2. 3. 6. 7 Avaliação da toxicidade.....	44
<b>2. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>2. 4. 1 Identificação dos fungos associados à macroalga <i>A. utricularis</i></b> .....	46
<b>2. 4. 2 Perfil químico do fungo <i>P. echinulatum</i></b> .....	47
2. 4. 2. 1 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV E.....	52
2. 4. 2. 1. 1 Caracterização química da ciclopenina.....	54
2. 4. 2. 1. 2 Caracterização química da desidrociclopeptina.....	55
2. 4. 2. 1. 3 Caracterização química da viridicatina.....	56

2. 4. 2. 2 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV F.....	58
2. 4. 2. 2. 1 Caracterização química do ciclopenol.....	59
2. 4. 2. 2. 2 Caracterização química do viridicatol.....	60
2. 4. 2. 2. 3 Caracterização química da ciclopeptina.....	61
2. 4. 2. 3 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV H.....	62
2. 4. 2. 3. 1 Elucidação estrutural das substâncias CLV H p1 e p2.....	64
<b>2. 4. 3 Avaliação das atividades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas do fungo <i>P. echinulatum</i>.....</b>	<b>67</b>
2. 4. 3. 1 Atividade leishmanicida.....	67
2. 4. 3. 2 Atividade antimalárica.....	70
2. 4. 3. 3 Atividade anti- <i>Neospora</i> .....	71
2. 4. 3. 4 Atividade fotoprotetora.....	72
2. 4. 3. 4. 1 Determinação do espectro de absorção no UV e do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ).....	72
2. 4. 3. 4. 2 Avaliação da fotoestabilidade.....	74
2. 4. 3. 4. 3 Avaliação da fototoxicidade.....	75
2. 4. 3. 4. 4 Avaliação da fotorreatividade.....	78
2. 4. 3. 4. 5 Ensaio de quantificação de ERO intracelulares induzida por radiação UVA.....	79
2. 4. 3. 5 Atividade imunomoduladora.....	82
2. 4. 3. 6 Atividade antimicrobiana.....	84
2. 4. 3. 7 Avaliação da toxicidade.....	87
<b>2. 5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>3. CAPÍTULO II - Avaliação da interação química do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 <i>Geitlerinema</i> sp. com o fungo marinho <i>Penicillium echinulatum</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>3. 1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>3. 1. 1 Cianobactérias marinhas.....</b>	<b>92</b>
3. 1. 1. 1 O gênero <i>Geitlerinema</i> .....	96
<b>3. 1. 2 Cultivo misto entre cianobactérias e fungos.....</b>	<b>98</b>



3. 1. 3 Dengue .....	99
3. 2 OBJETIVOS.....	102
3. 2. 1 Objetivo geral.....	102
3. 2. 2 Objetivos específicos.....	102
3. 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	103
3. 3. 1 Material e equipamentos.....	103
3. 3. 2 Manutenção, cultivo e obtenção do extrato bruto da linhagem de cianobactéria CENA 556 <i>Geitlerinema</i> sp.....	104
3. 3. 3 Cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 <i>Geitlerinema</i> sp. e o fungo marinho <i>P. echinulatum</i> .....	105
3. 3. 4 Obtenção do extrato bruto e fracionamento do cultivo misto.....	105
3. 3. 5 Atividade larvicida ( <i>Aedes aegypti</i> ).....	106
3. 3. 6 Avaliação do perfil químico por CLAE-DAD-IES-EM do extrato bruto obtido por cultivo misto e construção da rede molecular.....	107
3. 4 RESULTADOS E DICUSSÃO.....	109
3. 4. 1 Avaliação da atividade larvicida ( <i>Aedes aegypti</i> ).....	109
3. 4. 2 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD e EB co-cultivo CENA 556 + <i>Penicillium</i> (EB co CENA + PENE).....	111
3. 5 CONCLUSÕES.....	118
4. CAPÍTULO III - Uso de redes moleculares ( <i>Molecular networking</i> ) na busca de substâncias antiparasitárias ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) em cianobactérias.....	121
4. 1 INTRODUÇÃO.....	121
4. 1. 1 Uso de redes moleculares ( <i>Molecular Networking</i> ) na investigação de produtos naturais bioativos.....	121
4. 1. 2 Doença de Chagas.....	123
4. 2 OBJETIVOS.....	126
4. 2. 1 Objetivo geral.....	126
4. 2. 2 Objetivos específicos.....	126
4. 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	127
4. 3. 1 Material e equipamentos.....	127
4. 3. 2 Coleção de extratos de cianobactérias marinhas.....	127

<b>4. 3. 3 Avaliação da atividade antiparasitária (<i>Trypanosoma cruzi</i>).....</b>	<b>128</b>
<b>4. 3. 4 Obtenção das redes moleculares e estudo químico das frações bioativas.....</b>	<b>129</b>
<b>4. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>4. 4. 1 Avaliação da atividade antiparasitária (<i>Trypanosoma cruzi</i>).....</b>	<b>131</b>
<b>4. 4. 2 Rede molecular e estudo químico das frações bioativas.....</b>	<b>132</b>
<b>4. 5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXOS E APÊNDICES.....</b>	<b>172</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O potencial biológico e farmacológico de organismos marinhos

Os produtos naturais e suas estruturas moleculares desempenham um papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Aproximadamente dois terços de todas as pequenas moléculas aprovadas como medicamentos de janeiro de 1981 a setembro de 2019 tiveram suas origens nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Os organismos marinhos podem ser considerados uma fonte mais recente de produtos naturais bioativos em relação às plantas terrestres e microrganismos não marinhos. Isso porque a exploração desse ambiente dependia principalmente do desenvolvimento de técnicas para coleta de amostras, como por exemplo mergulho e exploração em alto mar. Além disso, com o progresso de técnicas de separação de misturas complexas (por exemplo, CLAE) e de determinação estrutural (principalmente de RMN, cristalografia de raios X e espectrometria de massas), a química de produtos naturais marinhos desenvolveu-se gradualmente e atraiu a atenção de pesquisadores e indústrias de medicamentos, cosméticos, agroquímicas e nutracêuticas (OLSEN et al., 2016; BLUNT et al., 2018; JIMÉNEZ, 2018). Mais de 32.000 produtos naturais marinhos foram descobertos desde o primeiro relato em 1950 da espongotimidina, uma substância biologicamente ativa. Desde então, a descoberta de medicamentos marinhos inovadores tornou-se um ponto de acesso na pesquisa e desenvolvimento global de medicamentos (LYU et al., 2021; GHAREEB et al., 2020).

A aprovação do primeiro fármaco para comercialização ocorreu em 2004 e foi isolado de um caracol marinho, seu componente químico é denominado  $\omega$ -conotoxina MVIIA e seu nome comercial Prialt®; este medicamento é utilizado no tratamento da dor severa (JIMÉNEZ, 2018). Posteriormente, novos fármacos foram aprovados, dentre eles os derivados sintéticos de produtos naturais marinhos com atividade antitumoral, como a citarabina (Cytosar-U® e Depocyt®), trabectedina (Yondelis®), mesilato de eribulina (Halaven®), plitidepsin (Aplidin®), além do antiviral vidarabina (Vira-A®), do inibidor do proteossoma, bortezomibe (Velcade®), do brentuximab vedotin (Adcetris®) indicado para o tratamento de pacientes adultos com linfoma de Hodgkin e dos ésteres de ômega-3 (Lovaza® e Epanova®) e de eicosapentaenoico

(Vascepa®) que atuam como reguladores da hipertrigliceridemia (JIMÉNEZ, 2018; GHAREEB et al., 2020).

Diversas substâncias derivadas do mar têm apresentado resultados promissores em estudos pré-clínicos e têm sido promovidos a preliminares clínicos ou mesmo confirmados por órgãos reguladores. O número de medicamentos de origem marinha aprovados recentemente continuará aumentando, pois existem 25 substâncias derivadas do mar em fases de testes clínicos (Fase III, Fase II e Fase I de desenvolvimento clínico); a partir de dezembro de 2018: seis compostos derivados do mar estavam na Fase III, dez compostos na Fase II e pelo menos nove compostos na Fase I incluindo pliditepsina (Aplidin®), PM00104 (Zalypsis®), kahalalide F, hemiasterlin (E7974), spisulosine (ES-285), pseudopterosin A, marizomib (Salinosporamida A; NPI-0052), tetrodotoxina (TTX) e Neovastat® (AE-941) para tratamentos de câncer, bem como conotoxina G (CGX-1160), IPL-576092, DMXBA (GTS-21), briostatina 1 e plinabulina (NPI-2358) para o tratamento da dor, anti-inflamatório, tratamento de Alzheimer, cicatrização de feridas e esquizofrenia, respectivamente (CELSO et al., 2018; GHAREEB et al., 2020).

Embora os invertebrados marinhos tenham sido a fonte da maioria dos produtos naturais marinhos bioativos, como esponjas e o filo *Cnidaria*, a verdadeira origem da maioria dessas substâncias parece ser proveniente dos microrganismos que vivem em simbiose com seus hospedeiros invertebrados. Esses organismos necessitam de um complexo arsenal de metabólitos produzidos por microrganismos simbióticos para auxiliar nas suas defesas naturais. Os filos *Ascomycota* e *Actinobacteria* estão entre os quatro mais descritos, juntamente com *Porifera* e *Cnidaria*, durante os últimos anos (BLUNT et al., 2018).

De acordo com Jiménez (2018), as substâncias derivadas de microrganismos quase certamente dominarão o campo produtos naturais marinhos nos próximos anos devido a diversidade de metabólitos, a relativa facilidade de coleta e cultivo, e as tecnologias avançadas para extração de seu material genômico e manipulação em sistemas heterólogos.

Portanto, considerando a rica biodiversidade presente dos mares e oceanos, o potencial dos produtos naturais marinhos na descoberta de medicamentos é inestimável.

## 1. 2 Apresentação do trabalho

Esta tese de doutorado foi dividida em três capítulos, sendo os capítulos I e II referentes à pesquisa realizada no Brasil e o capítulo III à pesquisa desenvolvida durante o estágio no exterior (Scripps – Institute of Oceanography, UCSD, EUA).

O capítulo I descreve o estudo químico e o potencial biológico do fungo marinho *Penicillium echinulatum* isolado da macroalga antártica *Adenocystis utriculares*. A partir do desenvolvimento deste primeiro capítulo foi possível publicar o artigo intitulado “In Vitro Evaluation of the Photoprotective Potential of Quinolinic Alkaloids Isolated from the Antarctic Marine Fungus *Penicillium echinulatum* for Topical Use” no periódico *Marine Biotechnology*, além do depósito de uma patente intitulada “Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e doenças parasitárias” no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Brasil.

No capítulo II foi descrita a investigação química e avaliação da atividade larvicida do cultivo misto entre o fungo *P. echinulatum* e a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp., previamente estudada no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho-NPPNS.

O capítulo III apresenta os dados obtidos durante o estágio-sanduíche (número do processo 203271/2019-0, Edital nº 08/2019, CNPq) realizado no período de agosto de 2021 a fevereiro de 2022, no laboratório do Prof. Dr. William H. Gerwick (Scripps Institute of Oceanography, University of California, San Diego, USA), onde toda a biblioteca de extratos e frações do laboratório (~ 2.800 amostras) foi avaliada frente ao parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Neste trabalho foram utilizadas ferramentas para construção de redes moleculares e desreplicação de amostras químicas, como o *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e *High Throughput Screening* (HTS) para avaliação de forma rápida e eficiência de um grande número de amostras em ensaios biológicos.

## **CAPÍTULO I**

**Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo  
*Penicillium echinulatum* associado a macroalga antártica  
*Adenocystis utricularis***

## **2. CAPITULO I - Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo *Penicillium echinulatum* associado a macroalga antártica *Adenocystis utricularis***

### **2. 1 INTRODUÇÃO**

#### **2. 1. 1 O Continente Antártico**

A Antártica é o continente mais meridional do planeta, localizado quase inteiramente dentro do Círculo Polar Antártico. Isolada dos demais continentes por correntes oceanográficas e pela distância, a Antártica é um ambiente que se caracteriza por extremos de clima, habitats e biogeografia (BARKER; THOMAS, 2004; OLIVEIRA et al., 2020). Nos ecossistemas antárticos podem ocorrer grandes variações de temperatura e salinidade, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultravioleta alternada com longos períodos de ausência de luz, mudanças climáticas acentuadas e descontínuas, além dos ciclos de congelamento e degelo, que influenciam a distribuição das massas de água no Oceano Austral e geram alterações locais no clima (SIMÕES, 2011; HADNSOM; GORDON, 2013). Ainda que as condições encontradas sejam adversas, uma relativa variedade de formas de vida está presente no continente Antártico como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos (SHIVAJI; PRASAD, 2009; ROSA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

Além desta diversidade biológica encontrada no continente Antártico e nos oceanos, seus ambientes únicos são responsáveis por uma grande diversidade química, representando uma fonte promissora de produtos naturais bioativos (GAMBATO et al., 2014; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2021).

As condições ambientais peculiares dos mares e oceanos como, variações extremas na pressão, salinidade, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, concentração de oxigênio e luz, configuram um importante fator na produção de compostos químicos complexos (FELCZYKOWSKA et al., 2012; GERWICK; MOORE, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013; LYU et al., 2020).

Dentre os organismos marinhos estão as macroalgas que representam uma parte altamente produtiva desse ecossistema. Elas incorporam energia solar, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e é utilizado por outros organismos aquáticos, atuam no ciclo dos elementos químicos, constituem fonte alimentar para

animais onívoros e herbívoros, fornecem habitat, refúgio e ambiente para reprodução de diversos organismos da biota marinha, desempenhando funções ecológicas essenciais (ZUCCARO et al., 2008; ZACHER, 2014; BAWEJA et al. 2016; OLIVEIRA et al., 2020).

Devido às dificuldades de acesso e coleta, poucas informações taxonômicas estão disponíveis e não há uma estimativa precisa da diversidade de macroalgas na Antártica (SANCHES; PELLIZZARI; HORTA, 2016; OLIVEIRA et al., 2020). A flora ficológica presente na Antártica apresenta baixa riqueza de espécies em comparação com a flora de regiões temperadas e tropicais (WIENCKE; CLAYTON, 2002). Entretanto, a flora marinha Antártica é caracterizada por um alto grau de endemismo (FUJII; COLEPICOLO, 2014; OLIVEIRA et al., 2020).

Além das macroalgas marinhas, exemplares de grande interesse no ambiente marinho são os fungos, os quais podem crescer em uma ampla variedade de substratos, como madeira, sedimentos, areia, manguezais, corais, conchas de moluscos, invertebrados marinhos, na superfície e interior das algas (JONES; PANG, 2012). Os fungos algícolas são aqueles associados às macroalgas e constituem um grupo diverso que inclui espécies simbiotes, sapróbias, parasitas e patogênicas (KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER, 2003; SURYANARAYANAN, 2012).

Ao contrário dos fungos de regiões tropicais e temperados, os fungos presentes na Antártica ainda representam uma proporção desconhecida de diversidade e potencialmente novos filos que ainda podem ser descobertos (ROSA et al., 2019).

Segundo Santiago et al. (2012), a capacidade dos fungos antárticos sobreviverem em condições extremas sugere que eles podem apresentar características bioquímicas incomuns e vias que lhes permitem gerar novos compostos. Entre os fungos que vivem na Antártica, o gênero *Penicillium* é provavelmente o mais abundante e difundido em diferentes ambientes e substratos na Antártica, além de serem produtores de compostos bioativos. Porém, poucas espécies encontradas na Antártica têm sido investigadas em relação sua composição química e aplicações farmacêutica e biotecnológica (ROSA et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2021).

Dentre as diversas atividades biológicas apresentadas pelo fungos Antárticos estão citotoxicidade (SANTIAGO et al., 2012; LIN et al., 2014; GODINHO et al. 2015; LIU et a, 2019; YU et al., 2019; KHAN et al., 2020), antimicrobiana (LI et al., 2008; 2018; BRUNATI et al., 2009; GODINHO et al., 2013; MELO et al., 2014; FURBINO et



al., 2014; GODINHO et al. 2015; GONÇALVES et al., 2015; VIEIRA et al., 2018; YU et al., 2019; KHAN et al., 2020; SHAH et al., 2020), antiparasitária (SANTIAGO et al., 2012; GOMES et al., 2018; GODINHO et al. 2015), antiviral (FURBINO et al., 2014; GODINHO et al. 2015; GOMES et al., 2018), anti-inflamatória (HA et al., 2020) e fotoprotetora (TEIXEIRA et al., 2021).

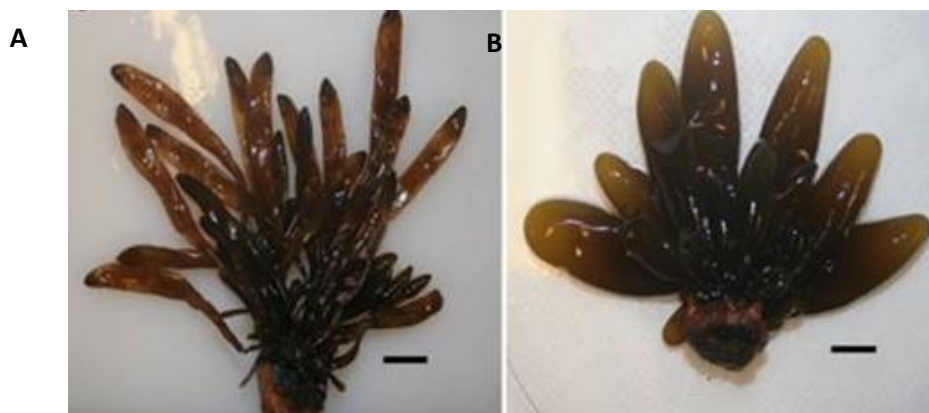
Considerando a escassez de estudos taxonômicos, ecológicos e químicos de fungos presentes no continente Antártico destaca-se a importância do estudo desses organismos com o objetivo de contribuir com informações químicas sobre sua biodiversidade subexplorada, além disso, para aumentar as possibilidades de descoberta de substâncias bioativas e aplicá-las em abordagens biotecnológicas.

### 2. 1. 2 A macroalga Antártica *Adenocystis utricularis*

A alga parda *Adenocystis utricularis* (Bory) H. et H. foi descrita por Skottsberg em 1921, como sendo uma espécie pouco conhecida com distribuição restrita a regiões de clima frio e sul polar, presente principalmente nas Ilhas Falkland, Patagônia, Terra do Fogo e na Península Antártica (ASENSI et al., 2004).

*A. utricularis* tem uma morfologia muito distinta, apresentando formato vesicular com talos pequenos e delicados, incomum entre os talos robustos e maiores predominantemente encontrados na maioria das espécies de algas marinhas antárticas (Fig.1).

**Figura 1.** Fotografia da macroalga antártica *Adenocystis* sp. (A) e *A. utricularis* (B). Barra representa 1 cm.



Fonte: GODINHO et al., 2013.

Esta espécie apresenta acúmulo interno de água do mar que provavelmente funciona como proteção contra o desprendimento por ação das ondas ou correntes fortes, considerando que as algas marinhas estão presas as pedras por uma pequena retenção (NAYLOR 1954; ASENSI et al., 2004; LOQUE et al., 2010). Loque et al. (2010) observaram a ocorrência em altas densidades da levedura *Metschnikowia australis* no líquido intravesicular de *A. utricularis* e de acordo com os autores esta levedura pode ser capaz de utilizar nutrientes fotossintéticos liberados por *A. utricularis*. Este é um habitat interessante para uma espécie de levedura, uma vez que a levedura é protegida dentro da alga contra as condições estressantes do ambiente; esta associação ecológica entre *M. australis* e *A. utricularis* precisa ainda ser melhor investigada.

As algas pardas (Phaeophycophyta) são conhecidas por produzirem polissacarídeos, como os alginatos, laminaranos e fucoidanos (PONCE et al., 2003). Várias atividades biológicas têm sido atribuídas aos fucoidanos, como anticoagulante, antitrombótica, anti-inflamatória, antitumoral, contraceptivo e antiviral. Eles foram descritos como inibidores da replicação de vários vírus, como o vírus da imunodeficiência humana, o herpes simplex vírus e citomegalovírus (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Em um estudo realizado por Ponce et al. (2003) foram identificados dois tipos de fucoidanos nas algas *A. utricularis*, o galactofucano e o uronofucoidano. Os galactofucanos mostram uma elevada atividade inibidora contra o vírus herpes simplex 1 e 2, sem citotoxicidade, enquanto que os uronofucoidanos não apresentaram nenhuma atividade antiviral.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi possível descrever o perfil lipídico de *A. utricularis* e outras algas antárticas. Neste estudo, a substância majoritária do extrato hexânico de *A. utricularis* foi o fucosterol (36,06%), seguido do fitol (31,95%). As outras substâncias identificadas foram os ácidos palmítico (4,80%) e oleico (3,47%), octacosanol (1,16%), esqualeno (1,96%), brassicasterol (5,80%),  $\beta$ -sitosterol (5,03%), dentre outras (TEIXEIRA et al., 2019a).

Berneira et al. (2021) também investigaram o perfil lipídico de *A. utricularis* proveniente do continente Antártico e avaliaram sua atividade antibacteriana. Os principais constituintes encontrados foram 2-butoxietanol ( $55,14 \pm 9,64$  mg kg<sup>-1</sup> de material seco), fucosterol ( $41,60 \pm 3,32$  mg kg<sup>-1</sup> de material seco) e ácido 2-etil-etanoico ( $30,91 \pm 0,30$  mg kg<sup>-1</sup> de material seco). Em relação a atividade antimicrobiana, o extrato hexânico de *A. utricularis* foi capaz de inibir o crescimento

de *Escherichia coli* em uma concentração menor que  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , *Staphylococcus aureus* a  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e *Salmonella typhimurium* a  $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os autores relacionaram a atividade antibacteriana apresentada por *A. utricularis* com a presença de ácidos graxos, uma vez que essas biomoléculas estavam presentes em maiores quantidades ( $150,05 \pm 4,29 \text{ mg kg}^{-1}$  de material seco) em comparação com outras classes bioquímicas, como os álcoois e esteróis ( $67,70 \pm 10,09$  e  $66,32 \pm 4,33 \text{ mg kg}^{-1}$  de material seco, respectivamente).

Esses resultados demonstram o potencial para uso nas áreas biotecnológica, farmacêutica e alimentícia de *A. utricularis*, uma vez que seus componentes lipídicos estão associados por exemplo, a atividade antimicrobiana.

### **2. 1. 3 O gênero *Penicillium* e seus metabólitos bioativos**

Espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Penicillium* são ascomicetos pertencentes à família Trichocomaceae. O gênero *Penicillium* inclui mais de 350 espécies, muitas das quais são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos bioativos (VISAGIE et al., 2014; GRIJSEELS et al., 2017).

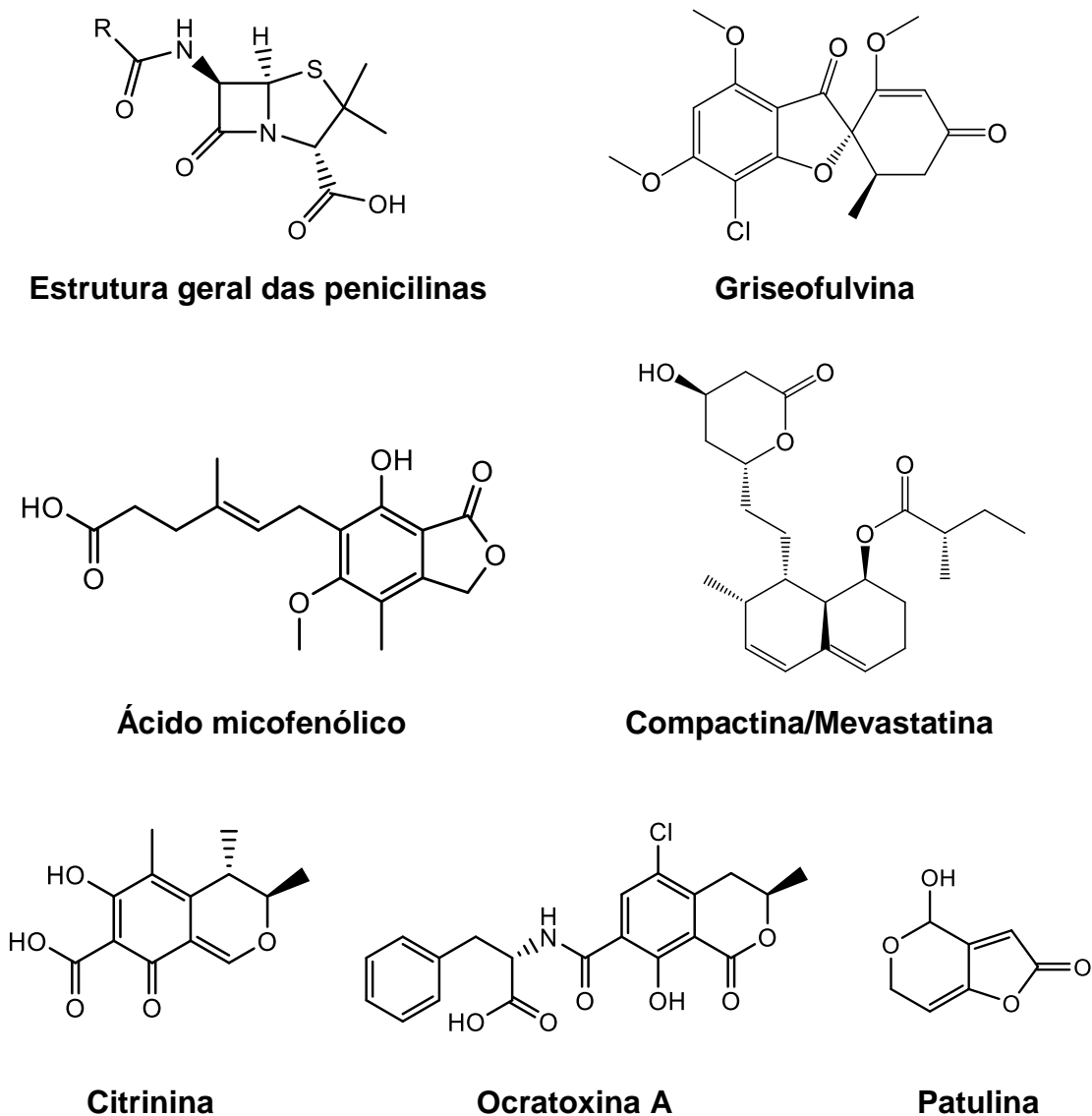
Fungos do gênero *Penicillium* são encontrados em vários ambientes, como solo, ar, água, ambientes extremos de temperatura, salinidade, deficiência hídrica e pH, e também associados a plantas, produtos alimentícios e organismos marinhos. Devido à sua enorme diversidade e existência em ambientes extremos, há um grande potencial de utilização de fungos *Penicillium* para diversas aplicações ambientais, biotecnológicas e industriais (YADAV et al., 2018).

Os metabólitos bioativos mais conhecidos produzidos por *Penicillium* são os antibióticos derivados da penicilina, descrito por Fleming em 1929 e que atualmente é produzido em larga escala a partir de *P. chrysogenum* e *P. rubens* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011; GARCIA-ESTRADA et al., 2020). Outras substâncias com propriedades farmacêuticas importantes produzidas por espécies de *Penicillium* incluem o antifúngico griseofulvina, o imunossupressor ácido micofenólico (ERBERT et al., 2012; PATEL et al., 2016) e a compactina/mevastatina, medicamento usado para tratar a hipercolesterolemia e prevenir doenças cardiovasculares (GRIJSEELS et al., 2017). Estes exemplos ilustram a grande importância das espécies de *Penicillium* como fontes de compostos bioativos com aplicações farmacológicas. Por outro lado, as espécies de *Penicillium* também podem produzir micotoxinas, como citrinina,

ocratoxina A e patulina, que podem representar um risco para a saúde de seres humanos e animais (Fig. 2) (PRENCIPE et al., 2020).

Apesar de o gênero *Penicillium* ser um dos mais conhecidos e estudados, microbiologistas afirmam que a classificação de espécies de *Penicillium* não é fácil devido à grande variabilidade dentro do gênero, por isso a importância de estudos quimiotaxonômicos para auxiliar nos estudos de biologia molecular. Neste sentido, as abordagens lipidômicas, proteômicas e metabolômicas suplementares, bem como a abordagem filogenética vem contribuindo sobremaneira para uma identificação mais confiável em nível de espécies (ZHELIFONOVA et al., 2009; KOZLOVSKY et al., 2013; TSANG et al., 2018).

**Figura 2.** Substâncias isoladas de fungos do gênero *Penicillium* com propriedades farmacêuticas e micotoxinas.



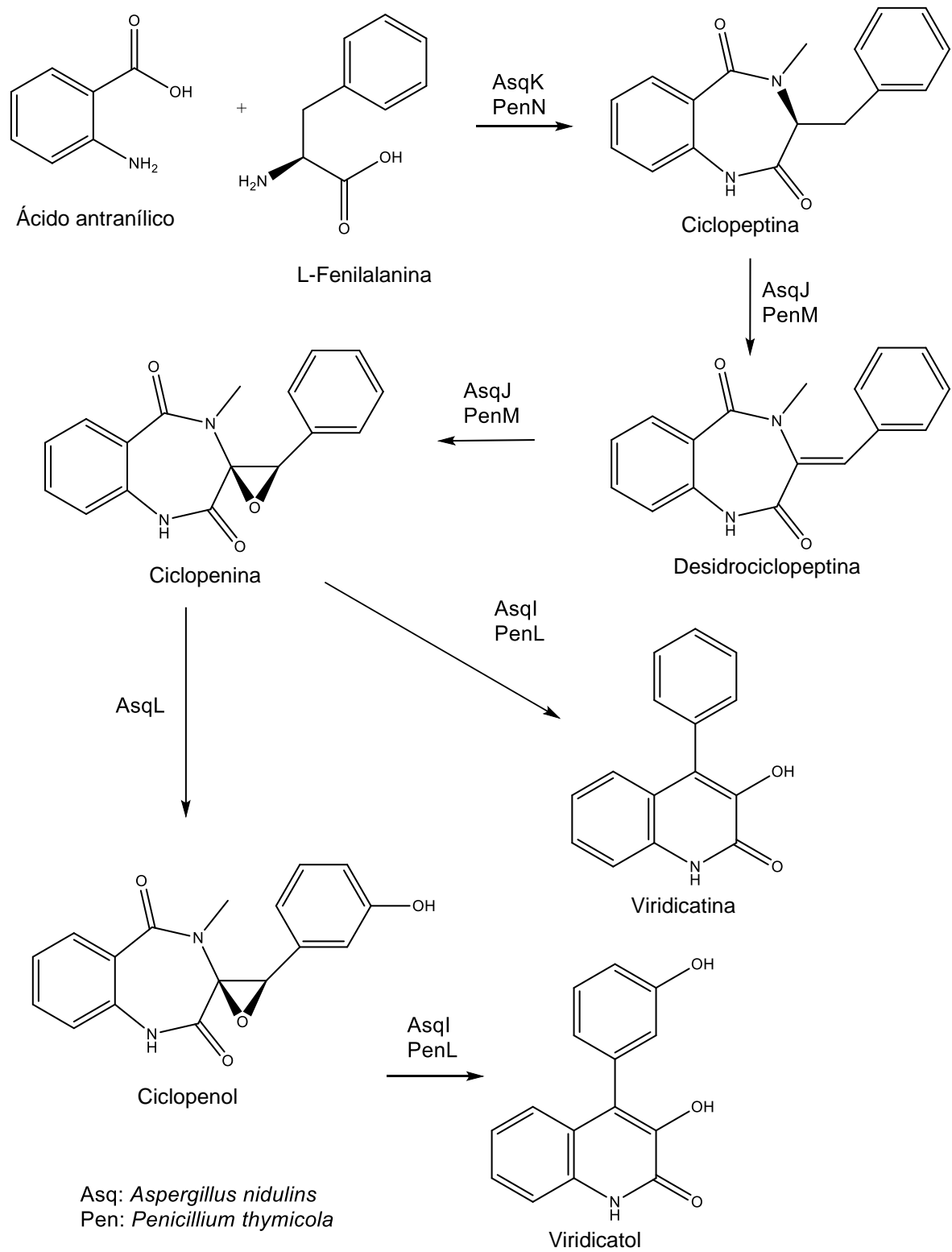
Uma importante classe de metabólitos associados ao gênero *Penicillium* são os alcaloides de Ergot, estruturalmente caracterizados pela presença de anéis ergolínicos tetracíclicos que desempenham um importante papel como produtos farmacêuticos, na indústria de alimentos e em sistemas biológicos (GERHARDS et al., 2014; KOZLOVSKY et al., 2013; KUMAR et al., 2018). Outras classes de metabólitos podem ser citadas para espécies do gênero *Penicillium*, como azafilonas, alcaloides indólicos prenilados, sideróforos, dicetopiperazinas, benzodiazepinas, quinolinas, quinazolinas, policetideos e peptídeos cíclicos (KUMAR et al., 2018).

A espécie *Penicillium echinulatum* Raper & Thom ex Fassat. apresenta como sinônimas *P. cyclopium* var. *echinulatum* e *P. palitans* var. *echinoconidium* (FRISVAD et al., 2004). Alguns metabólitos foram isolados dessa espécie, como ácido micofenólico, 5-hidroximaltol (ANDERSON et al., 1988), arisugacina C, G, J, K e territrem C (LI et al., 2014). Dentre as substâncias isoladas, arisugacina K apresentou atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *Escherichia coli* e arisugacina C demonstrou letalidade contra *Artemia salina* (CI<sub>50</sub>: 48,6 µg mL<sup>-1</sup>). Frisvad et al. (2004) descrevem outros metabólitos que podem ser biossintetizados por *P. echinulatum*, como palitantina, territrens, arisugacinas, ciclopeptina, desidrociclopeptina, ciclopenina, ciclofenol, viridicatina e viridicatol, porém os autores não descrevem com detalhes como esses metabólitos foram identificados.

De acordo com Kozlovsky et al. (2013) quando a rota biossintética de fungos do gênero *Penicillium* inicia com ácido antranílico, os produtos resultantes do processo metabólico são os compostos benzodiazepínicos, como a ciclopeptina, a ciclopenina e o ciclofenol, além de compostos quinolínicos, como viridicatina, viridicatol e quinocitrininas A e B e também compostos quinazolínicos (fumiquinolinas F e G).

Os alcaloides quinolínicos e quinolonas são encontrados em diversos tipos de organismos e exibem uma variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana, antimalárica, antiviral, anti-inflamatória e antitumoral (KISHIMOTO et al., 2018; ZHANG et al., 2022). O esqueleto quinolona comumente encontrado entre esses alcaloides é utilizado para a síntese de bibliotecas de compostos bioativos. Portanto, alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de detalhar as enzimas envolvidas nesta rota biossintética como pode ser observado na Figura 3 (ISHIKAWA et al., 2014; ZOU et al., 2015; 2017; KISHIMOTO et al., 2018; ZHANG et al., 2022).

**Figura 3.** Proposta de rota biossintética para formação da viridicatina e viridicatol (ZHANG et al., 2022).



*P. echinulatum* também foi identificado como potencial produtor de complexos de celulases que podem ser utilizados para bioprocessos, porém seu sistema de celulases ainda está sendo investigado (MARTINS et al., 2008; RITTER et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2016; NARAIN; GAUTAM 2018; LENZ et al., 2022).

Portanto, há poucos relatos na literatura que descrevem o perfil químico e o potencial biológico da espécie *P. echinulatum*, o que nos motivou a realizar o presente estudo, em busca de conhecer e contribuir com dados relevantes para a literatura.

#### **2. 1. 4 Potencial biológico de fungos associados a macroalgas antárticas**

Os fungos algícolas são um grupo relativamente inexplorado de fungos com grande potencial metabólico como produtores de compostos bioativos (GODINHO et al. 2013; FURBINO et al. 2014; 2018; SARASAN et al., 2017; OGAKI et al., 2019; VICENTE et al., 2021; TEIXEIRA et al., 2019a e b; TEIXEIRA et al., 2021).

A parte externa das algas oferece uma área protegida em um ambiente continuamente exposto a fatores de estresse como a baixa concentração de nutrientes, dessecação, salinidade e radiação UV. Macroalgas saudáveis liberam parte do carbono fixado durante a fotossíntese na forma de uma secreção chamada mucilagem, um substrato rico em carboidratos, lipídeos e peptídeos, o qual age como um fator atrativo para os microrganismos colonizadores, como por exemplo, os fungos. É neste ambiente que as interações entre fungos e macroalgas têm início, a partir da ligação dos esporos e da invasão das hifas, levando à colonização da alga (ZUCCARO; MITCHELL, 2005). Entre os fungos algícolas, aqueles que vivem no interior dos tecidos de macroalgas apresentam extensa diversidade de espécies e destacam-se como uma extraordinária fonte de novos compostos bioativos bem como de compostos conhecidos provenientes de outras fontes (FLEWELLING et al., 2015; SINGH et al., 2015; OGAKI et al., 2019).

Os fungos marinhos associados a diversas algas verdes, vermelhas e pardas foram reportados como produtores de compostos antioxidantes, bem como antialgal, antifúngicos e inseticidas. Estes metabólitos podem evitar a colonização dos talos das algas por outros microrganismos, além de afastar herbívoros e proteger as algas hospedeiras de outros estresses contínuos os quais estão expostas em ambientes marinhos, como exposição prolongada a luz solar, variação de umidade e salinidade e mudança da maré (SURYANARAYANAN et al. 2010; 2012; SARASAN et al., 2017; MENAA et al., 2020; REN et al., 2022).

Os fungos provenientes do continente Antártico têm chamado a atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de sobreviver em condições extremas, o que sugere a presença de vias bioquímicas diferenciadas que podem levar a obtenção de novas substâncias bioativas (SANTIAGO et al., 2012; OGAKI et al., 2019; ROSA et al., 2019). Porém, ainda são poucos os estudos que avaliaram a capacidade dos metabólitos bioativos de fungos marinhos Antárticos, principalmente daqueles associados à macroalgas (GODINHO et al. 2013; FURBINO et al. 2014; 2018; TEIXEIRA et al., 2021).

Godinho et al. (2013) relataram compostos bioativos produzidos por duas espécies distintas de *Penicillium* sp. isolados da macroalga *Monostroma harti* e *Palmaria decipiens*. Os extratos apresentaram atividade antifúngica alta e seletiva contra o fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* e atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O trabalho de Furbino et al. (2014) também mostraram que vários isolados algícolas de *Pseudogymnoascus* spp., *Dipodascus australiensis*, *Guehomyces pullulans* e *Metschnikowia australis* foram capazes de produzir substâncias naturais bioativas com atividades antifúngicas seletivas contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *C. sphaerospermum*. Adicionalmente, os autores demonstraram que *Penicillium steckii* isolado de *M. harti* foi capaz de produzir compostos antivirais que inibiram o vírus da febre amarela (FURBINO et al., 2014). Os fungos algícolas também apresentam interesse industrial devido à biossíntese de enzimas hidrolíticas. Os fungos *Beauveria bassiana*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp., *Pseudogymnoascus* sp., *Cladosporium* sp., e *Doratomyces* sp. isolados de macroalgas Antárticas apresentaram atividades carragenolíticas e agarolíticas, o que sugere a capacidade desses fungos de produzirem enzimas com potencial para degradar a biomassa algal e liberar minerais essenciais no oceano circundante (FURBINO et al., 2018). Finalmente, estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram a atividade fotoprotetora de alcaloides quinolínicos obtidos do fungo *P. echinulatum*, isolado da macroalga antártica *A. utricularis*. Neste estudo as substâncias viridicatina e viridicatol foram avaliadas quanto ao espectro de absorção da radiação ultravioleta (UV), fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante, sendo esses dois últimos realizados em monocamadas de células (HaCaT) e também em modelos de pele tridimensional ou pele humana reconstituída (TEIXEIRA et al., 2021).



## 2. 1. 5 Atividades biológicas avaliadas

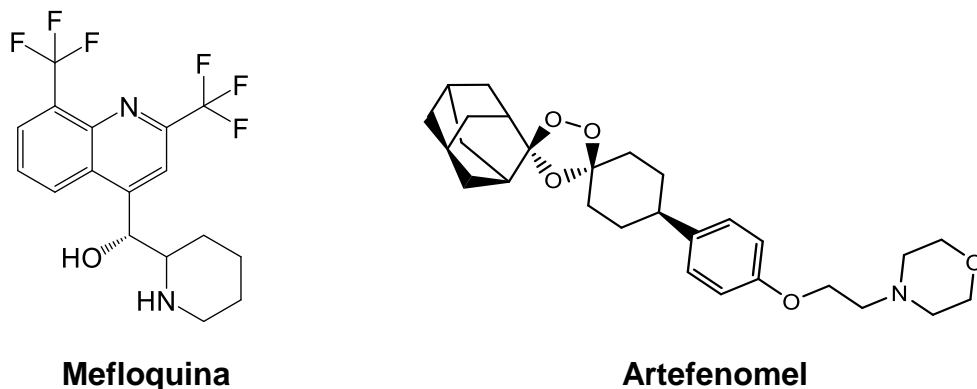
### 2. 1. 5. 1 Atividades antiparasitárias

A população mundial tem aumentado exponencialmente e alcançou cerca de 7,8 bilhões de pessoas em 2021 e deve crescer para cerca de 8,5 bilhões em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e 10,9 bilhões em 2100 (Nações Unidas, 2022).

O crescimento da população humana causa urbanização não planejada e mal gerenciada, principalmente nos países em desenvolvimento, resultando em milhões de pessoas vivendo em áreas com infraestrutura precária, o que favorece o surgimento de doenças transmitidas por vetores, como por exemplo doenças negligenciadas causadas por parasitos, tais como leishmaniose e malária. O tratamento a partir de medicamentos é a principal abordagem utilizada para o controle dessas doenças; no entanto, a falta de eficácia e os efeitos colaterais contribuem para o elevado índice de mortalidade e morbidade entre pessoas nos países em desenvolvimento (ORYAN; AKBARI, 2016; FALKENBERG et al., 2018).

Historicamente, os produtos naturais contribuem para o arsenal terapêutico no tratamento de diversas doenças, inclusive parasitárias, como por exemplo, ivermectina, quinina, artemisinina. Além de contribuírem como protótipos para o desenvolvimento de análogos sintéticos, por exemplo, o antimalárico mefloquina e o candidato artefenomel, que se encontram atualmente em fase II de ensaio clínico para tratamento da malária (Fig. 4) (McCARTHY et al., 2016; MACINTYRE et al., 2017).

**Figura 4.** Antimaláricos mefloquina e candidato artefenomel.



Portanto, apesar dos avanços no desenvolvimento e pesquisa de novos medicamentos, os graves efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis para o

tratamento da leishmaniose, a resistência de drogas antimaláricas frente ao parasito *Plasmodium* spp. e a falta de um tratamento específico para neosporose nos levam a buscar por novas moléculas antiparasitárias a partir de uma fonte considerada ainda pouco explorada, como o ambiente marinho.

#### 2. 1. 5. 1. 1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por mais de vinte espécies de *Leishmania* e é transmitida ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, principalmente dos gêneros *Nyssomyia* ou *Phlebotomus* (OMS, 2022). Essa doença é considerada um problema sério de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (PINTO et al., 2011; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

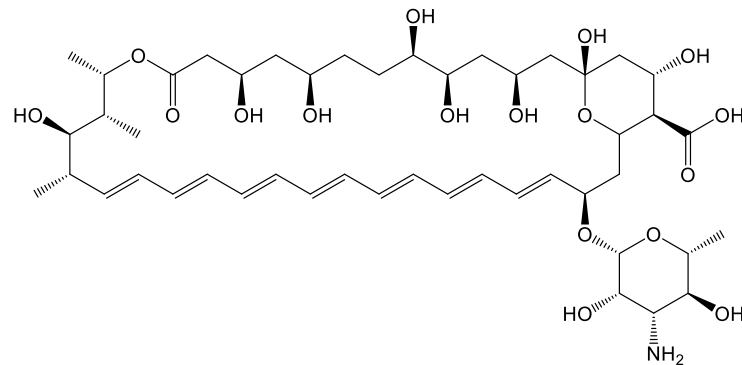
Existem três formas principais da doença: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e a leishmaniose mucocutânea (LCM). A LC é a forma mais comum, que pode ser causada pelo parasito *Leishmania amazonensis* e acomete principalmente a população das Américas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015), a LV é a forma mais grave e a MCL é a forma mais incapacitante da doença. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que ocorram anualmente 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC (OMS, 2022).

As formas de tratamento têm se baseado no uso de antimônios pentavalentes, como o estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, além dos medicamentos anfotericina B, paromomicina e miltefosina, que tem várias limitações quanto à toxicidade e falta de eficácia em áreas endêmicas (Fig. 5) (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Os antimônios pentavalentes causam efeitos colaterais graves, incluindo hepato e cardiotoxicidade e a anfotericina B causa toxicidade renal. Apesar da formulação em lipossoma da anfotericina B apresentar maior eficácia e segurança, este medicamento possui custo elevado. O tratamento com paromomicina apresenta eficácia variável, porém seu uso e disponibilidade nas regiões endêmicas ainda é limitado (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

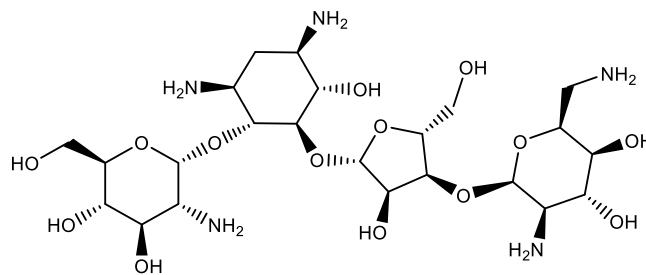
Dessa forma, as características indesejáveis apresentadas pelos tratamentos associadas ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania* têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de drogas leishmanicidas mais eficazes e menos

tóxicas ao paciente (TORRES et al., 2014; BALASEGARAM et al., 2012; MOORE; LOCKWOOD, 2011; RANGEL et al., 2019; CLEMENTINO et al., 2021).

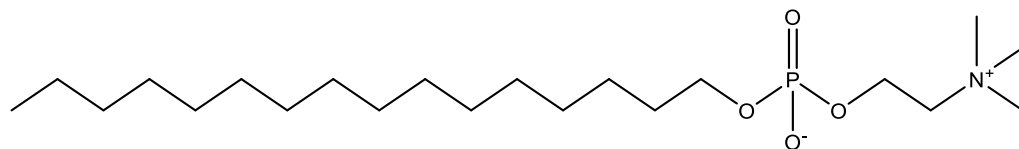
**Figura 5.** Medicamentos utilizados para tratamento da leishmania.



**Anfotericina B**



**Paromomicina**



**Miltefosina**

A grande maioria dos produtos naturais ativos contra *Leishmania* spp. é de origem vegetal. Embora o estudo e a utilização de compostos de algas marinhas contra doenças negligenciadas como a Leishmaniose sejam recentes, alguns relatos já foram publicados descrevendo substâncias isoladas a partir de diversas algas com forte atividade antiprotozoário e baixa toxicidade (TORRES et al., 2014; RANGEL et al., 2019). Dentre os diversos metabólitos secundários produzidos pelas algas marinhas, os terpenoides halogenados e as acetogeninas isoladas dos gêneros *Bifurcaria*, *Laurencia*, *Dictyota* e *Canestrocarpus* demonstraram atividade leishmanicida (SANTOS et al., 2010; MACHADO et al., 2011; SANTOS et al., 2011;

SOARES et al., 2012). Para os fungos marinhos isolados de diferentes organismos, as classes de metabólitos que apresentaram potencial leishmanicida foram os peptídeos (COMPAGNONE et al., 1998; KOSSUGA et al., 2008; PIMENTEL-ELARDO et al., 2010), esteróis (PONTIUS et al., 2008; PIMENTEL-ELARDO et al., 2011; GAO et al., 2012), policetideos (PIMENTEL-ELARDO et al., 2011; GAO et al., 2012) e lactonas (BRAUN et al., 2021).

#### 2. 1. 5. 1. 2 Malária

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* e *P. malariae*) que são transmitidos às pessoas através da picada de mosquitos fêmeas *Anopheles* infectadas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 229 milhões de casos da doença foram responsáveis por mais de 409.000 mortes no mundo todo em 2019 (OMS, 2022b). Nos últimos anos, diversos medicamentos antimaláricos entraram em fases de pesquisa clínica e alcançaram importantes descobertas, porém alguns medicamentos até mesmo combinados à artemisinina perderam sua eficácia diante a resistência de algumas cepas (HAI et al., 2022).

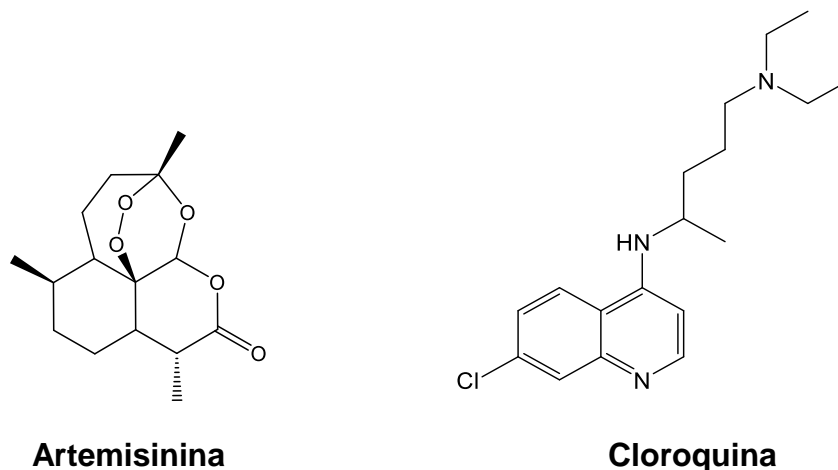
A malária é uma doença evitável e tratável, sendo que o diagnóstico precoce e o tratamento reduzem a doença e previnem as mortes, além de contribuir para a redução da transmissão. O melhor tratamento disponível, em particular para a cepa resistente de *Plasmodium falciparum*, é a terapia combinada à base de artemisinina (OMS, 2022b). Outros medicamentos como a cloroquina, as aminoquinolinas e o antifolato foram desenvolvidos como antimaláricos de primeira linha (Fig. 6). Porém, eles estão enfrentando problemas de resistência aos medicamentos em algumas partes do mundo. Portanto, há uma necessidade urgente de estudar alvos relacionados à resistência à malária para o *design* de medicamentos com um novo mecanismo de ação e amplo potencial terapêutico, não apenas para ampliar o escopo do tratamento, mas também para superar a multirresistência existente (DOUGLAS et al., 2010; HAI et al., 2022).

Na revisão de literatura publicada por Hai e colaboradores (2022) foram encontrados 360 produtos naturais marinhos com atividade antimalárica e dentre esses, 200 estudos publicados entre 1972 e 2021 foram divididos em sete categorias de acordo com as estruturas químicas, sendo eles: policetídeos (16%), terpenoides (29%), alcaloides (26%), macrolídeos (16%), peptídeos (7%), esteróis (3%) e outros

(3%). Em relação a origem dessas substâncias 40% foram isoladas de esponjas, 25% de microrganismos e 17% de cnidários.

De acordo com esses dados as moléculas provenientes do ambiente marinho podem servir como inspiração para químicos medicinais e indústrias farmacêuticas na busca por novas e eficazes drogas antimaláricas.

**Figura 6.** Medicamentos utilizados para tratamento da malária.



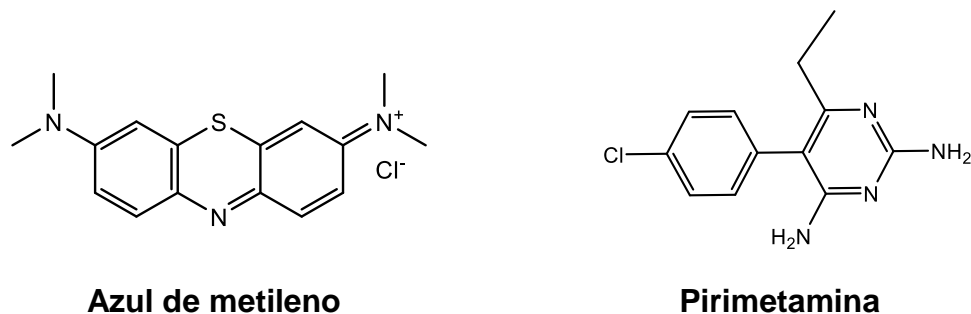
#### 2. 1. 5. 1. 3 Neosporose

Assim como a leishmaniose, a neosporose também é uma doença causada por um parasito que infecta espécie de mamíferos, incluindo gados, ovelhas, cabras, cavalos e cães. Um dos agentes etiológicos desta doença é o parasito Apicomplexa intracelular obrigatório *Neospora caninum*. Apesar do esforço de muitos grupos de pesquisa, a neosporose carece de uma quimioterapia eficaz, levando a perdas econômicas relevantes principalmente nos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos, uma vez que o parasito está relacionado ao aborto e diminuição da fertilidade em bovinos (ANGHEL et al., 2018; HARMSE et al., 2017; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2018a, b; PEREIRA et al., 2020; 2021).

Sendo a quimioterapia uma prática comum e bem estabelecida no controle de outros parasitos do filo Apicomplexa como o *Plasmodium* (ANTONY; PARIJA, 2016) e *Toxoplasma gondii* (NEVILLE et al., 2015), alguns pesquisadores têm estudado o redirecionamento de outros medicamentos como a artemisinina, azul de metileno e pirimetamina buscando um tratamento efetivo e seguro que possa ser usado no combate contra *Neospora caninum* (Fig. 7) (PEREIRA et al., 2018; 2021). Apesar da triagem de candidatos a medicamentos contra *N. caninum*, existem poucos trabalhos

relatando a bioatividade de produtos naturais frente a este parasito. A maioria dos trabalhos são de plantas terrestres (SEO et al., 2013; LEESOMBUN; BOONMASAWAI; NISHIKAWA, 2017; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2018b) e recentemente nosso grupo de pesquisa publicou um estudo com a macroalga *Desmarestia antartica*, onde as frações D ( $CI_{50} 1,6 \pm 1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , IS 27,8), F ( $CI_{50} 3,1 \pm 2,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , IS 23,1) e H ( $CI_{50} 3,1 \pm 2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram atividade frente ao parasito *N. caninum* (DOS SANTOS et al., 2020).

**Figura 7.** Medicamentos que estão sendo redirecionados para tratamento da Neosporose.



#### 2. 1. 5. 2 Atividade fotoprotetora

A luz solar tem diversos efeitos benéficos para o ser humano, como produção da vitamina D e indução da expressão de  $\beta$ -endorfinas, as quais melhoram o bem-estar. Porém, a exposição excessiva aos raios ultravioletas (UV) é responsável por danos na pele, como queimaduras solares, hiperpigmentação, fotossensibilização cutânea, fotoenvelhecimento e câncer de pele, esses dois últimos tipicamente induzidos por espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas nas vias oxidativas (DAHAMANE et al., 2015; JUSSILA et al., 2016).

Dessa forma, o uso de filtros solares tem se tornado cada vez mais importante e necessário para prevenir ou reduzir a extensão dos danos provocados pela exposição à radiação UV.

A maioria das substâncias presentes em extratos naturais com propriedades fotoprotetoras agora fazem parte dos filtros solares e a maioria dos filtros UV são inspirados em produtos naturais, especificamente de origem botânica, animal ou mineral (PAWLOWSKI; PETERSEN-THIERY, 2020; JESUS et al., 2022).

Devido à exposição aos raios UV, os organismos fotossintéticos desenvolveram mecanismos de defesa para reduzir os efeitos da radiação UV (HADER, 2000).

Considerando que os fungos marinhos podem viver em simbiose com tais organismos, eles também são capazes de biossintetizar substâncias que absorvem luz UV, como os carotenoides (ARCANGELI; CANNISTRARO, 2000), aminoácidos tipo micosporinas (TORRES et al. 2004; KOGEJ et al. 2006; OREN; GUNDE-CIMERMAN 2007) e outros compostos fotoprotetores (LI et al. 2004a, b; ZHANG et al. 2008; MACIEL et al. 2018; TEIXEIRA et al., 2021).

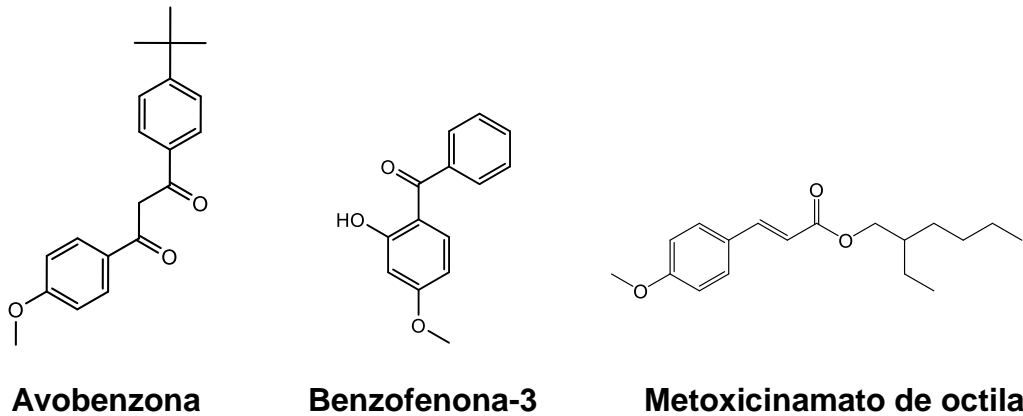
Os filtros UV podem ser classificados quanto à sua capacidade de absorver a radiação UV, como UVA, UVB ou filtros UV de amplo espectro (UVA e UVB). Além disso, esses produtos também podem ser divididos em orgânicos ou inorgânicos (MANCERO et al., 2014). Os filtros orgânicos, representados por benzofenonas, salicilatos, cinamatos, triazinas e benzotriazóis são capazes de absorver a radiação UVA, UVB ou ambas, geralmente contêm estruturas aromáticas únicas ou múltiplas ligadas a grupos hidrofóbicos para melhorar suas propriedades (DINARDO; DOWN, 2018; SCHNEIDER; LIM, 2019; CADENA-AIZAGA et al., 2020). Os filtros inorgânicos, como dióxido de titânio e óxido de zinco são fotoestáveis e capazes de refletir, absorver e dispersar à radiação UV (MANCERO et al. 2014; SHAATH 2016; TSUI et al. 2017; RANGEL et al. 2020).

Dentre os filtros químicos de amplo espectro aprovados pela agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) encontra-se a avobenzona. Devido à escassez de filtros solares de amplo espectro, torna-se importante a busca por novos compostos com ação semelhante aos já utilizados e que não apresentem riscos para os consumidores, bem como para o meio ambiente. A avobenzona, produto de uso comercial apresenta potencial fototóxico e fotoalérgico. Além disso, alguns estudos apontam que filtros como a benzofenona-3 e o metoxicinamato de octila são prejudiciais aos organismos marinhos, causando principalmente o branqueamento de recifes decorais (Fig. 8) (DANOVARO et al., 2008; DOWNS et al., 2016; SCHNEIDER; LIM, 2019).

O uso de substâncias de origem natural que possam atuar como fotoprotetores é uma alternativa aos filtros já disponíveis no mercado e pode contribuir para o desenvolvimento de fotoprotetores mais eficazes e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Para que uma nova substância seja proposta como filtro solar, além de apresentar absorção no UV, ela deve ainda ser considerada fotoestável e segura (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007; GASPAR et al., 2013). Deste modo, também é de grande importância avaliar a fototoxicidade dessas substâncias para a

obtenção de dados relevantes para a avaliação do risco do uso das referidas substâncias em produtos cosméticos (MANSUR et al., 2016; GASPAR et al., 2013).

**Figura 8.** Substâncias comumente utilizadas como filtros solares.



Dentro do comprimento de onda da radiação UV, a radiação UVA é a principal responsável pela geração de ERO, que causa estresse oxidativo e danifica proteínas celulares, lipídios e DNA contribuindo para a fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento. Dessa forma, como os filtros UV orgânicos não bloqueiam completamente a radiação UV e, conseqüentemente, uma pequena porcentagem de radiação UV pode atingir as células humanas e produzir ERO, muitos protetores solares e formulações de cuidados com a pele também contêm antioxidantes para proteger a pele contra os danos induzidos por ERO (KURUTAS, 2015; MATSUI, 2016; UZUN; DEMIREZER, 2019).

### 2. 1. 5. 3 Atividade imunomoduladora

A inflamação é uma resposta generalizada, inespecífica e benéfica do organismo iniciada por células imunes ativadas e substâncias químicas associadas para neutralizar estímulos nocivos ou em resposta a uma lesão tecidual (CHEN et al., 2016; XU et al., 2019). Os neutrófilos são amplamente reconhecidos por desempenhar um papel importante nas respostas inflamatórias agudas e são as primeiras células efetoras a responder aos sinais quimiotáticos gerados pela presença de agentes estranhos ao organismo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; STAPELS et al., 2015).

O neutrófilo é provido de vários mecanismos que compreendem sistemas oxidantes, geradores de ERO, um arsenal de enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos envolvidos na destruição das partículas fagocitadas e,



adicionalmente, um mecanismo de liberação de filamentos de cromatina ligada a grânulos e proteínas citoplasmáticas, as quais formam armadilhas extracelulares (NET, *Neutrophil Extracellular Traps*) para capturar e inativar patógenos/partículas (HÄGER et al., 2010; BARNADO et al., 2016). Contudo, essas células também participam de processos inflamatórios crônicos e de doenças autoimunes (CHEN et al., 2016), evidenciando que tanto a ineficiência quanto a exacerbação das respostas dos neutrófilos contribuem para a fisiopatologia de várias doenças, sobretudo as doenças inflamatórias crônicas tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES) (MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002; SMITH; KAPLAN, 2015; TOLLER-KAWAHISA et al., 2015; BARNADO et al., 2016), diabetes (FADINI et al., 2016) e doenças cardiovasculares (LIAW et al., 2015; WARNATSCH et al., 2015).

Assim, os produtos naturais marinhos que modulam o metabolismo oxidativo dos neutrófilos podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos para atuarem no tratamento de doenças inflamatórias (CHEN et al., 2016). Dentre as substâncias que apresentam atividade anti-inflamatória, podemos citar aquelas das classes dos terpenos, polipeptídios, polissacarídeos, esteróis e alcaloides (SOUZA et al., 2020; ZHAO; ZENG, 2020). Estudos recentes têm mostrado o potencial de alguns organismos marinhos na ação reguladora do metabolismo dos neutrófilos, porém os mecanismos de ação ainda são inexplorados (CHEN et al., 2016).

#### 2. 1. 5. 4 Atividade antimicrobiana

Há muito tempo os produtos naturais servem como fonte de substâncias antimicrobianas. A descoberta da atividade antibiótica do *Penicillium notatum* em 1929 por Fleming revolucionou a ciência médica, levando ao descobrimento da penicilina. Outros exemplos bem conhecidos incluem cefalosporina, vancomicina e carbapenem. No entanto, com o aumento do uso desses e outros antibióticos, cepas bacterianas desenvolveram resistência aos medicamentos no mundo todo (BASSETTI et al. 2013; NG et al., 2015).

A resistência antimicrobiana pode surgir devido a diversos fatores, incluindo alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento das bombas de efluxo do fármaco, modificação enzimática ou inativação do antibiótico, modificação do sítio alvo, vias metabólicas alternativas e formação de biofilme (BARBOSA et al., 2020). Os produtos naturais derivados de organismos marinhos possuem diversidade

estrutural e diferem daqueles caracterizados a partir de organismos terrestres. Dessa forma, esses compostos podem ser usados como protótipos para o desenvolvimento de novas terapias antibióticas (NG et al., 2015; BARBOSA et al., 2020).

Dentre os organismos provenientes do ambiente marinho, as bactérias e fungos parecem ser as fontes mais promissoras de moléculas antibacterianas devido a sua capacidade de crescer de forma rápida e sustentável em biorreatores (NG et al., 2015; XU et al., 2015). Outras fontes, como algas, esponjas, corais, moluscos e outros animais marinhos, também podem fornecer protótipos para a descoberta de drogas que podem ser reproduzidos por síntese química. A maioria dos antibióticos de origem bacteriana são provenientes de bactérias gram-positivas do solo da ordem *Actinomycetes* como *Streptomyces* sp. (WANG; LU; CAO, 2020; WANG et al., 2021).

Os fungos de origem marinha com atividade antimicrobiana apresentam uma variedade de estruturas químicas, incluindo compostos nitrogenados (MENG et al., 2015; 2017; ZHENG et al., 2018), polipeptídios (WANG et al., 2012), esteróis (GAO et al. 2011) e terpenoides (ZHANG et al., 2012; MENG et al., 2014; LI et al., 2014; 2015; LIU et al.; 2015; MA et al., 2020). Cerca de 58% dos produtos naturais marinhos identificados entre 1998 e 2019 foram isolados de fungos associados com outros organismos como esponjas, algas, mangues e corais, o que sugere uma fonte rica em compostos antimicrobianos. Os fungos do gênero *Aspergillus* sp. são a principal fonte de compostos antimicrobianos, seguido por *Penicillium* sp., o que provavelmente se deve à alta tolerância à salinidade desses gêneros (WANG et al., 2021).

Apesar da extensa diversidade estrutural dos compostos antimicrobianos de fúngicos marinhos, nenhum dos metabólitos derivados do mar foi aprovado pela FDA como um medicamento antibacteriano e antifúngico, e nenhum dos metabólitos fúngicos marinhos recém-descobertos progrediu para ensaios clínicos. Novas abordagens de triagem são necessárias para rastrear metabólitos de fungos marinhos para facilitar a descoberta de medicamentos antimicrobianos.

## 2. 2 OBJETIVOS

### 2. 2. 1 Objetivo geral

Isolamento e avaliação da atividade biológica de metabólitos biossintetizados pelo fungo *Penicillium echinulatum* associado à espécie de macroalga antártica *Adenocystis utricularis*.

### 2. 2. 2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar o isolamento e identificação das linhagens de fungos associados à macroalga *Adenocystis utricularis*;
- ✓ Cultivar o fungo *P. echinulatum* em escala ampliada;
- ✓ Realizar a triagem química (CCDC, CLAE-DAD e CG-EM) dos extratos brutos e frações obtidas a partir do cultivo de *P. echinulatum*;
- ✓ Realizar a avaliação das atividades leishmanicida, antimalárica, anti-*Neospora*, fotoprotetora, imunomoduladora, antimicrobiana e avaliação da toxicidade dos extratos brutos e frações;
- ✓ Realizar o isolamento e a caracterização química das substâncias majoritárias de frações que apresentarem algum potencial biológico;
- ✓ Realizar avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas do fungo *P. echinulatum*.

## 2. 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2. 3. 1 Material e equipamentos

#### Material:

- ✓ Coluna analítica Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m);
- ✓ Coluna semi-preparativa Superlco C-8 (25 cm x 10 mm, 10  $\mu$ m);
- ✓ Coluna DB-5 MS (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m, Agilent);
- ✓ Coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada;
- ✓ Sílica gel-60 (40-70 mesh);
- ✓ Kitassato de 500 e 1000 mL;
- ✓ Placas de alumínio cromatográficas comparativas (CCDC) impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura (Sigma-Aldrich);
- ✓ Reveladores: iodo sublimado, solução de vanilina sulfúrica e luz UV (254 e 365 nm);
- ✓ Placas de petri (90 x 15 mm) descartáveis estéreis lisas;
- ✓ Vitamina B<sub>12</sub> (Sigma-Aldrich).

#### Meios de cultivo:

- ✓ Meio Caldo de Batata Dextrose (CBD, Kasvi);
- ✓ Meio Ágar Batata Dextrose (ABD, Kasvi);
- ✓ Meio Caldo Czapek (Kasvi);
- ✓ Meio ASNIII (RIPPKA et al., 1979 – Anexo I);

#### Solventes:

- ✓ Solventes para extração e fracionamento: metanol, acetato de etila, *n*-hexano, diclorometano, etanol e acetona de grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico;
- ✓ Solventes deuterados: metanol (CD<sub>3</sub>OD), dimetilsulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>) e clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Solventes de grau cromatográfico (CLAE): acetonitrila e metanol (JT Baker), ácido fórmico (JT Baker).

#### Equipamentos e softwares:

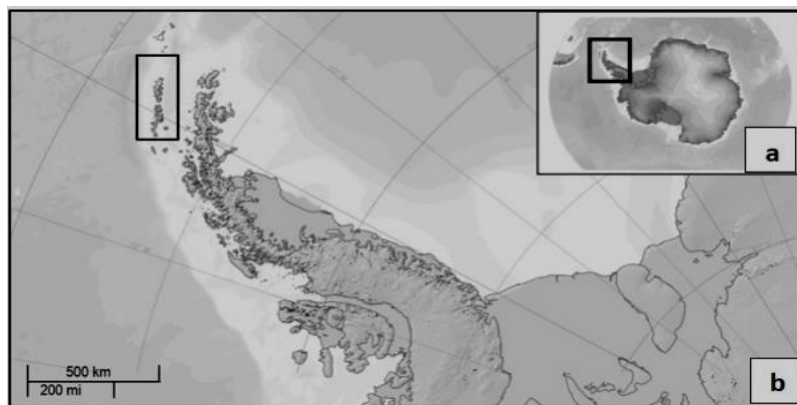
- ✓ Espectrômetros de RMN (modelos DRX 400 e DRX 500, Bruker, Billerica - Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP);
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo LC-6AD, Shimadzu) com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (modelo SPD-M10AVP, Shimadzu - Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – LQOAM-NPPNS-USP);
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo 2707, Waters) com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (modelo 2998 – Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP);
- ✓ Cromatógrafo preparativo (modelo Proeminence) com detector UV/Visível (modelo SPD-20A) e coletor automático (modelo: FCR-10A – Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP);
- ✓ Espectrômetro de massas (modelo micrOTOF-QII, Bruker Daltonics) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador por tempo de voo (TOF) (NPPNS-FCFRP-USP);
- ✓ Cromatógrafo gasoso (modelo QP-2010, Shimadzu) acoplado à espectrômetro de massas com ionizador por elétrons (70 eV) com injetor split (270 °C) e pressão 89,9 KPa (NPPNS-FCFRP-USP);
- ✓ Polarímetro (modelo P-300, Jasco);
- ✓ Balança semi-analítica (modelo FA-2204CI-BI, Bioscale);
- ✓ Capela de fluxo laminar (Pachane);
- ✓ Sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm, Bedford);
- ✓ Autoclave vertical (Phoenix);
- ✓ Evaporador rotativo (IKA, modelo RV 10 control e Buchi, modelo R-210);
- ✓ Bomba a vácuo (TE-058, Tecnal);
- ✓ Lavadora ultrassônica;
- ✓ Class VP HPLC software (Shimadzu);
- ✓ LC-Solution Single (Shimadzu);
- ✓ Empower 3.0 (Waters);
- ✓ DataAnalysis 4.3 (Bruker);

- ✓ Advanced Chemistry Development (ACD/Labs);
- ✓ Portable MestReNova 12.0 (Mestrelab Research);
- ✓ OriginPro 8 (Originlab);
- ✓ GraphPad Prism 5 (GraphPad);
- ✓ ChemDraw (PerkinElmer).

### 2. 3. 2 Coleta da macroalga antártica *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg

Amostras saudáveis da alga parda *Adenocystis utricularis* foram coletadas em Ipanema na Ilha do Rei George na Península Antártica (62°58'55.6" S x 60°33'11.5" W, 12/11/2015) durante a expedição XXXIV OPERANTAR coordenada pelo Programa Antártico Brasileiro em colaboração com a Marinha do Brasil (PROANTAR) entre os meses de outubro a dezembro de 2015, a bordo do navio polar brasileiro Almirante Maximiano (H41) (Fig. 9). As amostras de alga foram identificadas com base em análises macromorfológicas e microscópicas pelo Dr. César Bertaglia Pasqualetti e pela Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto. Um exemplar da alga *A. utricularis* foi catalogado e sua exsicata foi depositada no "Herbário Maria Eneyda Kauffmann Fidalgo" do Instituto de Botânica de São Paulo, localizado em São Paulo (SP), sob o número de registro SP 470401. As algas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas (- 20°C) até a análise. Esta espécie foi selecionada devido à quantidade suficiente de material necessário para execução destes e outros experimentos relacionadas à caracterização química e atividade biológica.

**Figura 9.** Local de coleta da macroalga *Adenocystis utricularis* na Península Antártica **(a)**; Arquipélago Shetland do Sul **(b)**. Adaptação de mapas de Simões et al. (2004); Muñoz et al. (2011); Teixeira et al., (2019a); Visualizador de Mapas de Banco de Dados Antárticos Digitais - SCAR (<https://www.add.scaPlar.org/>, acessado em março de 2022).



### 2. 3. 3 Isolamento e identificação dos fungos associados à macroalgas antárticas

Estão protocolados no LQOAM-NPPNS-USP três métodos de esterilização da superfície das macroalgas antárticas para isolamento de fungos associados, sendo eles:

- ✓ MI) etanol 70% por 15 segundos;
- ✓ MII) etanol 70% por 5 segundos + hipoclorito 2,5% por 5 segundos e;
- ✓ MIII) etanol 70% por 5 segundos + hipoclorito 2,5% por 10 segundos.

Dessa forma, com auxílio de bisturi para corte e de uma pinça para segurar os fragmentos, a alga *A. utricularis* foi fragmentada e esterilizada. Após esterilização, os fragmentos foram lavados 3 vezes em água destilada estéril por 2-3 s para remoção de resíduos esterilizantes. Posteriormente, os fragmentos foram acondicionados em placas de Petri contendo meio de Ágar Batata Dextrose (ABD) preparado em água do mar artificial (SWBG<sub>11</sub>) com adição de cloranfenicol (200 mg L<sup>-1</sup>). Duas placas controle (controles 1 e 2) foram utilizadas para cada método de esterilização (KJER et al., 2010; ERBERT et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2019b). A partir desses procedimentos foi possível observar o crescimento de fungos associados. Parte deste procedimento foi realizado no continente Antártico, pela Dra. Renata Spagolla N. Tavares e Profa. Dra. Hosana M. Deboni em um dos laboratórios do Navio Polar Antártico Almirante Maximiano, durante a expedição OPERANTAR XXXIV. O processo final de isolamento dos microrganismos associados foi realizado no LQOAM-NPPNS-USP. As linhagens isoladas e reativadas foram codificadas com “Au MIII pda a” e “Au MIII pda b”, sendo Au: *Adenocystis utricularis* (alga hospedeira), MIII: método de esterilização, pda: meio de cultivo “*Potato Dextrose Agar*”; a e b: linhagens de fungos isolados.

Posteriormente, as linhagens foram preservadas por meio de duas metodologias distintas: preservação em vaselina e água glicerinada, com o intuito de garantir maior viabilidade a estas linhagens. Discos de meio contendo os microrganismos isolados foram recortados das placas de Petri com auxílio de transfertubos esterilizados, e colocados em frascos do tipo penicilina contendo água glicerinada (preservação em água) ou meio ABD inclinado, com vaselina líquida esterilizada (preservação em óleo, adicionada ao meio após aproximadamente uma semana do crescimento do fungo).

Para identificação dos fungos, a princípio foi realizada a extração do DNA genômico e posteriormente a análise molecular pela amplificação por PCR e

sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Sequence* (ITS) do DNA ribossomal, utilizando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega) e sequenciado a partir dos mesmos primers com o analisador de DNA ABI3730 (Applied Biosystems). Cada sequência foi analisada utilizando o software ChromasPro (ChromasPro 1.7.6, Technelysium Pty Ltd., Tewantin QLD, Austrália). As sequências foram então comparadas com o banco de dados público de sequências genéticas disponíveis pelo Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health* - NIH) (BENSON et al., 2013), utilizando o programa BLASTn para pesquisa das espécies. Além da identificação molecular, foi realizada também a análise macro e micromorfológica dos dois fungos isolados ainda no continente Antártico. Para análise macromorfológica, inoculou-se 1 µL de uma suspensão de células fúngicas mL<sup>-1</sup> em meio ABD que foram incubados a 24 °C por 7 dias. Avaliou-se a textura, topografia, cor frente e verso da colônia e bordas. Para as análises micromorfológicas do desenvolvimento vegetativo e estrutura de reprodução assexuada dos fungos, células fúngicas foram inoculadas em um bloco de meio ágar batata dextrose (ABD) com uma lamínula estéril na superfície acima do inóculo. Cada bloco foi incubado a 24 °C por sete dias e após o crescimento do material em cada lamínula foi observado em microscopia de campo claro com objetiva de 40x. Os procedimentos de identificação dos fungos foram realizados com auxílio da doutoranda em colaboração com a Profa. Dra. Márcia R. V. Z. Kress da FCFRP-USP.

#### **2. 3. 4 Cultivo e obtenção dos extratos brutos do fungo *Penicillium echinulatum***

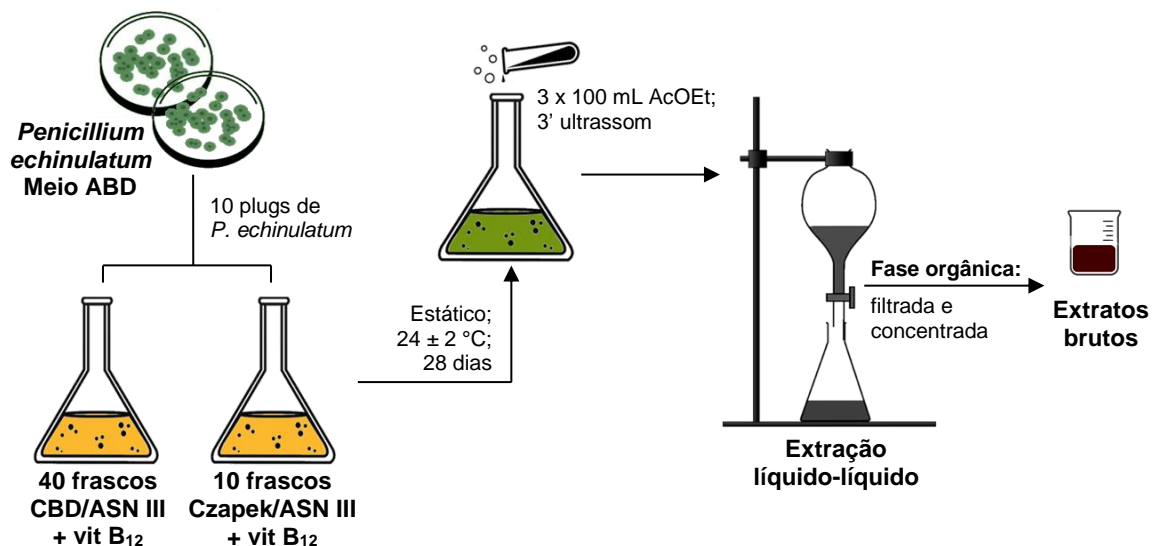
O fungo isolado com o código Au MIII pdb b foi selecionado para o cultivo em escala ampliada. Duas placas de Petri contendo meio ABD foram inoculadas com fungo *P. echinulatum* e incubadas em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) por 7 dias. Após os 7 dias, com auxílio de transfertubos, 10 plugs de meio contendo o fungo crescido foram transferidos para 40 frascos do tipo Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio caldo de batata dextrose - CBD ou para 10 frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio caldo Czapek, ambos preparados em água marinha artificial (ASNIII + vitamina B<sub>12</sub>). Frascos controles também foram preparados contendo apenas os meios de cultivo (CBD ou caldo Czapek). Todos estes procedimentos envolvendo a manipulação do microrganismo foram realizados em



capela de fluxo laminar com material esterilizado. Os cultivos foram mantidos em temperatura ambiente a  $24 \pm 2$  °C durante 28 dias, em modo estático.

Os extratos foram obtidos por extração líquido-líquido utilizando como solvente para extração 100 mL de acetato de etila (AcOEt). O processo extrativo foi realizado 3 vezes para cada Erlenmeyer (3x de 100 mL AcOEt + 3 minutos em banho de ultrassom). A fase aquosa recolhida foi devidamente descartada juntamente com restos de micélio do fungo *P. echinulatum*, enquanto a fase orgânica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório a 25 °C, sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato bruto do fungo *P. echinulatum* crescido em meio CBD (EB CBD) e em meio caldo Czapek (EB Czapek) (Fig. 10).

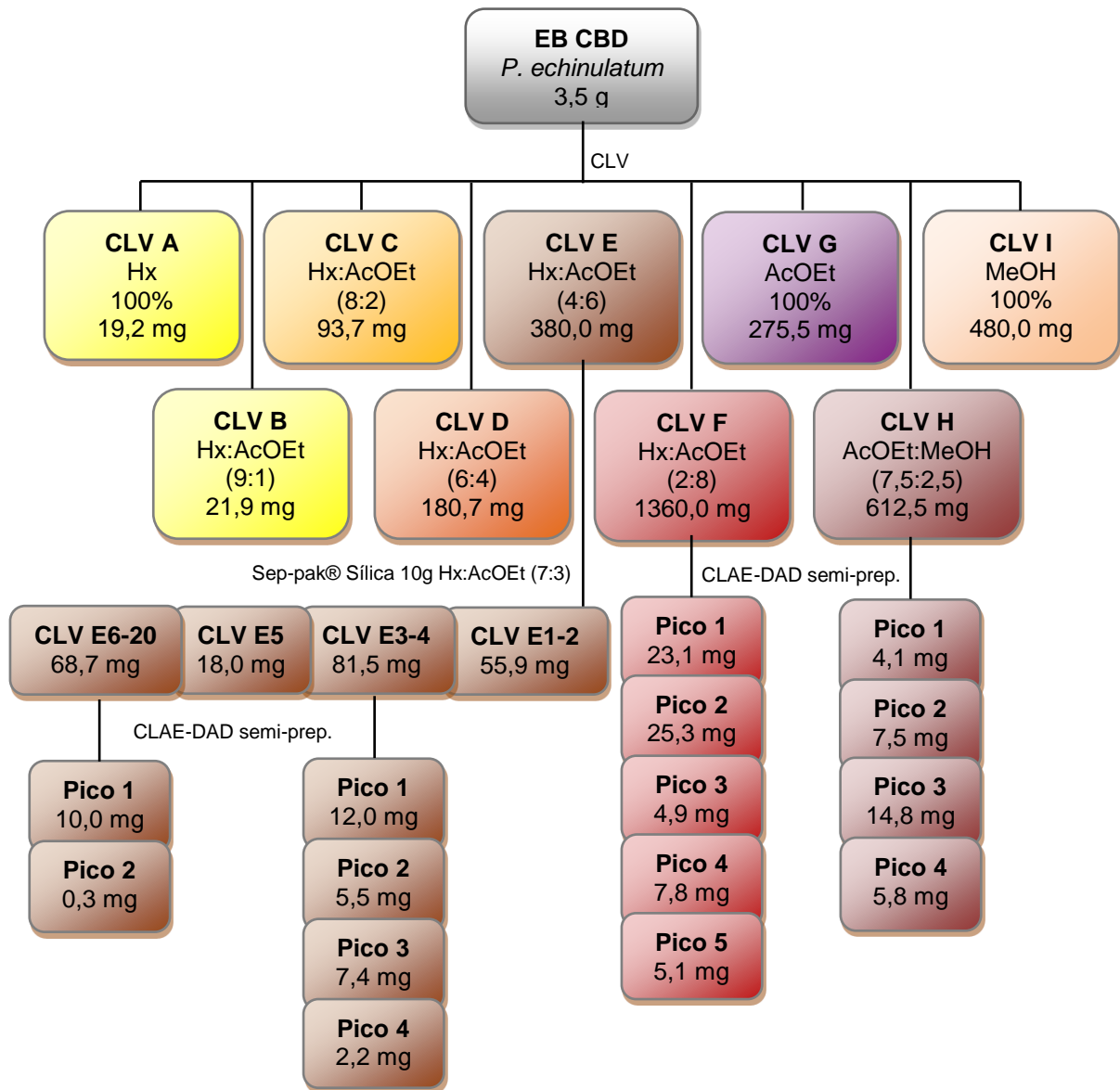
**Figura 10.** Esquema de cultivo e obtenção dos extratos brutos do fungo *P. echinulatum*.



### 2. 3. 5 Fracionamento e isolamento dos metabólitos do fungo *P. echinulatum*

Cerca de 3,5 g do extrato bruto obtido a partir do cultivo do fungo *P. echinulatum* em meio CBD (EB CBD) foi solubilizado em acetato de etila, incorporado em sílica-gel 60 (40-70 mesh) e submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV). Utilizou-se como eluentes, *n*-hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em gradiente de polaridade, obtendo-se o total de nove frações de 500 mL cada (Fr. CLV A-I) (Fig. 11). O perfil cromatográfico das frações foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e as frações Fr. CLV A e B foram reunidas. Posteriormente os perfis químicos das frações CLV AB, C e D foram avaliadas por CG-EM; e as frações CLV E, F, G, H e I por CLAE-DAD.

**Figura 11.** Fluxograma representando o fracionamento e isolamento dos metabólitos do fungo *P. echinulatum* cultivado em meio CBD (EB CBD).



Para as frações analisadas em CG-EM, os padrões de fragmentação e o índice de retenção (IR) calculado foram utilizados para caracterizar e identificar as substâncias majoritárias presentes. O IR é calculado a partir da equação 1 descrita abaixo, onde  $a$  é o alcano com número de carbonos igual ao da substância ( $b$ ) que se deseja obter o índice;  $z$  é o alcano com número de carbonos igual ao  $a+1$ .

**Equação 1**

$$100a + 100 \times \frac{[tr(b) - tr(a)]}{[tr(z) - tr(b)]}$$

Por se tratar de um estudo bioguiado, os extratos brutos e as frações obtidas foram avaliados frente a diversas atividades biológicas, as quais estão descritas no

item 2. 1. 5. A partir da triagem do potencial biológico dos extratos brutos e das frações obtidas por CLV, as frações CLV E, F e H foram fracionadas para obtenção de substâncias isoladas.

A fração CLV E foi submetida à cromatografia líquida utilizando coluna Waters Sep-pak Vac 35 cc Sílica 10 g e como eluente uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila (7:3) obtendo-se 20 subfrações, as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico apresentado em CCDC. As frações reunidas CLV E3-4 e CLV E6-20 foram analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizando coluna analítica C-8 com sistema de solventes binário água + ácido fórmico 0,2% (bomba A) e metanol (bomba B). O sistema de gradiente está apresentado na Tabela 1. As frações CLV F e H foram também analisadas em CLAE-DAD utilizando-se a mesma coluna analítica e sistema de solventes binário, porém sem adição de ácido fórmico na bomba A. O volume injetado das amostras foi de 20 µL com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, e o detector operou na faixa de  $\lambda = 200$  a 800 nm. Todas as frações foram submetidas à purificação em CLAE-DAD em fase reversa em escala semipreparativa. As amostras foram preparadas e injetadas utilizando coluna semipreparativa C-8 e os sistemas de solventes indicados na Tabela 1.

As substâncias majoritárias de cada fração foram coletadas e concentradas em um concentrador centrífugo a vácuo (SpeedVac®, Thermo) a uma temperatura de 30 °C ou com auxílio de ar comprimido a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) e ao abrigo da luz. As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectroscópicas uni e bidimensionais, como RMN <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e experimentos de DEPT 135, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC, HMBC e NOE (CLV H p1 e p2). Adicionalmente foram realizadas análises espectrométricas em alta resolução para caracterização das estruturas químicas.

**Tabela 1.** Gradientes de solventes utilizados para análise das frações CLV E3-4, CLV E6-20, CLV F e CLV H.

Fr. CLV E3-4		Fr. CLV E6-20		Fr. CLV F		Fr. CLV H	
Tempo (min.)	Bomba B Metanol	Tempo (min.)	Bomba B Metanol	Tempo (min.)	Bomba B Metanol	Tempo (min.)	Bomba B Metanol
0,01	35	0,01	55	0,01	55	0,01	15
30,00	100	4,00	100	3,00	55	3,00	15
33,00	100	10,00	100	23,00	60	30,00	100
34,00	35	11,00	55	28,00	100	35,00	100
38,00	35	13,00	55	32,00	100	36,00	15
38,01	Stop	13,01	Stop	33,00	55	40,00	15
-	-	-	-	35,00	55	40,01	Stop
-	-	-	-	35,01	Stop	-	-

### 2. 3. 6 Avaliação das atividades biológicas

O extrato bruto (EB CBD), frações e substâncias isoladas foram analisadas quanto às seguintes atividades biológicas:

#### 2. 3. 6. 1 Atividade leishmanicida

Os testes de avaliação da atividade leishmanicida foram realizados pelo aluno de doutorado Leandro C. Clementino no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara com auxílio da doutoranda e sob a supervisão da Profa. Dra. Márcia A. S. Graminha. A princípio foi avaliada a atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* (CI<sub>50</sub>). A metodologia utilizada para determinação da atividade leishmanicida frente às formas promastigota foi de acordo com aquela descrita por Rangel et al. (2019) com modificações. A cepa de leishmania foi incubada até atingir o crescimento adequado, posteriormente foi realizado o experimento em placa de 96 poços. Após o preparo das placas, estas foram incubadas em estufa DBO (demanda bioquímica do oxigênio) a 28 °C durante 72 h. Passado o tempo, adicionou-se 10 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio)/PMS (metossulfato de fenazina) e incubou-se novamente por 75 minutos. Em seguida adicionou-se duodecil sulfato de sódio SDS 10%/HCl 1M para solubilizar os cristais de formazan, e após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 595 nm (leitor de Elisa - Readwell Touch/robonik).

O cálculo do  $CI_{50}$  foi realizado por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para determinação dos desvios padrão. Para determinação do  $CI_{50}$  frente às formas amastigota de *L. amazonensis* e citotoxicidade ( $CC_{50}$ ), macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss, após exposição à solução de tioglicolato de sódio 3%, por meio de lavagem com tampão estéril (pH 7,2). Estas células foram cultivadas em meio RPMI completo e mantidas à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de  $CO_2$ , na concentração de  $5 \times 10^5$  cels  $mL^{-1}$ . Para os ensaios de citotoxicidade os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços, deixados durante 4 h para aderência, seguida de renovação do meio e inóculo dos compostos em diferentes concentrações ( $100 \mu g mL^{-1}$  a  $1,56 \mu g mL^{-1}$ ), em seguida incubadas por 24 h e a leitura realizada pelo ensaio do MTT e espectrofotômetro a 540 nm, a concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi realizada no software Bioestat. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para o ensaio em formas amastigota, os macrófagos foram inseridos em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e deixados 4h para aderência, na mesma concentração do ensaio anterior. Em seguida o meio foi renovado e foram inseridas formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5:1 (5 promastigotas para 1 macrófago) e incubados por mais 8h para diferenciação das formas promastigotas a amastigotas e internalização destas pelos macrófagos. Após este período, o sobrenadante foi descartado, renovado o meio e foram adicionadas as amostras nas concentrações de 20 a  $1,25 \mu M$  e incubados por 24 h, em seguida o sobrenadante foi descartado, adicionado metanol para fixação das células, as lamínulas foram coradas com giemsa e após secar foi realizada a leitura das lâminas através da contagem das amastigotas em microscópio óptico e o cálculo do  $CI_{50}$  foi realizado no software Bioestat. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os animais utilizados nesse estudo foram obtidos a partir da aprovação do projeto intitulado “Avaliação *in vitro* de moléculas derivadas do agente leishmanicida 14 e continuidade da investigação do potencial leishmanicida de produtos naturais marinhos”, registrada junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF – UNESP/Araraquara, SP, com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 11/2018, sob a responsabilidade do pesquisador Leandro da Costa Clementino.

Para avaliação da atividade de inibição da enzima cisteína proteinase B (CPB), uma enzima importante para virulência e escape do parasito do sistema imune do

hospedeiro as amostras foram dissolvidas em DMSO a uma concentração de 10 mM, aliquotadas e estocadas a -20 °C. Os ensaios foram realizados em placas pretas de 96 poços contendo 200 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 contendo 200 mM de NaCl e 0,01% de Triton-X100; 2 nM de enzima, 2 mM DTT e 5 µM de substrato Z-F-Arg-MCA (*Calbiochem*). As amostras foram testadas a 20 µM, e aquelas que mostraram potencial de inibição enzimática (inibição maior que 90%) foram avaliados em diferentes concentrações (de 0,3 a 10 µM, fator 2 de diluição) para determinação da concentração efetiva para inibir em 50% a atividade da enzima (CI<sub>50</sub>) (STEERT et al., 2010). Os resultados foram expressos como média ± DP de duas replicatas independentes. Para isso, a enzima foi incubada com o tampão e DTT à 30 °C por 2 minutos, seguido da adição do substrato e dos compostos. A atividade da enzima apenas com o substrato e após a adição de cada composto foi verificada por um período de 2 minutos, sendo obtidos os valores de atividade, pelo aumento ou não da fluorescência do substrato, após este período, para cada uma das situações. A atividade residual foi calculada pela razão entre o valor da atividade após e antes da adição dos compostos, bem como a concentração necessária para inibir 50% da enzima foi calculada utilizando o software Bioestat.

### 2. 3. 6. 2 Atividade antimalárica

Os testes de avaliação da atividade antimalárica foram realizados pela aluna de doutorado Laís Garcia Jordão do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob a supervisão do Prof. Dr. Adrian M. Pohlit. O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto e colaboradores (2007). As amostras foram avaliadas em placas de 96 poços contendo a suspensão de hemácias parasitadas com a cepa multiresistente K1 de *Plasmodium falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) com parasitemia inicial de 1 a 2%. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano tipo A+ inativado, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e nitrogênio balanceado). Após a incubação, foram preparados esfregaços sanguíneos, um para cada poço, para avaliação do crescimento do parasita por microscopia. A inibição do crescimento dos parasitas foi determinada pela comparação com os controles livres de drogas e branco (DMSO 1%). A concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>) foi calculada com o auxílio do software GraphPadPrism, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para os controles positivo foram utilizados os antimaláricos padrão, cloroquina e

quinina. O extrato bruto e as frações foram avaliados em triplicata e os dados para as substâncias isoladas foram gerados em dois experimentos independentes.

### 2. 3. 6. 3 Atividade anti-*Neospora*

A avaliação da atividade anti-*Neospora* foi realizada pelo doutorando Péricles Gama Abreu Filho do Laboratório de Parasitologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP sob supervisão da Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui e do pós-doutorando Luiz Miguel Pereira. As culturas de *Neospora caninum* (Nc-1 expressando  $\beta$ -galactosidase) (PEREIRA; YATSUDA, 2014) foram obtidas a partir de monocamadas de células Vero, propagadas com meio RPMI com soro fetal bovino 5% (Gibco) à 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. As formas taquizoítas do parasita foram cultivadas com meio RPMI incompleto (sem soro fetal bovino) nas mesmas condições que as células Vero. Para avaliação da atividade anti-*Neospora*, placas de 96 poços contendo células Vero confluentes foram incubadas com  $1 \times 10^3$  taquizoítas/poço (em 125  $\mu$ L de RPMI sem fenol-red) por 1 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> para invasão e início da proliferação. Estes receberam 125  $\mu$ L de RPMI (volume final de 250  $\mu$ L/poço) contendo diferentes concentrações das amostras (7 diluições) e incubadas por 72 h, 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. A proliferação de *N. caninum* foi avaliada por Chlorophenol Red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) a partir da expressão de  $\beta$ -galactosidase (PEREIRA; YATSUDA, 2014). A partir da porcentagem de inibição, a dose inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) de cada amostra foi obtida. Para o cálculo da dose CI<sub>50</sub>, cada resultado de inibição e sua respectiva dose foi analisado no programa Compusyn (CHOU, 2010). A citotoxicidade das amostras sobre as células Vero (CC<sub>50</sub>) foi verificada pelo método de viabilidade celular MTT (PEREIRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2018). Três ensaios independentes foram realizados em triplicata para as amostras avaliadas.

Além do ensaio de proliferação, também foi realizado o ensaio de avaliação da inibição da atividade peroxidase de peroxirredoxina de *Neospora caninum* recombinante (rNcPrx). Esta enzima atua principalmente na proteção do parasito dentro das células do hospedeiro. Dessa forma, a inibição da atividade peroxidase de rNcPrx foi avaliada pela capacidade de redução do peróxido de hidrogênio de acordo com o método descrito por Pushpamali e colaboradores (2008). NcPrx (1,14 - 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) recombinante foi incubada em tampão de reação contendo 50 mM de HEPES, pH 7,0 e 10 mM de DTT por 30 minutos. Posteriormente, a enzima rNcPrx (50  $\mu$ L) foi

incubada com diferentes concentrações (80; 20; 5 e 1,5  $\mu\text{M}$ , volume 50  $\mu\text{L}$ ) das amostras por 15 minutos. Após esse período, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 67  $\mu\text{M}$  – 50  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado e a reação foi interrompida com ácido tricloroacético 26% (v/v) (volume = 40  $\mu\text{L}$ ). Finalmente, 40  $\mu\text{L}$  de sulfato de amônio e ferro (10 mM) e 20  $\mu\text{L}$  de tiocianato de potássio (2,5 M) foram adicionados formando um complexo vermelho púrpura de intensidade proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio. A quantidade remanescente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estimada pela medida da absorbância a 475 nm. A remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: taxa de remoção =  $[(A_0 - A_x)/A_0] \times 100\%$ , em que  $A_0$  é a absorbância do controle sem enzima e  $A_x$  a absorbância com enzima. A partir dos valores do clearance a % de inibição da atividade de rNcPrx foi calculada:  $[(\text{MCNcPrx}-\text{CC})/\text{MCNcPrx}] \times 100$ ; sendo MCNcPrx: Média do Clearance de NcPrx; CC: Clearance composto. Dois ensaios independentes foram realizados em triplicata pela doutoranda Jade Cabreste V. Brochi sob supervisão da Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui da FCFRP-USP. Os dados foram analisados pelo teste t não pareado (nível de significância  $p < 0,05$ ) e foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### 2. 3. 6. 4 Atividade fotoprotetora

Os ensaios para avaliação da atividade fotoprotetora foram realizados pela doutoranda em colaboração com as alunas Karen C. Rangel, Camila M. Kawakami e Renata S. N. Tavares no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção da FCFRP-USP sob responsabilidade da Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro.

##### 2. 3. 6. 4. 1 Determinação do espectro de absorção no UV-VIS e do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ )

A princípio foi realizada a determinação do espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) por espectrofotometria e o cálculo do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) que corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área total entre 290 e 400 nm (Equação 2). Na equação 2  $A(\lambda)$  é a absorbância do produto no  $\lambda_c$  (DIFFEY, 1994; MANCEBO et al., 2014). Dessa forma, as amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para extratos e frações; e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para substâncias isoladas.



**Equação 2** 
$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda)d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d\lambda$$

O  $\lambda_c$  foi determinado a partir dos espectros de absorção das amostras na região de 290 a 400 nm, para o cálculo considerou-se o primeiro valor quando a razão (R) foi  $\geq 0,9$  (Equação 3). O  $\lambda_c$  permite classificar a proteção UVA, sendo que para um filtro solar ser considerado de amplo espectro deve apresentar um  $\lambda_c \geq 370$  nm (DIFFEY, 1994; MANCEBO et al., 2014).

**Equação 3** 
$$R = \frac{\int_{290}^{\lambda_c} A\lambda .d\lambda}{\int_{290}^{400} A\lambda .d\lambda}$$

#### 2. 3. 6. 4. 2 Avaliação da fotoestabilidade

A fotoestabilidade do extrato bruto, das frações (CLV AB-I) e de algumas substâncias isoladas foi determinada pela análise do espectro de absorção de suas soluções (50 ou 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em metanol, em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400 nm. As amostras foram submetidas a uma dose de radiação UVA de 4  $\text{mW cm}^{-2}$  emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) por tempo determinado, o que fornece uma dose total de 27,6  $\text{kJ cm}^{-2}$ . As amostras não irradiadas foram mantidas ao abrigo da luz e o ensaio de fotoestabilidade foi realizado em triplicata. Para determinar a fotoestabilidade utilizou-se o espectro de absorção e a área sob a curva do espectro de absorção (integral) das amostras nas faixas do UVB e UVA para calcular a redução percentual da integral entre os pares irradiados e não irradiados (100%) (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007; MACIEL et al., 2018).

#### 2. 3. 6. 4. 3 Avaliação da fototoxicidade

A fototoxicidade das amostras foi avaliada em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU) e em modelo de pele reconstituída (3D). O ensaio de fototoxicidade (3T3 NRU) foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença (+UV) e ausência (-UV) da radiação UVA, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro (NRU) (OECD, 2019a). Foi utilizada uma cultura de fibroblastos linhagem Balb 3T3, clone 31, ATCC (*American Type Culture Collection*) conforme protocolo INVITTOX nº 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998; MACIEL et al., 2018). A suspensão de fibroblastos 3T3 em DMEM

(*Dulbelcco's Modification of Eagle's Medium*) foi semeada e incubada por 24h. Após esse período as placas foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (2x) e as amostras diluídas em PBS (DMSO - dimetilsulfóxido 1%) em oito diferentes concentrações (6,74 a 100,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionadas em duas placas e incubadas por 1 h. Uma placa foi submetida à dose total de UVA de 9  $\text{kJ cm}^{-2}$  utilizando irradiância de 7  $\text{mW cm}^{-2}$  por simulador (Dr. Hönle type SOL-500; Planegg), enquanto a outra placa foi mantida ao abrigo da luz. Após irradiação, as placas foram lavadas e o meio de cultura foi restabelecido para incubação por 24 h. Após esse período as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio de cultura contendo 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do corante vital vermelho neutro por 3 h. Após a extração do corante das células, a leitura das soluções resultantes irradiadas e não irradiadas, foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas (Biotek Synergy 2). Os dados foram analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 para o cálculo do MPE (fotoefeito médio, do inglês "mean photo effect").

Para o estudo da fototoxicidade em modelo de pele reconstituída (3D), as amostras foram aplicadas diretamente nos modelos de pele na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,01 %) em óleo de gergelim. Após 24 h de incubação os modelos foram submetidos à irradiação UVA (6  $\text{J cm}^{-2}$ ), sendo que para cada modelo submetido à irradiação havia um mantido ao abrigo de luz (controle negativo). Após 24 h, as placas foram incubadas com uma solução de MTT (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) por 3 h, o sal de formazan foi extraído por 2h com isopropanol e as placas foram lidas a 570 nm (GASPAR et al., 2013; KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018). A viabilidade celular relativa foi calculada para cada tecido como porcentagem da média dos tecidos em relação ao controle negativo. O cetoprofeno (3%) foi utilizado como controle positivo (viabilidade celular no +UVA: 33,5%) e o óleo de gergelim como veículo. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes. Uma substância é considerada fototóxica quando a viabilidade celular resulta em um valor inferior a 70%.

#### 2. 3. 6. 4. 4 Avaliação da fotorreatividade

O estudo de fotorreatividade é baseado na geração de ERO: oxigênio simpleto ( $^1\text{O}_2$ ) (OS) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (AS), após irradiação das substâncias em estudo, de acordo com OECD TG 495 (OECD, 2019b). Apenas as substâncias isoladas viridicatina e viridicatol foram testadas neste ensaio. Para a determinação do oxigênio simpleto (OS) foram adicionados em tubos de microcentrífuga tampão fosfato 20 mM

pH 7,4; imidazol 0,2 mM, *p*-nitroso-*N,N*-dimetilanilina (RNO) 0,2 mM e as amostras (20 µM). Para a determinação do ânion superóxido (AS), foram adicionados em tubos de microcentrífuga tampão fosfato 20 mM pH 7,4; cloreto nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,4 mM e as amostras. Os meios reacionais foram transferidos para placas de 96 poços, as quais foram submetidas a uma pré-leitura em 440 nm (para a determinação do OS) e 560 nm (para a determinação do AS) em leitor de microplacas (Bio-Tec Instruments, modelo µ Quant), expostas a uma dose de radiação UVA (Simulador solar Dr. Hönle tipo SOL- 500 (Planegg, Alemanha) de 57 J cm<sup>-2</sup> e, em seguida, submetidas a uma nova leitura nos mesmos comprimentos de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata (3 poços) em 2 corridas independentes (n= 6) (ONOUE et al., 2013; OECD, 2019b). A geração de OS foi avaliada por meio do monitoramento do branqueamento do *p*-nitroso-*N,N*-dimetilanilina (RNO) como consequência da captura de OS pelo imidazol, o que resulta na diminuição da absorbância a 440 nm. Já a geração de AS foi avaliada por meio da redução do cloreto nitroazul de tetrazólio (NBT), o que leva ao aumento da absorbância a 560 nm. As substâncias quinina (200 µM) e salicilato de octila (20 µM) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 2. 3. 6. 4. 5 Ensaio de quantificação de ERO intracelulares induzida por radiação UVA

O ensaio de quantificação de ERO intracelulares induzida por radiação UVA foi realizado em dois modelos diferentes, sendo eles: em monocamadas, utilizando a linhagem de células HaCaT e em modelo de pele reconstituída (3D) como descritos a seguir:

Inicialmente a quantificação de ERO intracelulares foi realizada usando a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína) em queratinócitos da linhagem HaCaT (em monocamadas). As células foram semeadas em placas de 96 poços (1×10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas por 24 h, depois foram lavadas com PBS-Ca<sup>+2</sup> e tratadas por 1 h com as amostras diluídas em PBS (contendo no máximo 1% de DMSO) para obter as concentrações finais de 10,0; 5,0 e 2,5 µg mL<sup>-1</sup>. As amostras avaliadas neste ensaio foram o extrato bruto EB CBD, fração CLV E e as substâncias isoladas viridicatina e viridicatol. A quercetina e a norfloxacin foram usadas como controles de inibidor e gerador de ERO nas concentrações 10 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a incubação, as células foram lavadas (2x) com PBS-Ca<sup>+2</sup> e a solução de DCFH<sub>2</sub>-DA (10 µM) foi adicionada e incubada por 30 min. Em seguida, a

placa foi lavada com PBS-Ca<sup>2+</sup> (1x) e foram adicionados 100 µL de PBS-Ca<sup>2+</sup> em todos os poços. Por fim, a placa foi exposta à radiação UVA com dose total de 4 J cm<sup>-2</sup>, com irradiância de 6,6 mW cm<sup>-2</sup> por 10 min. ou foi protegida ao abrigo da luz. A intensidade da fluorescência foi medida imediatamente após a irradiação por um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT) a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 528 nm. A fluorescência das células irradiadas não tratadas (NT +UV) foi considerada como 100% para calcular a porcentagem relativa nas amostras.

Para o estudo de inibição de ERO intracelulares induzidas por radiação UVA em modelo de pele reconstituída (3D), os modelos de pele foram incubados com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA em PBS (50 µM) no escuro por 45 min. Após lavagem com PBS, os tecidos foram tratados com viridicatina e o viridicatol na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> (0,01 %) em óleo de gergelim. Após 1 h de incubação os modelos foram submetidos à irradiação UVA (10 J cm<sup>-2</sup>), sendo que o controle não tratado (NT) - UV foi mantido ao abrigo de luz. Imediatamente após a irradiação e lavagem dos tecidos com PBS, os mesmos foram congelados em nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes histológicos de 10 µm em criostato. As imagens das sessões de pele foram obtidas em microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc., Holland), 488 nm, utilizando 100 ms de intensidade de exposição. A intensidade de fluorescência foi calculada e quantificada utilizando o software Image J (RASMUSSEN et al., 2010; MARIONNET et al., 2014). Os resultados de intensidade de fluorescência foram normalizados em área/pixels e expressos em porcentagem de fluorescência em comparação com o controle NT +UV.

Os modelos de pele reconstituída 3D utilizados nos experimentos foram obtidos a partir do descarte de pele de participantes voluntários que foram submetidos à cirurgia de fimose, mediante assinatura do TCLE. Tais amostras foram coletadas e processadas para construção dos modelos de pele após a aprovação da emenda do projeto de doutorado da aluna Thaiz Rodrigues Teixeira no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) sob CAAE: 96779018.1.0000.5403, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.985.260 (Apêndice A).

### 2. 3. 6. 5 Atividade imunomoduladora

Os ensaios para a avaliação da atividade imunomoduladora foram realizados no Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluidos Biológicos pela aluna de

doutorado Nathália C. Canicoba e acompanhados pela doutoranda sob supervisão da Profa. Dra. Cleni M. M. Machado da FCFRP-USP.

A atividade imunomoduladora foi realizada por meio da avaliação da regulação na produção de ERO pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos. Neste ensaio a produção de ERO foi medida por quimioluminescência (QL) dependente de luminol, baseando-se nos ensaios descritos por ALVES et al. (2003). Os neutrófilos humanos foram tratados com o extrato bruto, frações CLVAB-I e as substâncias isoladas viridicatina e viridicatol extraídos do fungo *P. echinulatum*. As condições (concentrações dos neutrófilos, das amostras, de estímulos, tempo de exposição dos neutrófilos às amostras) foram previamente determinadas. As padronizações foram acompanhadas por ensaios de avaliação da citotoxicidade das amostras pelo ensaio de exclusão do corante azul de Tripan (ANDRADE et al., 2013).

Uma vez padronizadas as condições, os neutrófilos foram estimulados pelo reagente Forbol Miristato Acetato (PMA). O método consiste na mistura de neutrófilos incubados com o estímulo em um volume final de reação de 200 µL em solução de Hanks/gelatina 0,1% pH=7,2, na presença de luminol  $10^{-4}$  M. A produção de quimioluminescência (QL) foi acompanhada em luminômetro (Berthold, Centro LB 960), a 37 °C por 20 min e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). O controle de QL espontânea (controle negativo) consistiu em incubar os neutrófilos e luminol na ausência do estímulo (PMA) e das amostras testadas e, para o controle positivo da reação, os neutrófilos foram incubados com PMA na ausência das substâncias testadas. Os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado. As amostras de sangue de participantes voluntários saudáveis foram coletadas para a obtenção de neutrófilos humanos, após a aprovação do projeto de doutorado da aluna Thaiz Rodrigues Teixeira no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) sob o Protocolo CEP/FCFRP n°. 483 - CAAE: 96779018.1.0000.5403, conforme Parecer Consubstanciado do CEP n° 3.046.104 (Apêndice B).

### 2. 3. 6. 6 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP com colaboração da técnica Maria Angélica S. C. Chellegatti sob supervisão da Profa. Dra. Nieve A.J.C. Furtado. Foram determinadas as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e as concentrações inibitórias mínimas

(CIM). Para a CIM foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012) para bactérias e CLSI (2008) para fungos. Os microrganismos ensaiados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Como controles positivos foram utilizados os antibióticos padrões penicilina G (*S. aureus* e *S. saprophyticus*) e estreptomicina (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*) e o antifúngico fluconazol (*C. albicans*) em diluição seriada.

### 2. 3. 6. 7 Avaliação da toxicidade

A avaliação da toxicidade em *Galleria mellonella* foi realizada no Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP com colaboração da técnica Ludmila Tonani sob supervisão da Profa. Dra. Márcia Regina V. Z. Kress. A avaliação da toxicidade do extrato bruto EB CBD e das substâncias viridicatina e viridicatol no modelo invertebrado animal *G. mellonella* foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Ignasiak e Maxwell (2017). Para isso, foi utilizado micro seringa de Hamilton para cromatografia gasosa modelo 7000.5KH de volume de 10 µL. Para cada larva de *G. mellonella* ( $\pm$  200 mg) em seu sexto instar de desenvolvimento foram inoculados no centro da ventosa da última pró-pata direita 5 µL de extrato bruto EB CBD ou viridicatol nas concentrações finais de 3,2; 16; 80; 400 e 2000 mg Kg<sup>-1</sup> de larva e de viricatina nas concentrações finais 3,2; 16; 80; 400 mg Kg<sup>-1</sup> de larva. As substâncias isoladas foram solubilizadas em PBS-DMSO – NaCl 35 mM (Honeywell/Fluka), KCl 18 mM (J. T. Baker), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 mM (Reagen, RJ) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM J. T. Baker) com pH 7,0 e 50% DMSO (Sigma Aldrich). Como controle da qualidade das larvas, estas foram incubadas sem inoculação alguma (naïve), e como controle da inoculação foram incubadas larvas tratadas com 5 µL de PBS-DMSO. Foram inoculadas cinco larvas para cada condição experimental.

Entre uma inoculação e outra, uma rigorosa sequência de lavagens foi realizada na seringa Hamilton, cinco lavagens com *Physiological Solution of Insects* - IPS (30 mM citrato de sódio (Reagen), 150 mM NaCl (Honeywell/Fluka), 10 mM EDTA (Bio Rad), 5 mM KCl (J. T. Baker) e 100 Mm Tris (Promega), seguida de cinco lavagens com etanol 70% e PBS. Após a inoculação, as larvas foram incubadas em placas de Petri de vidro a 37 °C e privadas de alimentação e iluminação direta.

Durante todo o período experimental, as pré-pupas foram diariamente retiradas com a finalidade de retardar sua metamorfose e foi analisada a sobrevivência das larvas pela observação da presença/ausência de mobilidade e melanização. A concentração tóxica foi determinada como aquela que foi capaz de matar três ou mais larvas em cinco dias de análise. O método estatístico adotado foi o Long-rank (Mantel-Cox) com a finalidade de avaliar a significância das curvas de sobrevivência. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente. Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism5 (GraphPad software).

## 2. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

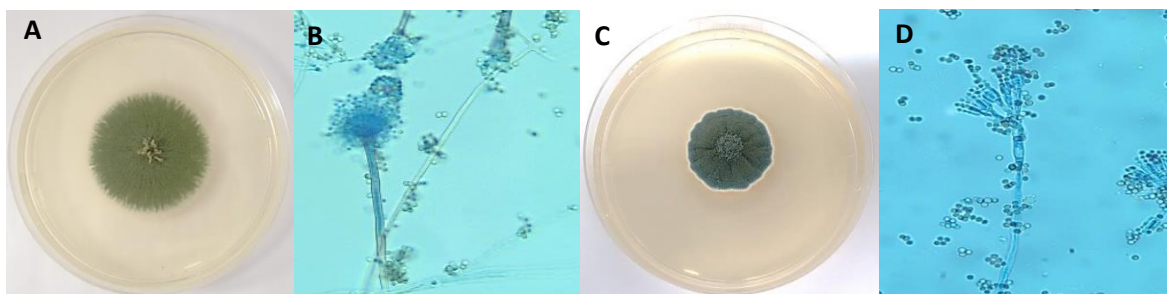
### 2. 4. 1 Identificação dos fungos associados à macroalga *A. utricularis*

A princípio foram isoladas duas linhagens de fungos associados à macroalga antártica *A. utricularis*. A partir dos resultados da morfologia externa, microcultivo e sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Sequence* ITS1 e ITS4 do DNA ribossomal, essas linhagens foram identificadas como *Aspergillus unguis* e *Penicillium echinulatum*, ambos fungos filamentosos. A espécie *A. unguis* possui como sinonímias, *Sterigmatocystis unguis*, *A. laokiashanensis* e *A. mellinus*, enquanto *P. echinulatum* pode apresentar as sinonímias *P. cyclopium* var. *echinulatum* e *P. palitans* var. *echinoconidium* (FRISVAD et al., 2004).

A linhagem de *A. unguis* apresenta a princípio coloração branca e torna-se verde do centro para as bordas e possui aspecto aveludado (Fig.12A). As hifas são asseptadas e os conídios são de forma esférica (Fig. 12B). A outra espécie identificada como *P. echinulatum* apresenta colônia de coloração verde, com bordas esbranquiçadas e aspecto aveludado (Fig. 12C). O conidióforo é ramificado e os conídios são esféricos (Fig. 12D).

Os fungos associados de origem marinha vivem de maneira harmônica com seus hospedeiros e geralmente sem causar danos. Além disso, são fontes de produtos naturais bioativos com estruturas químicas únicas e potente atividade terapêutica (ZHANG; LI; WANG, 2016).

**Figura 12.** Morfologia externa (A) e fotomicrografia do fungo *Aspergillus unguis*(B); Morfologia externa (C) e fotomicrografia do fungo *Penicillium echinulatum* (D) ambos isolados da macroalga *A. utricularis*.



Fonte: T. R. Teixeira (2017).

Na Antártica os fungos ocorrem como filamentosos e leveduras, apresentando diferentes morfologias e cores. Esses organismos possuem adaptações genéticas que



os permitem sobreviver em condições extremas como as baixas temperaturas e altos índices de radiação UV (ROSA et al., 2019). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido reportados como fungos associados a outras algas provenientes do continente Antártico, como *Acrosiphonia arcta* (*P. chrysogenum*), *Desmarestia menziesii* (*P. chrysogenum*), *Ulva intestinalis* (*P. commune*, *P. solitum* e *P. chrysogenum*), *Palmaria decipiens* (*P. chrysogenum*, *P. raistrickii*, *A. candidus*), *Phaeurus antarcticus* (*P. chrysogenum*, *P. raistrickii*, *A. terreus*) e *Adenocystis* sp. (*P. chrysogenum*, *A. conicus*, *P. citrinum* e *P. commune*) (FURBINO et al., 2014).

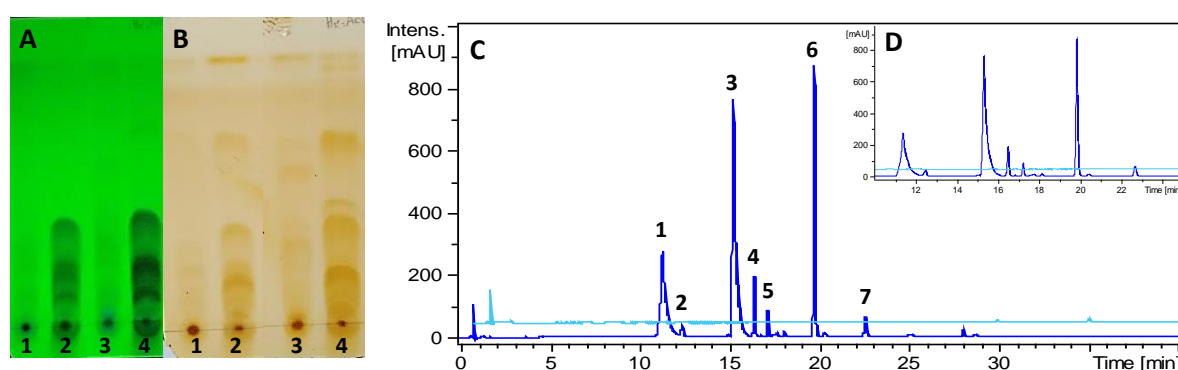
Para a espécie *A. utricularis* coletada em diferentes regiões na Antártica, como Ilhas do Rei George e Deception, outros fungos já foram isolados, são eles: *Metschnikowia australis* (LOQUE et al., 2010; DUARTE et al., 2016), *Pseudogymnoascus pannorum*, *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Oidiodendron* sp., *Phaeosphaeria herpotrichoides* e *Rhodotorula mucilaginosa* (LOQUE et al., 2010), *Debarymyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica*, *A. conicus* e *P. citrinum* (GODINHO et al., 2013), *Glaciozyma litorale*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Pseudozyma* sp., *Ustilaginaceae* sp. e *Pseudozyma tsukubaensis* (DUARTE et al., 2016), porém tais espécies de fungos não foram identificadas no presente estudo. É importante ressaltar que as duas espécies de fungos isoladas neste trabalho (*A. unguis* e *P. echinulatum*) foram submetidas aos processos de isolamento ainda dentro do navio durante a expedição OPERANTAR XXXIV e que apenas os processos finais de isolamento, reativação, conservação e identificação foram realizados no LQOAM-NPPNS-USP. Posteriormente, amostras da alga *A. utricularis* trazidas de diferentes regiões da Antártica foram submetidas a novos procedimentos para isolamento de outras linhagens de fungos associados. A partir desses novos experimentos foram isoladas outras 17 linhagens fúngicas, as quais se encontram codificadas e armazenadas no LQOAM-NPPNS-USP para utilização em trabalhos posteriores (Apêndice C).

#### **2. 4. 2 Perfil químico do fungo *P. echinulatum***

Os extratos brutos EB CBD e EB Czapek obtidos após extração líquido-líquido de 40 frascos tipo Erlenmeyers contendo o fungo crescido em meio CBD e 10 frascos tipo Erlenmeyers do fungo crescido em meio Czapek caldo apresentaram coloração marrom/caramelo e massa de 3,9 g e 1,0 g, respectivamente. Os extratos brutos e os controles foram analisados por CCDC, onde ficou evidenciado uma maior diversidade de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *P. echinulatum* em meio CBD (EB

BDC) (Fig. 13). A partir da análise do perfil cromatográfico do EB CBD podemos observar principalmente a presença de sete picos; os seus espectros de absorção em UV-visível estão apresentados na Tabela 2.

**Figura 13.** Perfil cromatográfico em CCDC dos extratos brutos EB Czapek controle (1) e EB Czapek (2), EB CBD controle (3) e EB CBD (4). Eluente: *n*-hexano:acetato de etila (6:4). Reveladores: **A)** Luz UV 254nm; **B)** Iodo ressublimado; **C)** Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato bruto EB CBD controle (azul claro) e EB CBD (azul escuro) em 254 nm; **D)** Ampliação do cromatograma na região entre 10 e 25 minutos.



**Tabela 2.** Tempo de retenção e absorção no UV dos picos observados no cromatograma do EB CBD do fungo *P. echinulatum*.

Pico	Tempo de retenção (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) <sup>a</sup>
1	11,5	<b>201</b> , 216s e 281
2	12,6	<b>225</b> , 266, 276s, 305 e 317
3	15,4	<b>202</b> , <b>226</b> , 241s, 284, 317 e 331
4	16,5	<b>212</b> , 252s e 290
5	17,3	<b>214</b> e 284
6	19,9	<b>202</b> , <b>228</b> , 240s, 288, 305, 317 e 331
7	22,7	<b>219</b> e 259

<sup>a</sup>Números em negrito indicam o  $\lambda_{\text{máx}}$ ; s: *shoulder* (ombro).

Os dados de massa, coloração e aspecto das frações obtidas após fracionamento por CLV do extrato bruto EB CBD são mostrados na Tabela 3. O extrato bruto EB CBD apresentou rendimento de 97,81%.

**Tabela 3.** Massa, cor e aspecto das frações obtidas após submissão do EB CBD à cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Fração	Massa (mg)	Cor	Aspecto
AB	41,1	Amarela	Oleosa
C	93,7	Amarela	Oleosa
D	180,7	Amarela	Pastosa
E	380,0	Marrom	Pó
F	1360,0	Vermelha	Pastosa
G	275,5	Roxa	Pastosa
H	612,5	Vinho	Pastosa
I	480,0	Marrom claro	Pastosa

Após obtenção das frações por CLV, todas foram submetidas às análises por CG-EM (frações CLV AB, C e D) ou CLAE-DAD (frações CLV E a I) para obtenção dos seus perfis cromatográficos (Tabela 4 e Fig. 14) e também foram avaliadas frente às diversas atividades biológicas.

Para identificação das substâncias por CG-EM, considerou-se apenas picos com porcentagem de área  $\geq 2\%$  que apresentaram índice de similaridade (IS) superior a 90% e que obtiveram um índice de retenção calculado próximo ao descrito na literatura. As substâncias identificadas nas frações CLV AB, C e D estão apresentadas na Tabela 4.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, extratos hexânicos da macroalga antártica *A. utricularis* e do seu fungo associado *P. echinulatum*, além de outras espécies antárticas foram analisados por CG-EM, sendo possível a caracterização do perfil lipídico desses organismos. Neste trabalho foi empregada a técnica de derivação no preparo das amostras, aumentando assim a detectabilidade das substâncias pelo aparelho. Assim, foi possível a caracterização de substâncias de grupos funcionais como ácidos, hidrocarbonetos alifáticos e esteróis. Para o fungo *P. echinulatum* os ácidos graxos: ácido hexadecanoico (2,10%), ácido linoleico (6,53%), ácido oleico (3,97%) e esteróis: ergosterol (46,68%) e seus derivados foram os principais lipídios caracterizados (TEIXEIRA et al., 2019a).

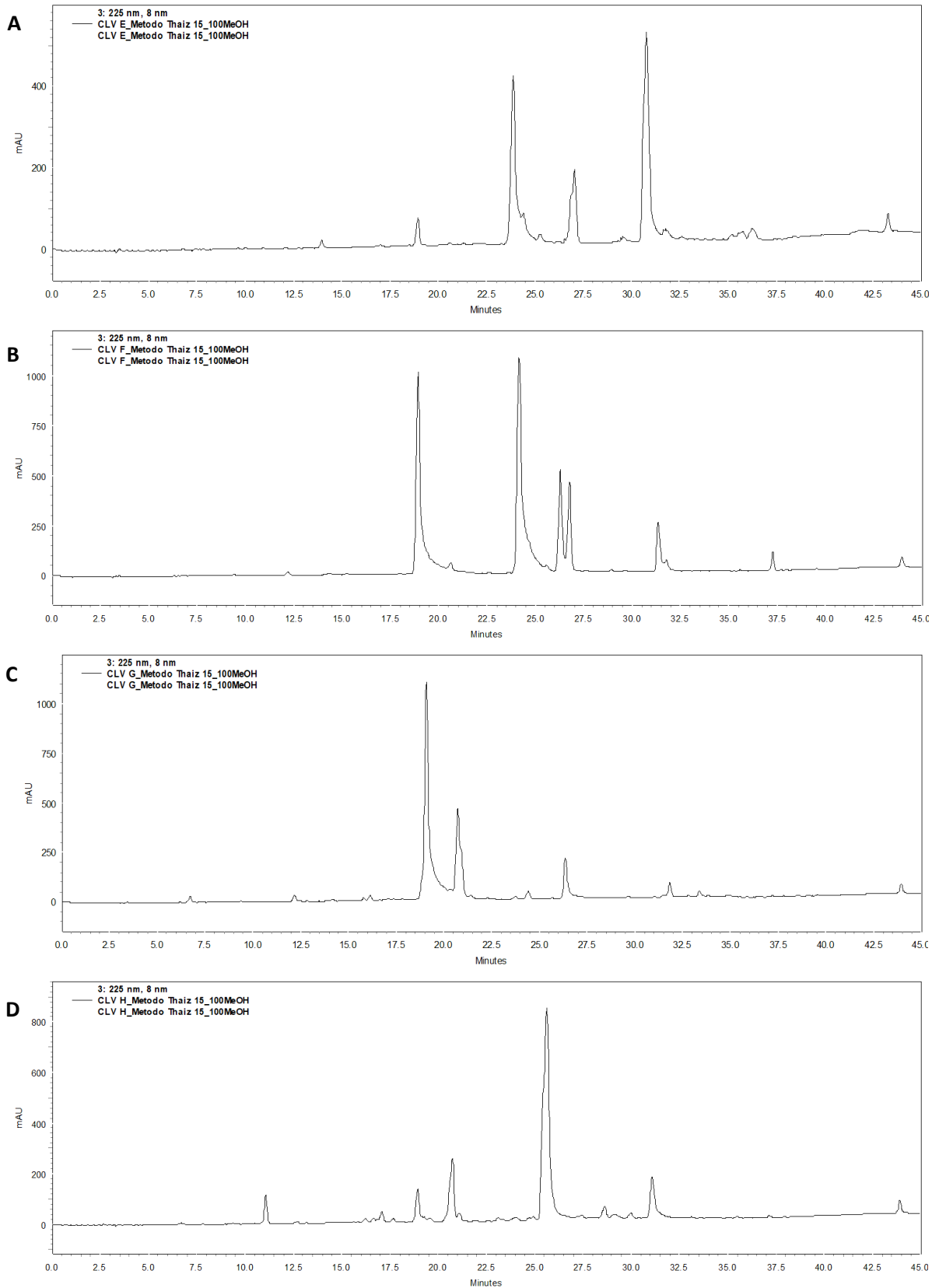
Somente o ácido hexadecanoico (10,73%) foi encontrado no presente estudo e também no trabalho anteriormente citado; pode-se observar maior concentração dessa substância na fração CLV D do fungo *P. echinulatum*.

**Tabela 4.** Substâncias identificadas nas frações CLV AB, C e D do fungo *P. echinulatum* por análises de CG-EM.

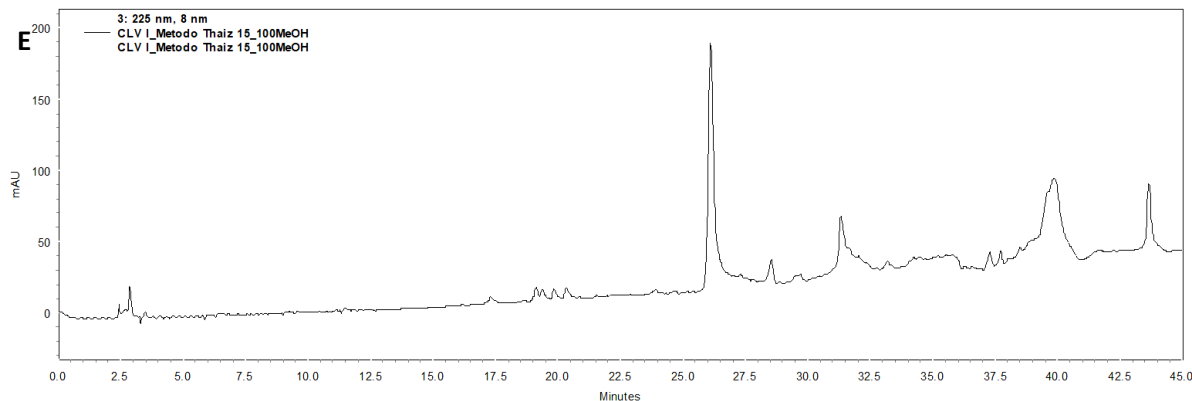
Substância	IR (exp.)	IR (lit.)	IS	Área do pico		
				CLV AB	CLV C	CLV D
2-pentanona C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	*	686 (METHVEN et al., 2007)	95	4,02	23,49	5,59
2- etil-1-butanol C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	*	836 (Nist11.lib)	92	-	9,29	-
3-metilciclopent-2-enona C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O	*	843 (Nist11.lib)	93	-	-	2,34
Ácido hexanoico C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	*	990 (WU et al., 2007)	96	-	-	3,09
3,3-dimetil-2-pentanona C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	*	769 (Nist11.lib)	91	-	-	2,88
2,4-dimetil-2,4-pentanodiol C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	*	900 (Nist11.lib)	96	-	-	6,68
4-etil octano C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	948	956 (XU et al., 2003)	93	-	4,49	-
5-metil nonano C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	950	958 (SUN; STREMPLE, 2003)	96	0,88	7,78	-
4,5-dietil octano C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	1085	1093	96	0,70	4,55	-
5,6-dimetil decano C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	1131	1135	98	4,10	18,42	-
Ácido pentadecanoico C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1844	1857 (WU et al., 2007)	95	-	-	2,04
Ácido hexadecanoico C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1948	1958 (WU et al., 2007)	94	-	-	10,73
Hexadecanoato de etila C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1981	1992 (ROUT et al., 2007)	92	2,16	-	-

IR (exp.): índice de retenção experimental; IR (lit.): índice de retenção da literatura; \*: não foi possível calcular; -: ausente.

**Figura 14.** Perfil cromatográfico das frações CLV E (A), F (B), G (C), H (D) e I (E) obtidos por CLAE-DAD em 225 nm.



*Continua...*

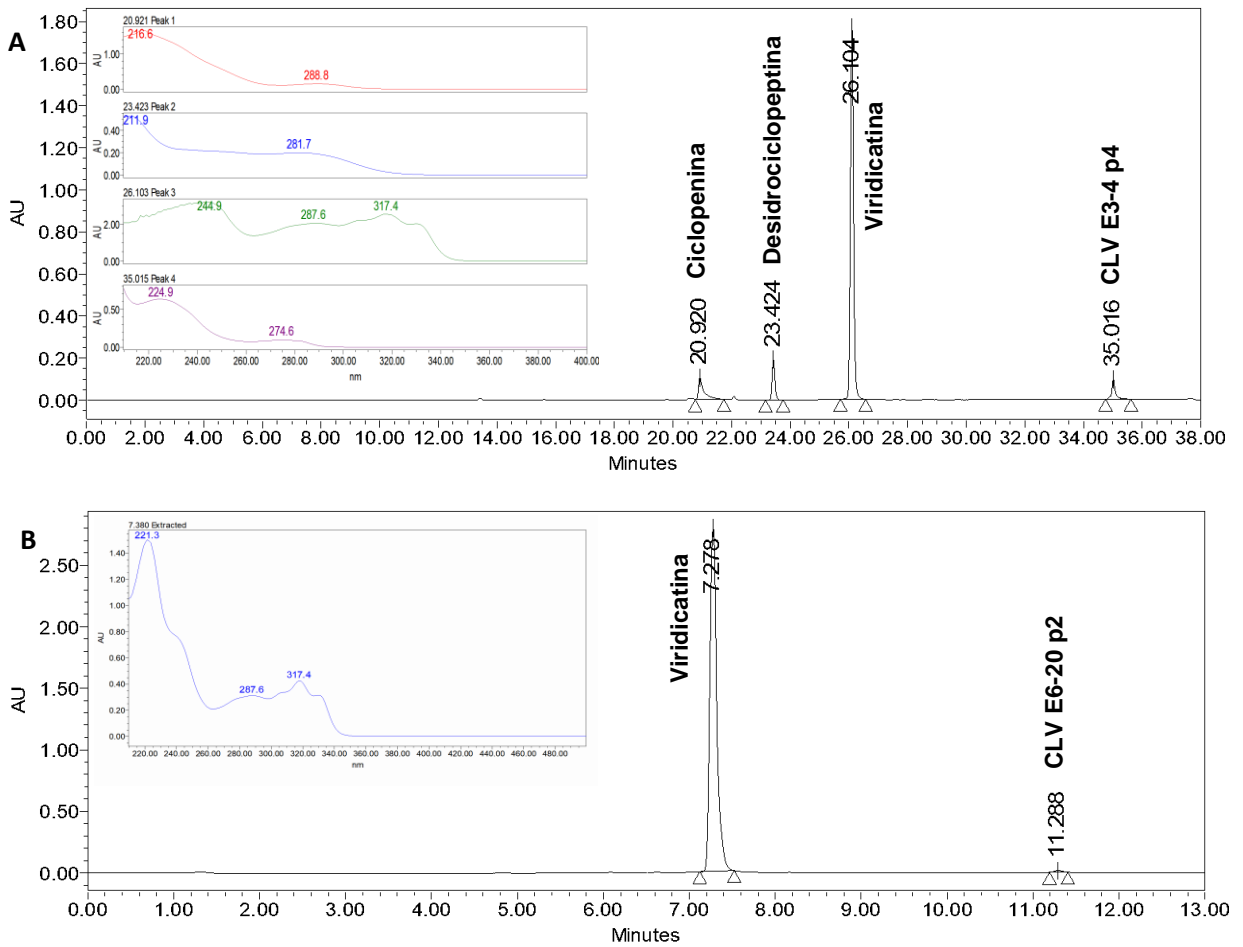


De acordo com os perfis químicos e os resultados obtidos através do estudo bioguiado do extrato bruto EB CDB e das frações; as frações CLV E, F e H foram selecionadas e então submetidas a diferentes técnicas cromatográficas para obtenção de substâncias isoladas.

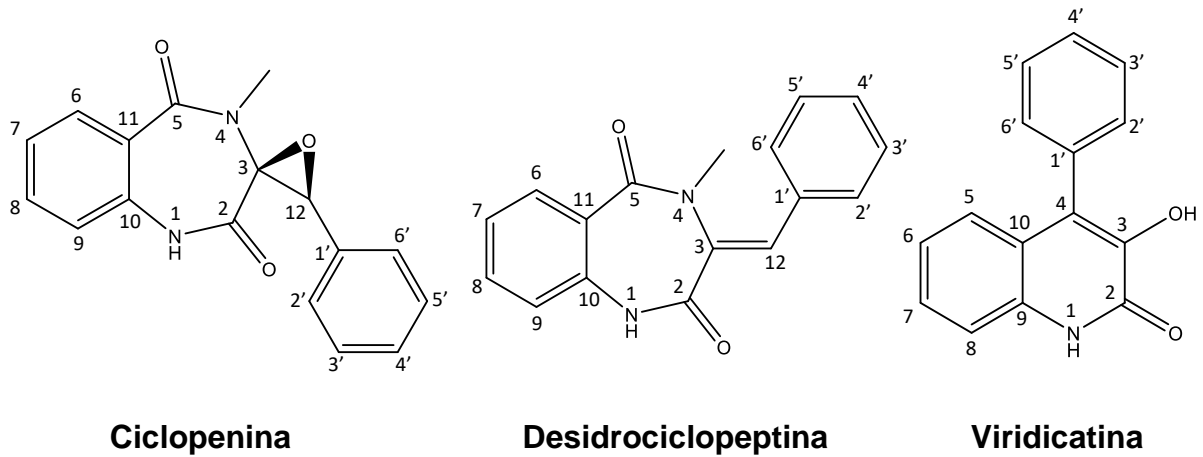
#### 2. 4. 2. 1 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV E

A partir do subfracionamento da fração CLV E (300,0 mg) utilizando a coluna Sep-pak sílica 10 g, foram obtidas as subfrações CLV E1-2 (55,9 mg), E3-4 (81,5 mg), E5 (18,0 mg) e E6-20 (58,7 mg). As frações CLV E3-4 e CLV E6-20 foram submetidas a novo processo de separação em sistema CLAE-DAD em escala semi-preparativa a fim de obterem-se substâncias isoladas (Fig. 15A e B). Dessa forma, foram isoladas quatro substâncias da fração CLV E, das quais, três foram identificadas como: ciclopenina, desidrociclopeptina e viridicatina (Fig. 16).

**Figura 15.** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa das subfrações CLV E3-4 (A) e CLV E6-20 (B) em 275 nm.



**Figura 16.** Estruturas químicas da ciclopenina, desidrociclopeptina e viridicatina.



### 2. 4. 2. 1. 1 Caracterização química da ciclopenina

Um sólido amorfo amarelo claro foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da subfração CLV E3-4, correspondente ao pico com  $t_R = 20,92$  minutos (Fig. 15A). A análise do metabólito isolado apresentou  $[\alpha]_D^{26} - 208^\circ$  (c 2,4; MeOH),  $UV_{\max}$  216 e 288 nm, fórmula molecular de  $C_{17}H_{14}N_2O_3$  (erro: - 3,1 ppm) e  $m/z$  295,1086  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  333,0603  $[M+K]^+$  e  $m/z$  589,2071  $[2M+H]^+$ .

Os dados de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  mostrados na Tabela 5 revelaram a presença de dezessete sinais de carbonos: um carbono metílico com deslocamento em  $\delta_C$  30,7, nove carbonos pertencentes aos anéis aromáticos com deslocamento químico entre  $\delta_C$  121,1 e 132,3; um sinal de carbono metínico do anel epóxido em 63,7 ppm e seis carbonos quaternários, sendo dois desses atribuídos aos carbonos carbonílicos das amidas em  $\delta_C$  165,3 e 165,8. O espectro de RMN de  $^1H$  evidenciou a presença de um sinal do tipo simpleto em uma região mais blindada do espectro, para sinais de hidrogênios metílicos, com deslocamento químico em  $\delta_H$  3,05, atribuído para  $N-CH_3$ . Outro sinal simpleto observado foi atribuído ao próton do anel epóxido em 4,34 ppm, ligado ao C-12. Ainda no espectro de RMN de  $^1H$  (Apêndice D) foram evidenciados quatro prótons pertencentes ao anel aromático correspondendo aos hidrogênios H-6 a H-9. Os prótons do outro anel aromático aparecem como pares de tripletos e dupletos acoplados em  $\delta_H$  7,19 (H-3'/5') e 6,60 (H-2'/6'), respectivamente (cada 2H,  $J = 7,6$  para H-3'/5' e  $J = 7,4$  Hz para H-2'/6'), e um sinal de tripleto em 7,27 ppm correspondente ao H-4' (1H,  $J = 7,3$  Hz). A comparação destes dados com aqueles encontrados na literatura confirma a proposta estrutural da substância ciclopenina (WANG et al., 2020).

**Tabela 5.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  ciclopenina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) comparados com dados na literatura (DMSO- $d_6$ , 150 MHz para  $^{13}C$  e 600 MHz para  $^1H$ ).

Posição	Ciclopenina (exp.)		Ciclopenina (WANG et al., 2020)	
	$\delta_C$ (mult.)	$\delta_H$ (mult., $J$ em Hz)	$\delta_C$ (mult.)	$\delta_H$ (mult., $J$ em Hz)
1	-	10,83 (s)	-	10,84 (s)
2	165,8 (C)	-	165,9 (C)	-
3	70,1 (C)	-	70,2 (C)	-
4	30,7 (CH <sub>3</sub> )	3,05 (s)	31,8 (CH <sub>3</sub> )	3,08 (s)



5	165,3 (C)	-	165,3 (C)	-
6	121,1 (CH)	7,13 (d, 8,1)	121,2 (CH)	7,16 (d, 7,8)
7	124,1 (CH)	7,06 (t, 7,6)	124,2 (CH)	7,09 (t, 7,8)
8	132,3 (CH)	7,51 (m)	132,4 (CH)	7,54 (t, 7,8)
9	130,4 (CH)	6,89 (dd, 7,8; 1,3)	130,5 (CH)	6,92 (d, 7,8)
10	135,1 (C)	-	135,2 (C)	-
11	126,4 (C)	-	126,4 (C)	-
12	63,7 (CH)	4,34 (s)	63,5 (CH)	4,36 (s)
1'	131,0 (C)	-	131,0 (C)	-
2'	126,0 (CH)	6,60 (d, 7,4)	126,1 (CH)	6,64 (d, 7,8)
3'	127,8 (CH)	7,19 (t, 7,6)	127,9 (CH)	7,22 (m)
4'	128,6 (CH)	7,27 (t, 7,3)	128,7 (CH)	7,30 (m)
5'	127,8 (CH)	7,19 (t, 7,6)	127,9 (CH)	7,22 (m)
6'	126,0 (CH)	6,60 (d, 7,4)	126,1 (CH)	6,64 (d, 7,8)

#### 2. 4. 2. 1. 2 Caracterização química da desidrociclopeptina

Um pó amarelo foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da subfração CLV E3-4, correspondente ao pico com  $t_R = 23,42$  minutos (Fig. 15A). A análise do metabólito isolado apresentou  $UV_{\text{máx}}$  211 e 281 nm, fórmula molecular de  $C_{17}H_{14}N_2O_2$  (erro: + 1,1 ppm) e  $m/z$  279,1125  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  301,0901  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  579,1978  $[2M+Na]^+$ .

Os dados de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  comparados com os dados apresentados na literatura estão apresentados na Tabela 6 confirmando a proposta estrutural da substância desidrociclopeptina (ABDEL-HADI et al., 2015). A principal diferença estrutural que podemos observar em relação a ciclopenina, descrita anteriormente, é a presença da dupla ligação entre os carbonos C-3 e C-12 para a desidrociclopeptina. Dessa forma, podemos observar no espectro de RMN de  $^{13}C$  o sinal em 133,6 ppm para o carbono quaternário C-3 e 122,0 ppm para o carbono metilênico C-12. O espectro de RMN de  $^1H$  evidenciou a presença de um sinal do tipo simpleto atribuído ao próton olefínico H-12 em  $\delta_H$  6,91 (Apêndice E).

**Tabela 6.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  da desidrociclopeptina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) comparados com dados da literatura ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  e 400 MHz para  $^1\text{H}$ ).

Posição	Desidrociclopeptina (exp.)		Desidrociclopeptina (ABDEL-HADI et al., 2015)	
	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., <i>J</i> em Hz)
1	-	-	-	-
2	172,4 (C)	-	172,4 (C)	-
3	133,6 (C)	-	133,6 (C)	-
4	36,1 ( $\text{CH}_3$ )	3,11 (s)	36,1 ( $\text{CH}_3$ )	3,13 (s)
5	169,0 (C)	-	169,0 (C)	-
6	134,0 (CH)	7,89 (dd, 7,9; 1,4)	135,3 (CH)	7,90 (d, 8,0)
7	131,8 (CH)	7,27 (m)	131,8 (CH)	7,28 (t, 7,5)
8	131,8 (CH)	7,53 (td, 8,2; 1,5)	131,8 (CH)	7,54 (t, 7,5)
9	125,8 (CH)	7,13 (d, 8,1)	125,8 (CH)	7,13 (d, 8,0)
10	137,9 (C)	-	137,9 (C)	-
11	126,8 (C)	-	126,7 (C)	-
12	122,0 (CH)	6,91 (s)	122,0 (CH)	6,92 (s)
1'	135,4 (C)	-	135,3 (C)	-
2'	130,2 (CH)	7,40 (m)	130,2 (CH)	7,35 (d, 8,0)
3'	130,1 (CH)	7,35 (m)	130,1 (CH)	7,39 (d, 8,0)
4'	130,9 (CH)	7,40 (m)	130,9 (CH)	7,42 (t, 7,5)
5'	130,1 (CH)	7,35 (m)	130,1 (CH)	7,39 (d, 8,0)
6'	130,2 (CH)	7,40 (m)	130,2 (CH)	7,35 (d, 8,0)

#### 2. 4. 2. 1. 3 Caracterização química da viridicatina

Um pó marrom foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da subfração CLV E3-4 e CLV E6-20, correspondentes aos picos com  $t_{\text{R}} = 26,10$  (Fig. 15A) e 7,27 (Fig. 15B) minutos, respectivamente. A análise do metabólito isolado apresentou  $\text{UV}_{\text{máx}}$  221, 287, 317, 330 nm, fórmula molecular de  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$  (erro: - 1,1 ppm) e  $m/z$  238,0865  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  260,0630  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  497,1460  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Os dados de RMN são mostrados na Tabela 7. A comparação destes dados com aqueles obtidos na literatura confirma a proposta estrutural da substância viridicatina (ZHANG et al., 2022).

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelaram a presença de quinze sinais de carbonos, incluindo nove carbonos pertencentes ao anel aromático com deslocamento químico entre  $\delta_{\text{C}}$  115,2 e 129,8, além de mostrar seis carbonos quaternários, um deles atribuído à carbonila do grupamento amida ( $\delta_{\text{C}}$  158,2, C-2). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice F) mostrou nove prótons pertencentes aos anéis aromáticos com deslocamentos químicos intercambiáveis nos intervalos de  $\delta_{\text{H}}$  7,03-7,08 e 7,51 e dois sinais mais desblindados em 12,25 ppm para um grupo NH e em  $\delta_{\text{H}}$  9,21 para o grupo hidroxila na posição C-3.

**Tabela 7.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  da viridicatina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

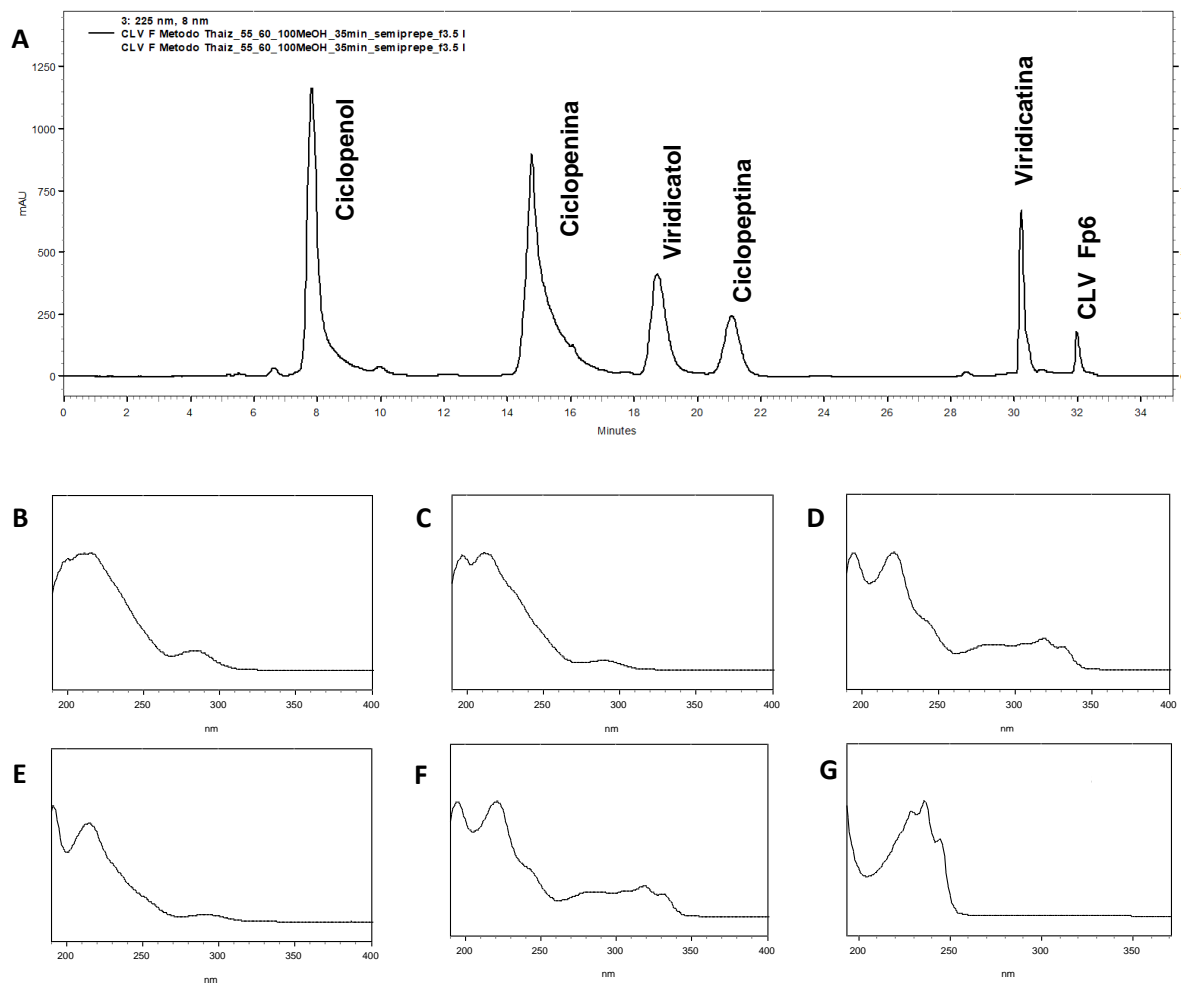
Posição	Viridicatina (exp.)		Viridicatina (ZHANG et al., 2022)	
	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)
1	-	12,25 (s)	-	12,19 (s)
2	158,2 (C)	-	158,2 (C)	-
3	142,4 (C)	9,24 (s)	142,4 (C)	9,13 (s)
4	127,6 (C)	-	127,6 (C)	-
5	126,4 (CH)	7,03-7,08 (m)	126,4 (CH)	7,06 (dd, 8,0; 1,5)
6	122,1 (CH)	7,30-7,35 (m)	122,1 (CH)	7,07 (td, 8,0; 2,0)
7	123,9 (CH)	7,51 (t, 7,4)	123,9 (CH)	7,44 (tt, 7,5; 1,5)
8	115,2 (CH)	7,43 (t, 7,2)	115,2 (CH)	7,51 (d, 7,5)
9	120,9 (C)	-	120,9 (C)	-
10	133,1 (C)	-	133,1 (C)	-
1'	133,7 (C)	-	133,7 (C)	-
2'	129,8 (CH)	7,30-7,35 (m)	130,0 (CH)	7,34 (m) <sup>a</sup>
3'	128,3 (CH)	7,30-7,35 (m)	128,3 (CH)	7,34 (m) <sup>a</sup>
4'	124,3 (CH)	7,51 (t, 7,4)	124,3 (CH)	7,52 (tt, 7,5; 1,5)
5'	128,3 (CH)	7,30-7,35 (m)	128,3 (CH)	7,34 (m) <sup>a</sup>
6'	129,8 (CH)	7,30-7,35 (m)	129,9 (CH)	7,34 (m) <sup>a</sup>

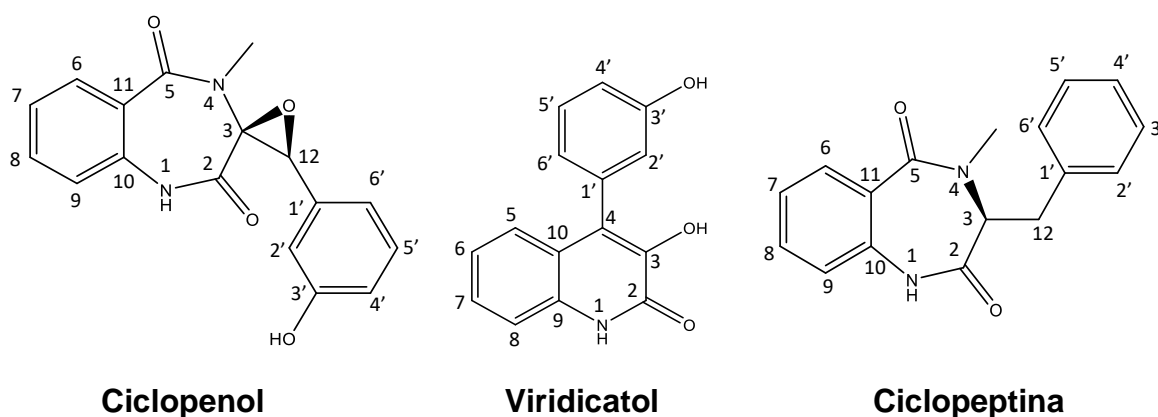
<sup>a</sup> Os deslocamentos químicos são intercambiáveis.

### 2. 4. 2. 2 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV F

A partir do fracionamento da fração CLV F (400,0 mg) em sistema CLAE-DAD escala semipreparativa foram obtidas cinco substâncias isoladas (Fig. 17), as quais foram identificadas como: ciclopenol (23,1 mg), ciclopenina (25,3 mg), viridicatol (4,9 mg), ciclopeptina (7,8 mg) e viridicatina (5,1 mg) (Fig. 18). Sendo que, a caracterização química das substâncias ciclopenina e viridicatina já foi anteriormente descrita.

**Figura 17.** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa da fração CLV F em 225 nm **(A)**. Espectros de absorção no UV do ciclopenol –  $t_R$ : 7,84 min. **(B)**, da ciclopenina -  $t_R$ : 14,78 min. **(C)**, do viridicatol -  $t_R$ : 18,73 min. **(D)**, da ciclopeptina -  $t_R$ : 21,08 min. **(E)**, da viridicatina -  $t_R$ : 18,73 min. **(F)** e do pico 6 -  $t_R$ : 31,98 min. **(G)**.



**Figura 18.** Estruturas químicas do ciclopenol, viridicatol e ciclopeptina.

#### 2. 4. 2. 2. 1 Caracterização química do ciclopenol

Um pó amarelo foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da fração CLV F correspondente ao pico com  $t_R = 7,84$  minutos. A análise do metabólito isolado apresentou  $[\alpha]_D^{26} - 168^\circ$  (c 2,3; MeOH),  $UV_{\max}$  198, 217, 280 nm, fórmula molecular de  $C_{17}H_{14}N_2O_4$  (erro: 4,9 ppm) e  $m/z$  311,1011  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  333,0794  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  621,1944  $[2M+H]^+$ .

Os dados de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  mostrados na Tabela 8 são bastante semelhantes aqueles obtidos para a substância ciclopenina, sendo a principal diferença a presença do grupamento hidroxila na posição orto do carbono C-3', sendo que as multiplicidades dos hidrogênios H-2', H-4', H-5' e H-6' confirmam a presença do sistema aromático 1,3-dissubstituído. O sinal do tipo simpleto em  $\delta_H$  10,78 foi atribuído ao hidrogênio do grupo NH do anel indol, enquanto o grupo hidroxila em C-3' foi observado em 9,42 ppm também em um sinal simpleto (Apêndice G). A comparação destes dados com aqueles encontrados na literatura confirma a proposta estrutural da substância ciclopenol (WANG et al., 2020).

**Tabela 8.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  do ciclopenol (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 150 MHz para  $^{13}C$  e 600 MHz para  $^1H$ ).

Posição	Ciclopenol (exp.)		Ciclopenol (WANG et al., 2020)	
	$\delta_C$ (mult.)	$\delta_H$ (mult., J em Hz)	$\delta_C$ (mult.)	$\delta_H$ (mult., J em Hz)
1	-	10,78 (s)	-	10,81 (s)
2	166,0 (C)	-	166,0 (C)	-

3	70,1 (C)	-	70,1 (C)	-
4	30,8 (CH <sub>3</sub> )	3,02 (s)	30,9 (CH <sub>3</sub> )	3,06 (s)
5	165,3 (C)	-	165,4 (C)	-
6	130,5 (CH)	6,96 (dd, 7,9; 1,3)	130,5 (CH)	7,00 (m)
7	124,2 (CH)	7,05 (t, 7,9)	124,3 (CH)	7,10 (t, 7,8)
8	132,3 (CH)	7,49 (m)	132,4 (CH)	7,53 (t, 7,8)
9	121,0 (CH)	7,10 (d, 8,0)	121,1 (CH)	7,14 (d, 7,8)
10	135,0 (C)	-	135,1 (C)	-
11	126,4 (C)	-	126,5 (C)	-
12	63,7 (CH)	4,20 (s)	63,8 (CH)	4,24 (s)
1'	132,2 (C)	-	132,3 (C)	-
2'	112,7 (CH)	6,06 (s)	112,8 (CH)	6,11 (s)
3'	156,9 (C)	9,42 (s)	156,9 (C)	9,45 (s)
4'	115,6 (CH)	6,61 (dd, 8,0; 2,1)	115,7 (CH)	6,66 (d, 7,8)
5'	128,8 (CH)	6,93 (t, 7,9)	128,9 (CH)	6,97 (m)
6'	116,9 (CH)	5,95 (d, 7,9)	117,0 (CH)	6,99 (d, 7,8)

#### 2. 4. 2 .2. 2 Caracterização química do viridicatol

Um pó marrom esbranquiçado foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da fração CLV F correspondente ao pico com  $t_R = 18,73$  minutos. A análise do metabólito isolado apresentou  $UV_{m\acute{a}x}$  226, 240, 284, 317, 331 nm, fórmula molecular de  $C_{15}H_{11}NO_3$  (erro: - 0,9 ppm) e  $m/z$  254,0814  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  276,0644  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  507,1518  $[2M+H]^+$ .

Os dados de RMN de  $^{13}C$  e  $^1H$  apresentados na tabela 9 em comparação com os dados obtidos na literatura confirma a proposta estrutural da substância viridicatol (FREMLIN et al., 2009). O espectro de RMN de  $^1H$  mostra oito prótons pertencentes aos anéis aromáticos com deslocamentos químicos entre 6,67 a 7,30 ppm. Alguns sinais na região aromática foram sobrepostos. O sistema aromático 1,3-dissubstituído é constituído pelo prótons H-2', H-4', H-5' e H-6', sendo que os hidrogênios H-2' e H-4' foram deslocados para região de menos deslocamento do espectro quando comparados a viridicatina, devido ao efeito de blindagem promovido pelo grupo hidroxila na posição C-3' (simpleto largo em 9,50 ppm). Ainda no espectro de RMN de  $^1H$ , foram observados outros dois sinais do tipo simpleto mais desblindados em 12,19

e 9,13 ppm para os grupos NH e hidroxila ligada carbono C-3, respectivamente (Apêndice H).

**Tabela 9.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  do viridicatol (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) em comparação com dados da literatura (DMSO- $d_6$ , 600 MHz).

Posição	Viridicatol (exp.)		Viridicatol (FREMLIN et al., 2009)	
	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ em Hz)
1	-	12,16 (s)	-	12,19 (s)
2	158,3 (C)	-	158,3 (C)	-
3	124,0 (C)	9,11 (s)	124,0 (C)	9,13 (s)
4	133,1 (C)	-	133,1 (C)	-
5	126,4 (CH)	7,30 (m)	126,4 (CH)	7,31 (m)
6	122,1 (CH)	7,03 (m)	122,1 (CH)	7,08 (ddd, 8,1; 6,0; 1,9)
7	124,5 (CH)	7,03 (m)	124,4 (CH)	7,11 (m)
8	115,2 (CH)	7,30 (m)	115,2 (CH)	7,33 (m)
9	142,2 (C)	-	142,2 (C)	-
10	120,9 (C)	-	120,9 (C)	-
1'	134,9 (C)	-	134,9 (C)	-
2'	116,7 (CH)	6,67 (m)	116,7 (CH)	6,71 (m)
3'	157,3 (C)	9,50 (s)	157,3 (C)	9,51 (s)
4'	114,6 (CH)	6,77 (m)	114,6 (CH)	6,83 (ddd, 8,2; 2,3; 1,1)
5'	129,4 (CH)	7,27 (m)	129,3 (CH)	7,30 (t, 7,6)
6'	120,4 (CH)	6,67 (m)	120,3 (CH)	6,72 (m)

#### 2. 4. 2. 2. 3 Caracterização química da ciclopeptina

Um pó branco foi obtido a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da fração CLV F correspondente ao pico com  $t_{\text{R}} = 21,08$  minutos. A análise do metabólito isolado apresentou  $[\alpha]_D^{26} - 62,62^\circ$  (c 0,7; MeOH),  $\text{UV}_{\text{máx}}$  212, 230, 251, 290 nm, fórmula molecular de  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  (erro: 0,3 ppm) e  $m/z$  281,1284  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  303,1073  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  561,2479  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentados na Tabela 10 e Apêndice I revelaram a presença de dois isômeros conformacionais na proporção de 2:1, conforme relatado anteriormente para a substância ciclopeptina (ISHIKAWA et al., 2014; ZHANG et al., 2022).

**Tabela 10.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  dos confórmeros da ciclopeptina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) comparados com dados da literatura (CDCl $_3$ , 500 MHz).

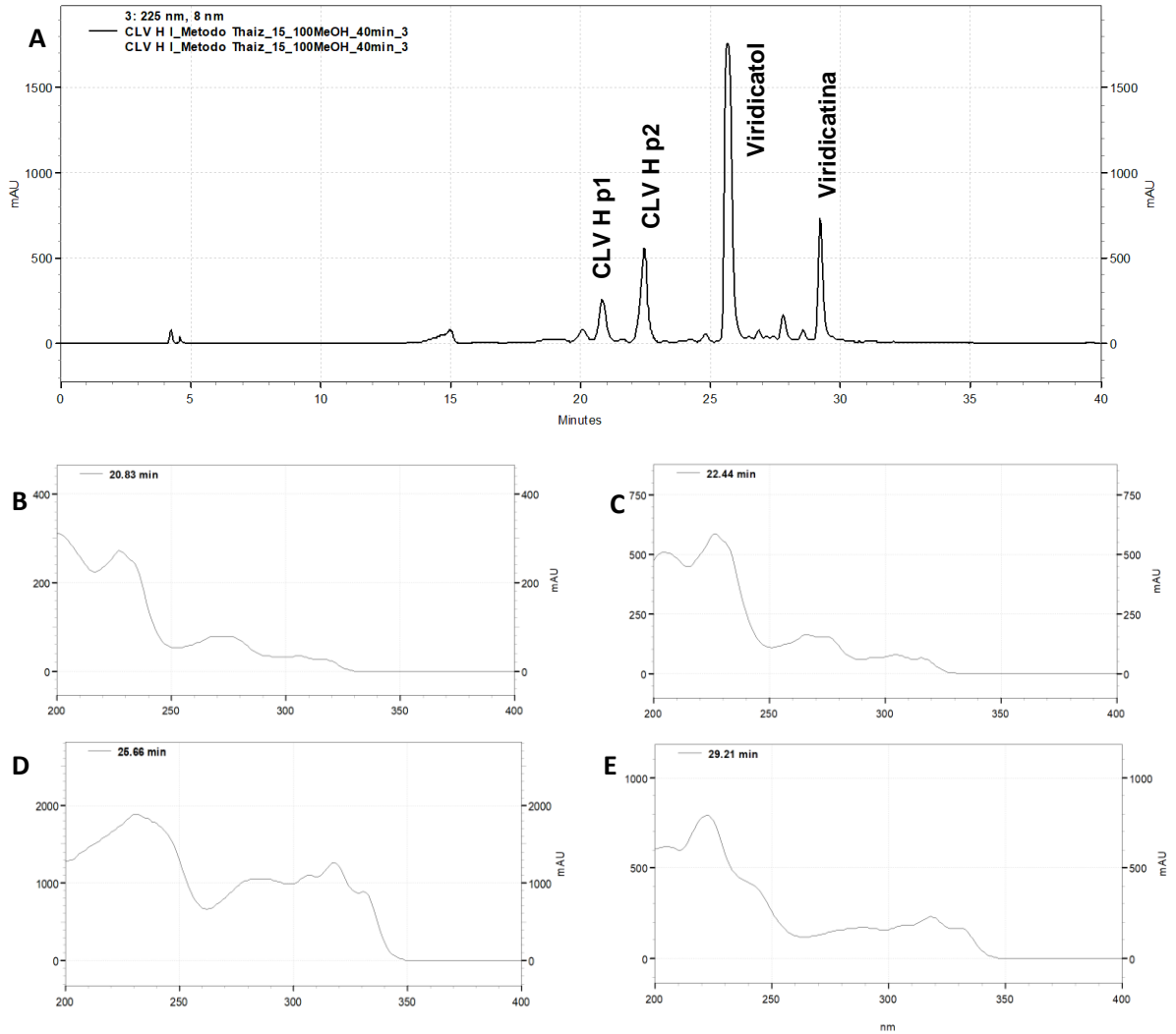
Posição	Ciclopeptina (exp.)		Ciclopeptina (ZHANG et al., 2022)	
	a	b	a	b
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)
1	10,49 (s)	10,63 (s)	9,04 (s)	9,38 (s)
2	-	-	-	-
3	4,30 (q, 7,5)	4,30 (q, 7,5)	4,35 (dd, 7,5; 6,0)	4,27 (dd, 11,5; 6,0)
4	2,92 (s)	2,85 (s)	3,15 (s)	2,91 (s)
5	-	-	-	-
6	7,70 (d, 7,4)	7,83 (d, 7,7)	7,97 (d, 8,0)	8,11 (d, 7,0)
7	7,20-7,27 (m)	7,20-7,27 (m)	7,27 (m)	7,34 (t, 7,8)
8	7,48 (t, 7,6)	7,55 (t, 7,3)	7,47 (t, 8,0)	7,53 (t, 8,0)
9	6,99 (d, 7,2)	7,05 (d, 8,0)	7,01 (d, 8,5)	6,94 (d, 8,5)
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12a	3,13-3,21 (m)	2,55-2,64 (m)	3,22 (dd, 14,0; 6,0)	2,71 (dd, 13,5; 11,5)
12b	3,26 (dd, 14,4; 7,5)	2,70 (dd, 13,4; 7,7)	3,49 (dd, 14,0; 7,5)	2,85 (dd, 13,5; 6,0)
1'	-	-	-	-
2'	7,20-7,27 (m)	7,20-7,27 (m)	7,27 (m)	7,27 (m)
3'	7,14-7,19 (m)	7,14-7,19 (m)	7,23 (m)	7,23 (m)
4'	7,20-7,27 (m)	7,20-7,27 (m)	7,02 (t, 7,8)	7,02 (t, 7,8)
5'	7,14-7,19 (m)	7,14-7,19 (m)	7,23 (m)	7,23 (m)
6'	7,20-7,27 (m)	7,20-7,27 (m)	7,27 (m)	7,27 (m)

#### 2. 4. 2. 3 Isolamento e caracterização química das substâncias majoritárias da fração CLV H

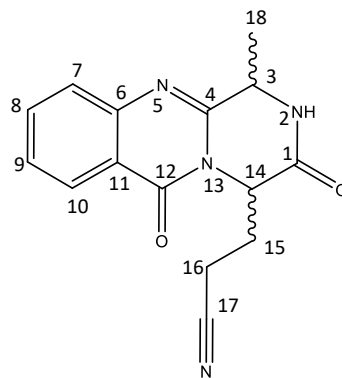
A partir do fracionamento da fração CLV H (425,5 mg) em sistema CLAE-DAD escala semipreparativa foram obtidas quatro substâncias isoladas (Fig. 19), um par de diastereoisômeros considerado inédito (CLV H p1 e p2) (Fig. 20), e outras duas substâncias já identificadas, o viridicatol (14,8 mg) e a viridicatina (5,8 mg), anteriormente descritas.



**Figura 19.** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD em escala semipreparativa da fração CLV H em 225 nm (A). Espectros de absorção no UV do pico 1 –  $t_R$ : 20,83 min. (B), do pico 2 -  $t_R$ : 22,44 min. (C), do viridicatol -  $t_R$ : 25,66 min. (D) e da viridicatina -  $t_R$ : 29,21 min. (E).



**Figura 20.** Proposta estrutural para os isômeros CLV H p1 e p2.



**CLV H p1 e p2**

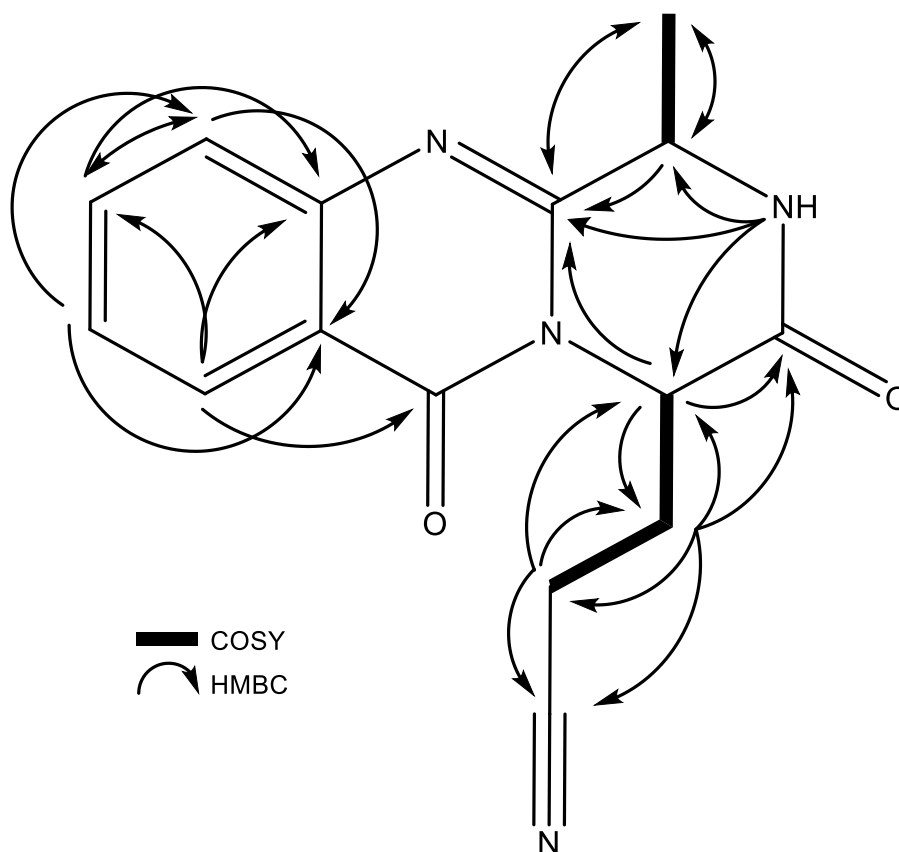
#### 2. 4. 2. 3. 1 Elucidação estrutural das substâncias CLV H p1 e p2

Óleos amarelos foram obtidos a partir da purificação cromatográfica em CLAE-DAD semipreparativo da fração CLV H correspondentes aos picos  $t_R = 20,43$  (CLV H p1) e  $22,44$  (CLV H p2) minutos. A análise dos metabólitos isolados apresentaram  $[\alpha]_D^{26} + 160,7^\circ$  (c 3,8; MeOH) e  $+ 198,1^\circ$  (c 2,0; MeOH) para CLV H p1 e CLV H p2, respectivamente, além de mesmo perfil de absorção no UV com  $UV_{m\acute{a}x}$  220, 265, 276, 304, 316 nm, mesma fórmula molecular  $C_{15}H_{14}N_4O_2$  (erro: 1,0 ppm) baseado em EMAR(ESI),  $m/z$  305,0981  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  587,2083  $[2M+Na]^+$ . Os dados espectroscópicos para essas moléculas podem ser encontrados do Apêndice J ao Apêndice U.

Os dados de RMN de  $^{13}C$  mostrados na Tabela 11 evidenciam a presença de quinze sinais de carbonos, incluindo o carbonos metílicos com deslocamentos em  $\delta_c$  24,31 (CLV H p1) e 16,26 (CLV H p2), seis carbonos pertencentes ao anel aromático com deslocamento químico entre 119,86 e 147,07 ppm para CLV H p1 e entre 120,10 e 147,00 ppm para CLV H p2, dois sinais de carbonos metínicos em 51,32 (C-3) e 53,72 (C-14) ppm em CLV H p1 e 48,42 (C-3) e 54,83 (C-14) ppm em CLV H p2, além de dois carbonos metilênicos alifáticos em 28,87 (C-15) e 14,42 (C-16) ppm (CLV H p1) e 26,47 (C-15) e 13,98 (C-16) ppm (CLV H p2); seis carbonos quaternários, dois desses atribuídos aos carbonos carbonílicos das amidas em  $\delta_c$  165,48 e 160,26 para CLV H p1 e  $\delta_c$  167,20 e 160,60 para CLV H p2. Os espectros de RMN de  $^1H$  evidenciaram a presença de um duplete, integrando para três hidrogênios em uma região mais blindada do espectro com deslocamento químico em  $\delta_H$  1,58 (CLV H p1) e 1,57 (CLV H p2), atribuídos ao  $CH_3$  do C-18. Um sinal do tipo duplo-duplete foi atribuído ao próton H-14 em  $\delta_H$  4,93 para CLV H p1, enquanto para CLV H p2 este mesmo próton aparece  $\delta_H$  5,13 como um tripleto, sugerindo configurações absolutas diferentes entre as moléculas para o carbono quiral C-14, assim como o hidrogênio do C-3, que aparece como um multiplete com deslocamento em 4,58 ppm para CLV H p1 e um quarteto em 4,90 ppm para CLV H p2. Também foram mostrados no espectro de RMN de  $^1H$  dois multipletos para os hidrogênios H-15 em  $\delta_H$  2,14 e 2,25 (CLV H p1) e em  $\delta_H$  2,21 e 2,24 (CLV H p2) evidenciando que esses prótons não são equivalentes. Além de quatro prótons pertencentes ao anel aromático (H7-H10) que aparecem com deslocamento entre 7,55 a 8,16 ppm (CLV H p1) e 7,56 a 8,15 ppm (CLV H p2) (Tabela 11). Correlações adicionais de NOE (*Nuclear Overhauser enhancement*) dos hidrogênios H-3, H-14, H-15, H-16 e H-18 (CLV H p1) e H-3, H-14,

H-15 e H-18 (CLV H p2) também foram obtidas para auxiliar na determinação da configuração absoluta das substâncias, porém experimentos adicionais estão sendo realizados para concluir a correta estereoquímica das substâncias CLV H p1 e p2 (TAKAHASHI et al., 1995; CHENG et al., 2018; KALININA et al., 2018).

**Figura 21.** Correlações de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMBC das substâncias CLV H p1 e p2.



**Tabela 11.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMBC de CLV H p1 e p2 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

Posição	CLV H p1				CLV H p2			
	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ em Hz)	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ em Hz)	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC
1	165,5 (C)	-	-	-	167,2 (C)	-	-	-
2	-	8,83 (d, 3,7)	3	3 e 4	-	8,79 (s)	-	3, 4 e 14
3	51,3 (CH)	4,58 (m)	2 e 18	4	48,4 (CH)	4,90 (q, 6,5)	18	4 e 18
4	152,1 (C)	-	-	-	152,9 (C)	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	147,1 (C)	-	-	-	147,0 (C)	-	-	-
7	126,8 (CH)	7,65 (d, 8,1)	8	11	127,3 (CH)	7,68 (d, 8,1)	8	8 e 11
8	134,8 (CH)	7,85 (m)	9	6 e 7	134,5 (CH)	7,85 (m)	7 e 9	6 e 7
9	126,7 (CH)	7,55 (m)	8 e 10	7 e 11	127,0 (CH)	7,56 (m)	8 e 10	7 e 11
10	126,3 (CH)	8,16 (dd, 0,9; 7,9)	9	6, 8 e 12	126,1 (CH)	8,15 (dd, 1,6; 8,0)	9	6, 8 e 12
11	119,9 (C)	-	-	-	120,1 (C)	-	-	-
12	160,3 (C)	-	-	-	160,6 (C)	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	53,7 (CH)	4,93 (dd, 5,2; 9,1)	15	1, 4 e 15	54,8 (CH)	5,13 (t, 7,7)	15	1, 4 e 15
15a	28,9 (CH <sub>2</sub> )	2,25 (m)	-	1, 14, 16 e 17	26,5 (CH <sub>2</sub> )	2,26 (m)	14 e 16	1, 14, 16 e 17
15b		2,14 (m)	16			2,21 (m)		
16	14,4 (CH <sub>2</sub> )	2,74 (t, 7,2)	15	14, 15 e 17	13,9 (CH <sub>2</sub> )	2,65 (m)	15	14,15 e 17
17	119,7 (C)	-	-	-	120,0 (C)	-	-	-
18	24,3 (CH <sub>3</sub> )	1,58 (d, 7,1)	3	3 e 4	16,3 (CH <sub>3</sub> )	1,57 (d, 6,5)	3	3 e 4

Os alcaloides quinolínicos têm sido isolados do micélio e do meio de cultivo dos fungos *P. cyclopium*, *P. puberulum* e *P. viridicatum*. A ciclopenina e o ciclopenol são intermediários da formação da viridicatina e viridicatol pela ação da enzima ciclopenase. Um composto derivado da viridicatina, a substância 3-metoxiviridicatina é ativa contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e é produzida por *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. aurantiocandidum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. cyclopium*, *P. discolor*, *P. echinulatum*, *P. freii*, *P. hirsutum*, *P. neoechinulatum*, *P. palitans*, *P. polonicum*, *P. radicolica*, *P. solitum*, *P. venetum* e *P. vulpinum*. Entretanto, os fungos das espécies *P. commune*, *P. crustosum*, *P. discolor*, *P. echinulatum*, *P. palitans*, *P. solitum*, *P. vulpinum* produzem muito mais viridicatina do que 3-metoxiviridicatina, o que corrobora com os resultados do presente estudo, uma vez que a viridicatina foi o metabólito majoritário produzido pelo fungo *P. echinulatum* (FRISVAD et al., 2004; KUMAR et al., 2018).

As substâncias, viridicatina e viridicatol extraídas do fungo *P. polonicum*, o qual foi isolado das brânquias de um tubarão apresentaram potencial ação antitumoral por inibirem metaloproteínases da matriz. Essas substâncias são as principais enzimas na degradação da matriz extracelular, ou seja, elas favorecem o crescimento de tumores e estão relacionadas com metástases e invasões de células tumorais a tecidos saudáveis (LIANG et al., 2019).

Além disso, o viridicatol atua como agente anti-inflamatório, suprimindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios (WEI; YANG, 2015), apresentou efeito citotóxico contra células tumorais (WEI et al., 2011) e inibiu seletivamente PTP1B, um potencial alvo de drogas para o tratamento de diabetes tipo 2 e obesidade (SOHN et al., 2013).

Os metabólitos biossintetizados por fungos do gênero *Penicillium* apresentam uma variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (ABDEL-HADI et al., 2015). Esses resultados demonstram a importância de se estudar e avaliar os metabólitos produzidos por estes fungos na busca por substâncias bioativas.

### **2. 4. 3 Avaliação das atividades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas do fungo *P. echinulatum***

#### **2. 4. 3. 1 Atividade leishmanicida**

Os resultados da avaliação do potencial leishmanicida dos EB CBD, EB Czapek e seus controles, além das frações CLVAB-I estão apresentados na Tabela 12. De acordo com os resultados obtidos, ambos os extratos brutos apresentaram atividade leishmanicida promissora ( $CI_{50} < 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). De todas as frações obtidas por CLV do EB CBD a que apresentou melhor atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* foi a fração CLV E ( $CI_{50}$ :  $25,7 \pm 1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Uma amostra é considerada potencial agente leishmanicida quando apresenta valores de  $CI_{50}$  menores que  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  para misturas complexas como extratos brutos e de  $CI_{50}$  menor que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para frações mais purificadas. É importante considerar que neste ensaio foram avaliados extratos brutos e frações e que diferentes substâncias presentes nessas amostras podem estar contribuindo tanto para a atividade parasiticida quanto citotóxica, por isso é importante avaliar também as substâncias isoladas de cada fração. Dessa forma, todos os compostos isolados da fração CLV E, além do viridicatol (devido à sua semelhança estrutural com a viridicatina) foram avaliados frente às formas pro e amastigota do parasita *L. amazonensis*. A viridicatina apresentou o valor de  $CI_{50\text{AMA}}$  de  $17,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$  e índice de seletividade (IS)  $>25$  e o viridicatol  $CI_{50\text{AMA}}$  de  $8,40 \pm 0,20 \mu\text{M}$  e IS  $>47$  para a forma amastigota de *L. amazonensis*, a forma mais relevante do parasita responsável pelo desenvolvimento da Leishmaniose cutânea. Tanto a viridicatina, quanto o viridicatol são mais seguros em comparação com a anfotericina B ( $CI_{50\text{AMA}} = 5,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , IS = 3,9), considerando seu índice de seletividade (IS =  $CC_{50}/CI_{50}$ ), a viridicatina e o viridicatol são cerca de 6 e 12 vezes mais seletivos para o parasita do que para as células do hospedeiro, respectivamente; indicando baixo potencial citotóxico e, conseqüentemente, sua segurança deve ser considerada no processo de descoberta de novas drogas para leishmaniose (Tabela 13).

Além dos resultados apresentados, foi realizado também o ensaio de inibição da CPB; a viridicatina apresentou  $CI_{50}$  de  $11,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ , o que mostra seu potencial para atuar como leishmanicida inibindo essa importante enzima que atua na virulência e escape do parasito do sistema imune no hospedeiro. O viridicatol não apresentou atividade.

**Tabela 12.** Ensaio da atividade leishmanicida dos extratos brutos (EB CBD e EB Czapek) e frações CLV frente à forma promastigota de *L. amazonensis*.

<b>Extratos</b>	<b>CI<sub>50</sub>PRO (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
EB CBD	21,2
Controle EB CBD	> 500
EB Czapek	15,2
Controle EB Czapek	> 500
<b>Frações</b>	<b>CI<sub>50</sub>PRO (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
CLV AB	>100
CLV C	41,9 ± 0,2
CLV D	42,7 ± 0,2
CLV E	25,7 ± 1,4
CLV F	80,3 ± 0,7
CLV G	94,9 ± 0,2
CLV H	> 100
CLV I	> 100
Anfotericina B	5,03 ± 0,5

**Tabela 13.** Ensaio da atividade leishmanicida das substâncias isoladas da fração CLV E frente às formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*.

<b>Amostra</b>	<b>CI<sub>50</sub>PRO (µM)</b>	<b>IS</b>	<b>CI<sub>50</sub>AMA (µM)</b>	<b>IS</b>	<b>CC<sub>50</sub> (µM)</b>
Ciclopenina	7,0 ± 0,3	> 48	> 20	> 17	> 340
Desidrociclopeptina	-	-	> 20	> 17	> 359
Viridicatina	84,0 ± 5,1	> 5	17,0 ± 0,6	> 25	> 422
Viridicatol	> 100	> 4	8,4 ± 0,2	> 47	> 395
Anfotericina B	1,6 ± 0,1	15,3	5,4 ± 0,7	3,9	25,0 ± 2,5

Godinho e colaboradores (2013) investigaram a atividade tripanocida dos extratos etanólicos dos fungos *Penicillium* sp. UFMG 6034 e *Penicillium* sp. UFMG 6120, isolados de algas antárticas pardas e verdes, contra *Trypanosoma cruzi*. Estes extratos apresentaram CI<sub>50</sub> de 1,28 µg mL<sup>-1</sup> e 0,48 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente contra formas tripomastigotas do parasito, não havendo dados sobre toxicidade. Para a

macroalga utilizada neste estudo (*A. utricularis*), este é o primeiro relato de atividade antiparasitária atribuída a um fungo associado.

Considerando o aumento na taxa de resistência *in vitro* e *in vivo* aos fármacos disponíveis para tratamento das leishmanioses devido à exposição intermitente, o número limitado destes, assim como o seu efeito tóxico associado, bem como o aumento no número de casos de Leishmaniose visceral em pacientes portadores do vírus HIV torna indispensável à busca por novos fármacos para o tratamento das leishmanioses (SANTOS et al., 2008; SINGH; SUNDAR, 2014).

#### 2. 4. 3. 2 Atividade antimalárica

De acordo com os resultados obtidos da avaliação do potencial antimalárico do EB CBD, das frações obtidas por CLV e de substâncias isoladas foi possível observar que todas as frações apresentaram atividade, exceto as frações CLV H e I (Tabela 14). O extrato bruto EB CBD apresentou apenas 49,9 % de inibição do crescimento a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e dentre as substâncias isoladas avaliadas a ciclopenina foi considerada ativa ( $\text{Cl}_{50} = 3,37 \pm 0,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a desidrociclopeptina, moderadamente ativa com valor de  $\text{Cl}_{50}$  de  $5,95 \pm 0,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a viridicatina inativa ( $\text{Cl}_{50} = 16,05 \pm 1,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 15). Extratos são considerados ativos quando apresentam de 80 a 100%, parcialmente ativos com 50 a 79% e inativos com porcentagem de inibição menor que 50 %. Enquanto, substâncias isoladas são consideradas muito ativas quando apresentam valor de  $\text{Cl}_{50} < 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ativas de  $0,1$  a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , atividade moderada com  $\text{Cl}_{50}$  de  $5$  a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e inativas com  $\text{Cl}_{50} > 11 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ANDRADE-NETO et al., 2007). De acordo com esses resultados, podemos concluir que a atividade apresentada pela fração CLV E ocorre devido a presença de substâncias minoritárias, como por exemplo, ciclopenina e desidrociclopeptina, ou ainda devido ao efeito sinérgico de todas as substâncias que compõem essa fração.

A malária, doença causada pelo parasita *P. falciparum* transmitido pela fêmea infectada do mosquito *Anopheles* atinge principalmente a região Norte do Brasil e na maioria dos casos o seu tratamento é por meio da utilização das drogas cloroquina e quinina. Porém, algumas cepas do parasito são e continuam se tornando resistentes a essas e outras drogas utilizadas para o tratamento desta doença (OMS, 2022b). Sendo assim, justifica-se a busca por novos medicamentos com potencial atividade antimalárica a partir de fontes naturais assim como os metabólitos do fungo *P. echinulatum*.



**Tabela 14.** Inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* das amostras avaliadas.

Amostras	Classificação da atividade	Redução do crescimento do parasita (%)	
		50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	5 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
EB BDC	I	49,9	20,7
CLV AB	A	95,4	60,1
CLV C	A	90,9	90,0
CLV D	A	95,9	65,0
CLV E	A	96,9	20,1
CLV F	A	93,5	7,5
CLV G	A	94,9	18,4
CLV H	I	27,9	17,8
CLV I	I	25,4	24,8

A = ativa e I = inativa.

**Tabela 15.** Concentração inibitória 50 % ( $CI_{50}$ ) *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

Substâncias	Classificação da atividade	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	IS
Ciclopenina	A	$3,37 \pm 0,64$	> 100	> 29,67
Desidrociclopeptina	AM	$5,95 \pm 1,71$	> 100	> 16,80
Viridicatina	I	$16,05 \pm 1,91$	> 100	> 5,40
Hidrocloridrato de quinina	-	$0,14 \pm 0,30$	-	-

A = ativa, AM = atividade moderada e I = inativa.

#### 2. 4. 3. 3 Atividade anti-Neospora

O extrato bruto do fungo *P. echinulatum* e as frações CLV C, D e E apresentaram bons resultados frente ao parasita *N. caninum* como pode ser observado na Tabela 16. Além desses resultados a substância isolada da fração CLV E, a viridicatina também foi ativa contra o parasita ( $CI_{50}$   $9,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) e apresentou alta seletividade para o parasita (IS > 45,3). O agente etiológico de neosporose, o protozoário *N. caninum* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo um importante agente patogênico para bovinos e cães. O parasita pode causar doença neurológica, gastrointestinal, respiratória e muscular em cães, além de abortos em bovinos o que acarreta grandes perdas econômicas na produção animal. Da mesma forma que outros parasitas, como *Plasmodium* e *Toxoplasma*, a neosporose também pode ser

combatida por drogas antiparasitárias, porém esse recurso é subutilizado e não há tratamento baseado em ferramentas sólidas contra neosporose (PEREIRA et al., 2017).

Além do ensaio de proliferação do parasita *N. caninum*, foi realizado também o ensaio de inibição da enzima importante para o desenvolvimento do parasita nas células do hospedeiro. Os resultados deste ensaio mostraram que para todas as concentrações analisados, a viridicatina e o viridicatol (80 - 1,5  $\mu\text{M}$ ) foram capazes de inibir a atividade peroxidase da enzima rNcPrx ( $p < 0,05$ ). Sendo que a inibição variou de  $10,08 \pm 3,18$  a  $13,52 \pm 3,67$  % para viridicatina e de  $6,17 \pm 1,41$  a  $19,85 \pm 2,02$  % para o viridicatol.

**Tabela 16.** Ensaio da atividade anti-*Neospora* do extrato bruto, frações CLV e substâncias isoladas frente ao parasita *Neospora caninum*.

<b>Extratos</b>	<b>CI<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>CC<sub>50</sub>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>IS</b>
EB BDC	$9,7 \pm 5,8$	> 100	> 10,3
Controle EB BDC	> 100	> 100	> 1
<b>Frações</b>	<b>CI<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>CC<sub>50</sub>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>IS</b>
CLV AB	$3,8 \pm 1,8$	> 100	> 26,3
CLV C	$2,0 \pm 1,9$	> 100	> 50,0
CLV D	$2,1 \pm 1,0$	$85,0 \pm 1,4$	40,7
CLV E	$2,7 \pm 1,7$	$29,9 \pm 11,1$	11,0
CLV F	$21,1 \pm 19,8$	> 100	> 4,7
CLV G	$12,3 \pm 10,1$	> 100	> 8,1
CLV H	$8,5 \pm 4,0$	> 100	> 11,7
CLV I	$43,4 \pm 5,2$	> 100	> 2,3
<b>Substâncias</b>	<b>CI<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>CC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>IS</b>
Ciclopenina	$49,3 \pm 8,9$	> 340,1	> 6,9
Desidrociclopeptina	$112,5 \pm 23,2$	> 359,7	> 3,2
Viridicatina	$9,3 \pm 0,1$	> 421,9	> 45,3
Pirimetamina	$0,3 \pm 0,1$	195,8	650

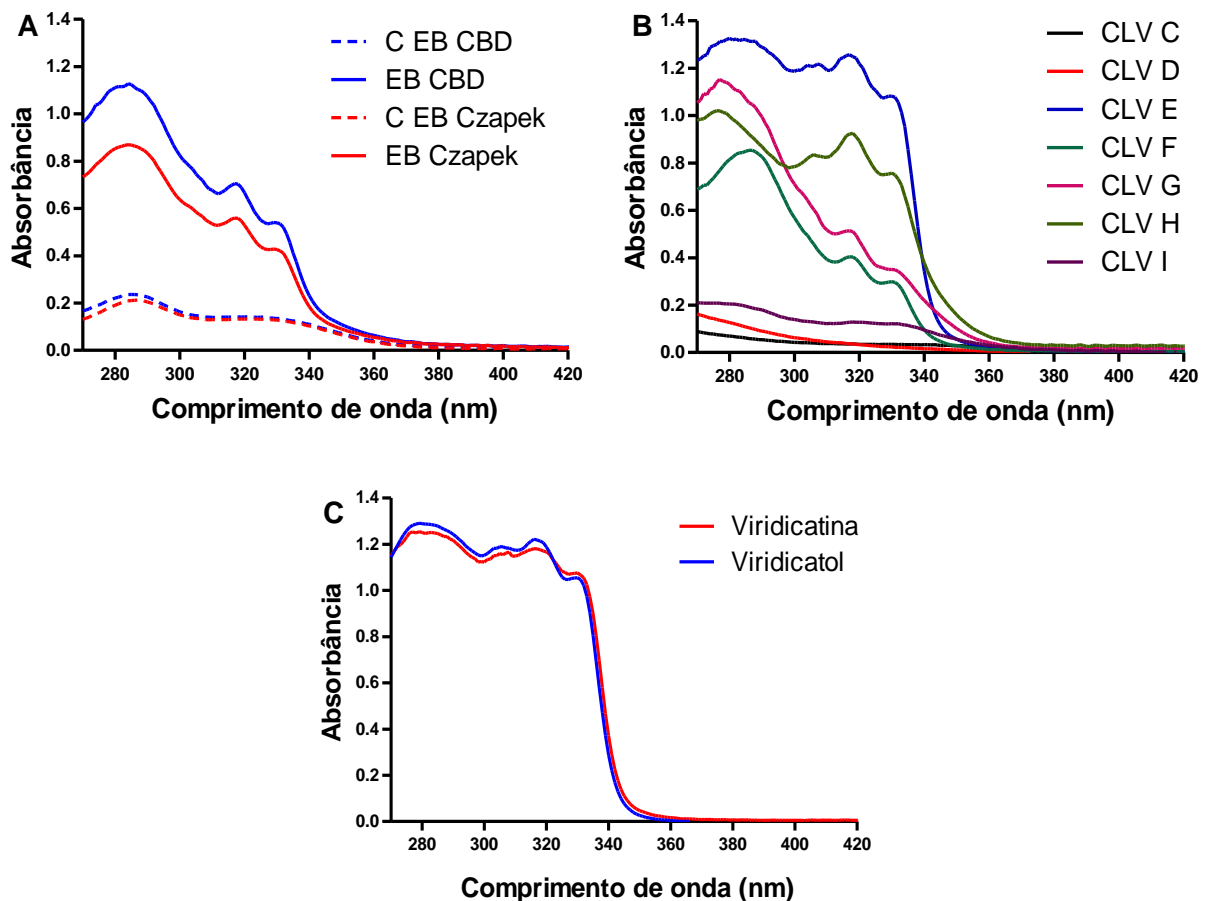
#### 2. 4.3.4 Atividade fotoprotetora

2. 4. 3. 4.1 Determinação do espectro de absorção no UV e do comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ )

De acordo com os resultados apresentados foi possível observar que o extrato bruto obtido a partir do cultivo do fungo em meio CBD (EBCBD) apresentou maior absorção da radiação UV principalmente na região de UVB(280 a 320 nm) quando comparado com o extrato bruto obtido a partir do cultivo de *P. echinulatum* em meio Czapek caldo (EB Czapek) (Fig. 22A). As frações CLV C-I (Fig. 22B) e as substâncias isoladas, viridicatina e viridicatol (Fig. 22C) apresentaram absorção na região de UVB (280-320 nm) e UVA-2 (320-340 nm), sendo que a fração CLV E, da qual foi isolada a viridicatina, apresentou maior absorção que as demais e a fração CLV H, de onde foi isolado o viridicatol apresentou perfil de absorção no UV semelhante.

Em relação ao comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ), a viridicatina e o viridicatol apresentaram  $\lambda_c$  de 335 e 334 nm, respectivamente, portanto, ambas as substâncias atuam principalmente como absorvedores de UVB e UVA-2.

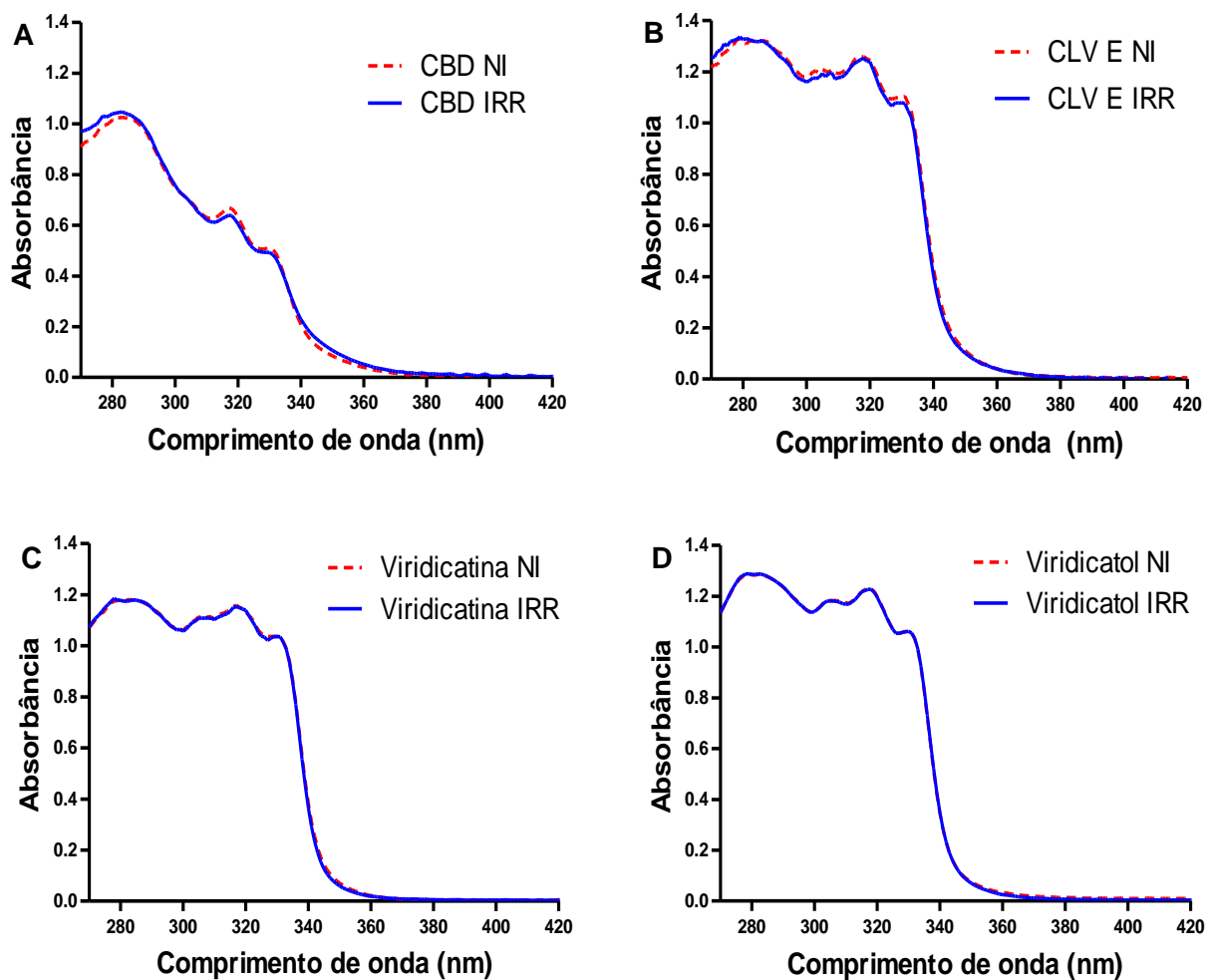
**Figura 22. A)** Espectros de varredura dos extratos brutos (EB CBD e EB Czapek) e seus controles (C EB CBD e C EB Czapek), sendo: EB BDC (linha azul), controle EB BDC (linha azul pontilhada), EB Czapek (linha vermelha) e controle EB Czapek (linha vermelha pontilhada); **B)** Espectros de varredura das frações obtidas por CLV (CLV C-I); **C)** Espectro de varredura da viridicatina e do viridicatol.



#### 2. 4. 3. 4. 2 Avaliação da fotoestabilidade

Comprovada a absorção da radiação UV do extrato bruto EB CBD e da fração CLV E, o ensaio de fotoestabilidade foi realizado (em triplicata) e como pode ser observado nas Figuras 23A e B, ambas as amostras permaneceram estáveis após serem irradiadas pela luz no comprimento de onda da radiação UVA (320-400 nm) (Tabela 17). Diante dos resultados promissores apresentados pela fração CLV E, um dos compostos isolados, a viridicatina, também foi avaliada quanto à fotoestabilidade, bem como o viridicatol, devido à sua semelhança estrutural e de absorção da radiação UV.

**Figura 23. A)** Ensaio de fotoestabilidade do extrato bruto EB CBD; **B)** da fração CLV E; **C)** da viridicatina e; **D)** do viridicatol. Amostras irradiadas (linhas azuis) e amostras não irradiadas (linhas vermelhas).



**Tabela 17.** Porcentagem relativa (%) da área sob a curva da amostra irradiada em relação a não irradiada (100%) na região do UVA e UVB do extrato bruto EB CBD, fração CLV E e das substâncias viridicatina e viridicatol.

Amostras	% de absorção remanescente em relação ao par não irradiado (100%)	
	UVA	UVB
EB CBD	103,09 ± 4,32	98,31 ± 2,85
CLV E	94,18 ± 2,37	98,39 ± 0,69
Viridicatina	101,22 ± 3,01	100,88 ± 1,09
Viridicatol	98,70 ± 0,20	100,38 ± 0,51

Estas substâncias foram selecionadas principalmente por apresentarem mais massa (compostos majoritários das frações CLV E e H) e espectros de absorção no UV ( $UV_{máx}$ : 221, 287, 317 e 330 nm para viridicatina e  $UV_{máx}$ : 226, 240, 284, 317, 331 nm para o viridicatol) próximo daquele apresentado pelas frações CLV E e H ( $UV_{máx}$ : 287, 320 e 332 nm). O estudo de fotoestabilidade das substâncias isoladas foi realizado em duplicata, na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os resultados obtidos mostraram que as substâncias são fotoestáveis (Fig. 23C e D e Tabela 17).

#### 2. 4. 3. 4. 3 Avaliação da fototoxicidade

O próximo passo para avaliar a potencial ação fotoprotetora das amostras que se apresentaram fotoestáveis foi à realização do ensaio de fototoxicidade. A princípio esta avaliação foi realizada em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU). Neste ensaio as amostras foram colocadas em contato com culturas de fibroblastos e irradiadas (+UV) ou não (-UV) pela radiação no comprimento de onda UVA. Os resultados deste experimento para o EB CBD, fração CLV E, viridicatina e viridicatol estão apresentados na Tabela 18. No ensaio de fototoxicidade, a norfloxacin (controle positivo) foi classificada como fototóxica apresentando valor de MPE dentro da faixa recomendada (0,340 a 0,900) pelo Guia 432 da OEDC (OECD, 2019a). Todas as amostras avaliadas foram consideradas fototóxicas e não citotóxicas, pois apresentaram valor de MPE maior que 0,15 e  $IC_{50-UV}$  não detectado. Esses valores foram obtidos a partir da concentração analisada de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o EB CBD e fração CLV E e de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a viridicatina e viridicatol.

**Tabela 18.** Ensaio de fototoxicidade em cultura de fibroblastos 3T3 expressos em MPE em dois experimentos independentes (n= 2).

Amostra	Experimento	MPE*	CI <sub>50</sub> - UV	CI <sub>50</sub> + UV	Probabilidade de apresentar toxicidade
Norfloxacina	1	0,421	Nd	28,88	Fototóxico/ Não citotóxico
	2	0,345	Nd	32,61	
EB CBD	1	0,576	Nd	20,47	Fototóxico/ Não citotóxico
	2	0,682	Nd	6,87	
CLV E	1	0,788	Nd	3,33	Fototóxico/ Não citotóxico
	2	0,972	Nd	1,47	
Viridicatina	1	0,804	Nd	2,68	Fototóxico/ Não citotóxico
	2	0,719	Nd	3,80	
Viridicatol	1	0,566	Nd	4,00	Fototóxico/ Não citotóxico
	2	0,501	Nd	7,77	

\*De acordo com OECD (2019a) quando MPE<0,1 prediz: “nenhuma fototoxicidade”; MPE > 0,10 e <0,15 prediz: “provavelmente fototóxico” e MPE>0,15 prediz: “fototóxico”. Nd: valores não determinados na faixa de concentração estudada.

Maciel et al. (2018) avaliaram a fotoestabilidade e fototoxicidade do fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium* isolado da macroalga vermelha *Bostrychia radicans* e evidenciaram substâncias com potenciais cromóforos para serem utilizados como filtros UVB em protetores solares, as frações ou substâncias produzidas por *A. stygium* não foram fotoestáveis, porém não apresentaram fototoxicidade.

As amostras consideradas fototóxicas neste ensaio não devem ser descartadas para comporem formulações fotoprotetoras, pois a avaliação da fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU) está superestimada, podendo produzir resultados falso-positivos devido à falta de estrato córneo. Por isso a avaliação da fototoxicidade em modelos de pele reconstituída (3D) é importante, uma vez que neste ensaio a penetração das substâncias no estrato córneo é considerada (KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2017; GASPARET AL., 2017; TAVARES ET AL., 2020). Esses modelos já foram utilizados para avaliar os efeitos provocados pela radiação UV e mostraram-se capaz de reproduzir aspectos importantes da inflamação epidérmica, remodelação da matriz dérmica, danos no DNA e hiperplasia regenerativa (ARMENTO ET AL., 2015).

Sendo assim, as amostras foram avaliadas também em modelos de pele reconstituída (3D). Para este ensaio a viabilidade celular relativa foi calculada para cada tecido como porcentagem da média dos tecidos em relação ao controle negativo (não tratado). O cetoprofeno 3% foi utilizado como controle positivo apresentando uma redução de aproximadamente 66% na viabilidade celular (viabilidade celular no + UVA: 33,5%) quando comparado ao tecido não irradiado (viabilidade celular no - UVA: 99,4%,) e o óleo de gergelim foi utilizado como veículo para incorporar as substâncias em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes. Uma substância é considerada fototóxica quando a viabilidade celular resulta em um valor inferior a 70%. Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 19, tanto a viridicatina (viabilidade celular + UVA: 106%), quanto o viridicatol (viabilidade celular + UVA: 80%) foram considerados não fototóxicos em modelo de pele *in vitro*.

Os modelos de pele *in vitro* são mais permeáveis que a pele humana, o que significa que eles dificilmente produzem resultados falso-negativos, o que é muito importante na previsão do potencial tóxico de substâncias desconhecidas como foi ensaiado para as substâncias viridicatina e viridicatol (KEJLOVÁ et al., 2007; TAVARES et al., 2020).

Em um estudo realizado por Tavares et al. (2020), a fucoxantina, um carotenoide isolado da macroalga antártica *Desmarestia anceps*, também apresentou resultados de fototoxicidade quando submetida a ensaios em modelo de monocamadas (3T3 NRU) e não-fototoxicidade em modelo de pele reconstituída (3D), assim como os resultados apresentados pelas substâncias viridicatina e viridicatol no presente estudo.

**Tabela 19.** Ensaio de fototoxicidade em modelo de pele humana reconstituída 3D.

Amostras	Viabilidade (%)		Resultado
	$\bar{x}$ - UVA	$\bar{x}$ + UVA	
Não tratado	100	114,6	Não fototóxico
Cetoprofeno 3%	99,4	33,5	Fototóxico
Veículo	104,6	119,9	Não fototóxico
Viridicatina 0,01%	95,6	106,0	Não fototóxico
Viridicatol 0,01%	91,6	80,0	Não fototóxico

$\bar{x}$ : média da viabilidade celular; não irradiado (- UVA) e irradiado (+ UVA).

#### 2. 4. 3. 4. 4 Avaliação da fotorreatividade

Os resultados obtidos no ensaio de fotorreatividade estão apresentados na Tabela 20. A quinina, controle positivo, mostrou-se fotorreativa com valores dentro dos limites recomendados (OS: 319 a 583; AS: 193 a 385), assim como o salicilato de octila, controle negativo não apresentou reatividade (OS: -5 a 11; AS: -8 a 20) (JACVAM, 2013). A viridicatina foi considerada fracamente fotorreativa devido à geração de  $24,17 \pm 0,83$  de AS ( $20 \leq AS < 70$ ), enquanto o viridicatol não levou a geração de ERO expressivas (OS < 25 e AS < 20) sendo considerado não fotorreativo. A fraca ou não fotorreatividade das substâncias ensaiadas pode estar relacionada com a deslocalização dos pares eletrônicos  $\pi$  ( $\pi$ ) das ligações duplas dos anéis aromáticos e também dos grupamentos -OH, -NH e carboxila (-C=O), o que promove uma estabilidade às estruturas da viridicatina e viridicatol.

Alguns compostos que não são tóxicos, podem se tornar reativos quando expostos à luz levando a efeitos indesejáveis. No processo de fotossensibilização o evento primário é a absorção de fótons em  $\lambda$  que geram a excitação do cromóforo. A energia de excitação é transferida para moléculas de oxigênio levando a geração de ERO, dentre eles ânion superóxido (AS) ou oxigênio simpleto (OS), que são as principais espécies intermediárias na resposta fototóxica. Dessa forma, o ensaio de fotorreatividade se baseia na geração de ERO, OS e AS, pelas substâncias após irradiação com UVA, sendo que a geração de SO é detectada pela descoloração do RNO e AS pela redução do NBT acompanhadas por medidas espectrofotométricas em 440 e 560 nm, respectivamente (JACVAM, 2013).

**Tabela 20.** Ensaio de fotorreatividade das soluções teste contendo as substâncias viridicatina e viridicatol. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

Amostras	OS ( $\Delta A_{440nm} \times 10^3$ )	AS ( $\Delta A_{560nm} \times 10^3$ )	Classificação*
Quinina	$395,50 \pm 11,83$	$263 \pm 32,83$	Fotorreativo
Salicilato de octila	$18,17 \pm 2,83$	$-3,17 \pm 0,50$	Não fotorreativo
Viridicatina	$6,67 \pm 2,00$	$24,17 \pm 0,83$	Fracamente fotorreativo
Viridicatol	$4,67 \pm 1,33$	$4,67 \pm 4,00$	Não fotorreativo

\*Fotorreativo: OS  $\geq 25$  e AS  $\geq 70$ ; fracamente fotorreativo:  $20 \leq AS < 70$  e não fotorreativo: OS < 25 e AS < 20.

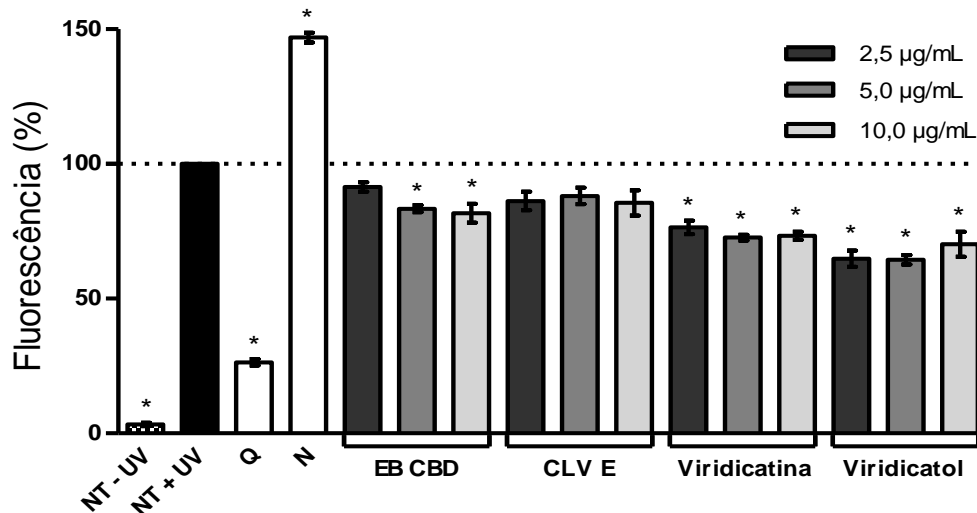


#### 2. 4. 3. 4. 5 Ensaio de quantificação de ERO intracelulares induzida por radiação UVA

O efeito protetor das substâncias viridicatina e viridicatol também foi avaliado pela quantificação de ERO intracelulares imediatamente após radiação UVA utilizando sonda DCFH<sub>2</sub>-DA em queratinócitos HaCaT. O DCFH<sub>2</sub>-DA é comumente utilizado em ensaios antioxidantes de células, sendo capaz de permear a membrana celular e detectar ERO através de sua oxidação intracelular (ANDOH et al., 2006). A radiação das células com UVA (4 J cm<sup>-2</sup>) leva a geração de ERO, que irão oxidar o DCFH<sub>2</sub> à diclorofluoresceína (DCF) fluorescente permitindo monitorar a formação de ERO pelo aumento da fluorescência (KALYANARAMAN et al., 2012; TAVARES et al., 2020).

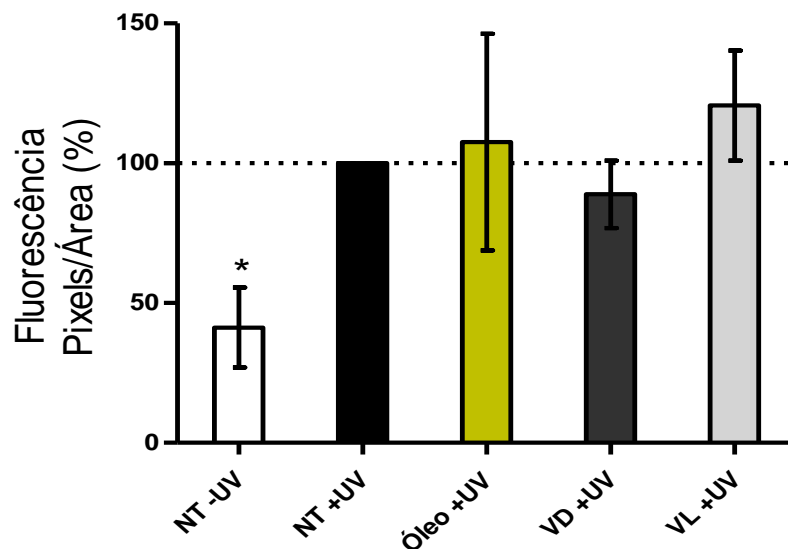
De acordo com os resultados obtidos, o controle quercetina (10 µg mL<sup>-1</sup>) provocou uma redução de 74% na geração de ERO, enquanto a norfloxacin (controle positivo) aumentou significativamente a geração de ERO (46%), quando comparada com as células irradiadas não tratadas (NT + UV). A fração CLV E, em todas as concentrações analisadas, assim como o extrato bruto EB CBD a 2,5 µg mL<sup>-1</sup>, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à produção de ERO intracelulares das células HaCaT quando comparadas ao controle não tratado e irradiado com luz UVA (NT + UV). O viridicatol foi a substância mais efetiva para inibir a geração de ERO em comparação com as amostras testadas, uma vez que reduziu cerca de 35% a quantidade de ERO intracelular na concentração de 2,5 µg mL<sup>-1</sup> quando comparado com as células não tratadas e irradiadas (NT + UV) (Figura 24).

**Figura 24.** Quantificação de ERO intracelular induzidos por radiação UVA em células HaCaT, resultados expressos em % de fluorescência. As células foram não-tratadas irradiadas (NT + UV) ou não-irradiadas (NT – UV) e; pré-tratadas com: quercetina (Q: 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), norfloxacin (N: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), extrato bruto EB CBD, fração CLV E, viridicatina e viridicatol (10; 5 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferente do grupo NT + UV ( $p < 0,05$ ).



Seguindo o mesmo mecanismo da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, porém aplicando as substâncias viridicatina e viridicatol em modelo de pele reconstituída (3D) foi possível quantificar as ERO intracelulares induzidas por radiação UVA. Os resultados demonstraram que a radiação UVA aumentou a geração de ERO no controle não-tratado irradiado (NT +UV) quando comparado ao controle não-tratado não-irradiado (NT -UV) ( $p < 0,05$ ). O viridicatol (VL +UV) demonstrou aumentar a produção de ERO no modelo pele quando irradiado, de forma não significativa e, portanto, na concentração ensaiada não foi capaz de proteger o modelo de pele, enquanto a viridicatina (VD +UV) apresentou tendência de redução da produção do ERO induzida pela radiação UVA, porém a redução observada em relação ao controle NT +UV não foi considerada significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 25).

**Figura 25.** Quantificação de ERO intracelular induzidos por radiação UVA em modelo de pele reconstituída (3D), resultados expressos em % de pixels/área de intensidade de fluorescência. Os modelos de pele foram pré-tratados com: óleo de gergelim como controle do veículo (Óleo +UV), viridicatina (VD +UV) e viridicatol (VL +UV) a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em óleo de gergelim ou não tratadas para os controles +UV (NT +UV) e -UV (NT -UV). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média em triplicata, em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo NT +UV ( $p < 0,05$ ).



A diferença encontrada nos ensaios de inibição de ERO em monocamadas *versus* pele 3D pode estar relacionada ao próprio estrato córneo que atua como barreira de penetração de substâncias na epiderme viável. A viridicatina, apesar de apresentar menor atividade antioxidante no modelo em monocamadas, por ser mais lipossolúvel que o viridicatol, apresentou maior atividade na inibição de ERO na pele, nas concentrações estudadas.

Assim, ao se analisar todos os resultados do potencial fotoprotetor e antioxidante, podemos observar que a viridicatina e o viridicatol apresentaram absorção no ultravioleta, principalmente na região de UVB e UVA-2, foram fotoestáveis, não ou fracamente fotorreativos e não fototóxicos em modelo de pele reconstituída. Também foram capazes de inibir a produção de ERO intracelulares induzidas por radiação UVA em células HaCaT e apresentaram tendência em inibir ERO em modelo de pele reconstituída, nas concentrações estudadas. Resultados estes que demonstram seu potencial para serem melhores estudadas e incorporadas, por exemplo, em formulações cosméticas fotoprotetoras e/ou antioxidantes como demonstrado no trabalho de Tavares et al. (2020). Neste estudo o filtro solar contendo

o composto fucoxantina a 0,5% (p/v) foi capaz de reduzir de forma significativa a geração de ERO após radiação UVA quando comparado ao controle não tratado irradiado (NT +UV) e também ao filtro sem a fucoxantina.

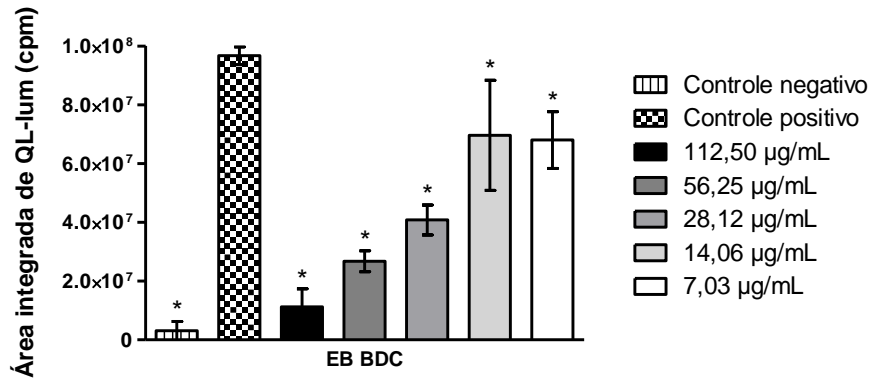
#### 2. 4. 3. 5 Atividade imunomoduladora

Além das atividades já mencionadas o extrato bruto EB CBD, frações obtidas por CLV (CLV AB-I) e as substâncias isoladas viridicatina e viridicatol também foram avaliados quanto ao potencial de regulação da produção de ERO pelo metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos principalmente em respostas inflamatórias agudas.

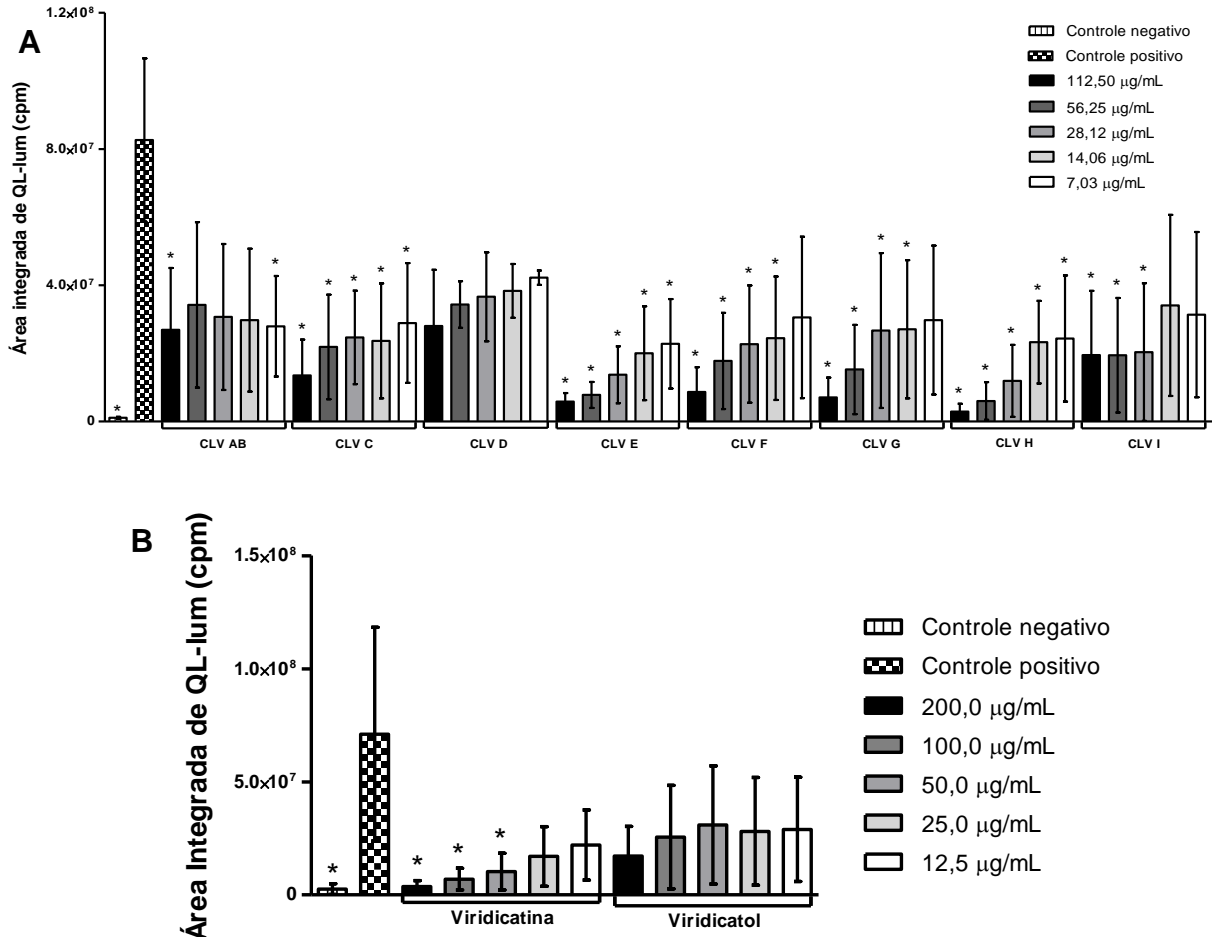
Para o ensaio de quimiluminescência foi utilizado como sonda o luminol (QLlum) e PMA  $10^{-7}$  M como estímulo independente de receptores de membrana. Para o controle negativo (reação espontânea), os neutrófilos foram incubados somente com a sonda quimiluminescente e para o controle positivo da reação, as células foram incubadas com o estímulo de ativação (PMA). Dessa forma, o controle negativo mimetiza o estado saudável do organismo, de modo que, mesmo não havendo infecção e/ou inflamação, os neutrófilos produzem quantidades muito baixas de ERO. Enquanto, no controle positivo, os neutrófilos são estimulados a produzir ERO pela adição do PMA, de modo que essas células produzam o máximo de ERO, mimetizando um estado de infecção e/ou inflamação do organismo. Portanto, quanto mais próximo os resultados estão no controle negativo, maior é a capacidade imunomoduladora do composto, visto que neste experimento a amostra é colocada em contato com neutrófilos estimulados por PMA.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 26, o extrato bruto EB CBD foi capaz de reduzir a produção de ERO nas concentrações de 112,50 e 56,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para as frações, aquelas que apresentaram melhores resultados foram: CLV E, CLV G e CLV H, sendo a fração CLV H a melhor dentre estas, pois foi capaz de reduzir a produção de ERO pelos neutrófilos humanos em uma menor concentração, de 14,06  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 27A). Dentre as substâncias isoladas, a viridicatina apresentou melhores resultados quando comparada com o viridicatol, uma vez que foi capaz de reduzir a produção de ERO a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto o viridicatol não reduziu de maneira significativa a produção das ERO por neutrófilos humanos em comparação com o grupo controle positivo, quando os neutrófilos estão estimulados por PMA a produzirem ERO (Fig. 27B).

**Figura 26.** Avaliação do efeito do extrato bruto EB CBD na produção de ERO pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média em triplicata, em três experimentos independentes. Controle negativo: neutrófilos e controle positivo: neutrófilos + PMA. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle positivo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 27.** Avaliação do efeito das frações CLVAB-I (A) e das substâncias viridicatina e viridicatol (B) na produção de ERO pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos. Controle negativo: neutrófilos e controle positivo: neutrófilos + PMA. A análise estatística foi realizada por meio do *one-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle positivo ( $p < 0,05$ ).



Os metabólitos secundários (N11) de uma bactéria marinha (*Pseudomonas* sp.) inibiram significativamente a geração de ânion superóxido, um tipo de ERO e a atividade de elastase em neutrófilos ativados por FMLP (Formil-*L*-metionil-*L*-leucil-fenilalanina) com valores de  $CI_{50}$  de  $0,67 \pm 0,38$  e  $0,84 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Porém, N11 não foi capaz de inibir a geração de ERO em neutrófilos estimulados por PMA, que é um ativador específico da proteína quinase C (PKC) (YANG et al., 2014). No entanto, hidroquinonas sesquiterpênicas como avarol e avarona, isoladas da esponja marinha *Dysidea avara* foram capazes de suprimir a geração de superóxido em neutrófilos estimulados por FMLF ou PMA em leucócitos peritoniais de ratos (aproximadamente 80% de neutrófilos) (FERRÁNDIZ et al., 1994).

A utilização do neutrófilo como alvo de estudo neste trabalho surge a partir do papel fundamental que esta célula desempenha no cenário de processos inflamatórios crônicos, como por exemplo, na doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Neste caso há deposição de imunocomplexos – que não são solubilizados de forma eficiente pelo sistema complemento, gerando depósitos pesados no endotélio – há a fagocitose ineficiente, levando a ativação do neutrófilo por receptores destinados ao reconhecimento do fragmento cristalizável (Fc) dos anticorpos, mobilizando a formação do complexo NADPH-oxidase na membrana (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

Tendo em vista a importância dos neutrófilos como potenciais produtores de substâncias oxidantes e a necessidade do controle redox em determinadas situações, os metabólitos obtidos a partir do fungo endofítico *P. echinulatum* podem apresentar uma alternativa para controlar o desbalanço oxidativo desencadeado em decorrência da alta formação e deposição desses imunocomplexos no endotélio por meio do seu potencial imunomodulador.

#### 2. 4. 3. 6 Atividade antimicrobiana

Os extratos brutos EB CBD e EB Czapek e seus controles foram avaliados quanto a potencial atividade antimicrobiana por determinação da CIM e CBM frente aos microrganismos: *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *C. albicans*. Este último foi avaliado apenas para EB CBD e seu controle. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 21 e apenas o EB CBD evidenciou moderada atividade para o microrganismo *P. mirabilis* (CIM:  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  e CBM:  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Dessa forma, as frações obtidas após fracionamento do EB CBD por CLV

foram avaliadas apenas para *P. mirabilis* como apresentado na Tabela 22 e apenas as frações CLV C e D apresentaram atividade fraca com valores de CIM e CBM de 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2014a) foram obtidos cinco meroterpenos do cultivo de *P. echinulatum*, o qual foi isolado da superfície estéril da alga vermelha *Chondrus ocellatus*. As cinco substâncias isoladas (arisugacina C, G, J, K e territrem C) foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*, e arisugacina K mostrou atividade contra *E. coli*.

Abdel-Hadi e colaboradores (2015) realizaram investigação química do fungo *Penicillium aurantiogriseum* derivado de sedimentos marinhos do mar Mediterrâneo e isolaram a viridicatina e desidrociclopeptina, além de uma fração composta por uma mistura de dois esteróis. Em um ensaio antimicrobiano realizado nesse estudo, a viridicatina apresentou potente atividade contra o principal agente causador da tuberculose, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Em outro estudo com fungo isolado de sedimento marinho, o extrato bruto AcOEt do fungo *Penicillium aurantiogriseum* exibiu significativa atividade contra *S. aureus* e *Fusarium solani*, moderada atividade contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella* sp., *Alternaria alternata* e *A. ochraceus* e baixa atividade contra *Aspergillus flavus*.

As doenças infecciosas bacterianas e fúngicas são importantes causas de mortes no mundo e a resistência microbiana a antibióticos principalmente pela vasta utilização de antibióticos agrava essas causas. Portanto, é importante destacar a necessidade de emprego de novas estratégias antibacterianas com pesquisa de novas moléculas com propriedades antibióticas (FORSYTH, 2013; SILBER et al., 2016). Diversos estudos mostram o potencial dos organismos marinhos na obtenção de produtos bioativos, indicando ser uma fonte relevante para a busca de novos agentes antimicrobianos, como exemplo clássico podemos citar o descobrimento da cefalosporina C, isolada do fungo marinho *Cephalosporium acremonium* (SILBER et al., 2016).

**Tabela 21.** Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos EB CBD e EB Czapek e seus controles.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>		
<b>Amostra</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>CBM (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
EB CBD	400	400
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Penicilina G	0,0576	0,0576
<b><i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305</b>		
EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Penicilina G	0,230	0,230
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>		
EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Estreptomicina	0,092	0,092
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>		
EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Controle EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Estreptomicina	0,023	0,046
<b><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906</b>		
EB CBD	200	400
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
EB Czapeck	400	$\geq 400$
Controle EB Czapeck	$\geq 400$	$\geq 400$
Estreptomicina	0,36875	0,36875
<b><i>Candida albicans</i> ATCC 10231</b>		
EB CBD	200	400
Controle EB CBD	$\geq 400$	$\geq 400$
Fluconazol	16	32



**Tabela 22.** Resultados da atividade antimicrobiana das frações CLVAB-I frente ao microrganismo *P. mirabilis* ATCC 29906.

Amostra	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CBM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
CLV AB	400	400
CLV C	50	50
Estreptomicina	0,046	0,092
CLV D	100	100
CLV E	400	400
Estreptomicina	0,092	0,092
CLV F	$\geq 400$	$\geq 400$
CLV G	$\geq 400$	$\geq 400$
Estreptomicina	0,092	0,092
CLV H	$\geq 400$	$\geq 400$
CLV I	$\geq 400$	$\geq 400$
Estreptomicina	0,046	0,046

#### 2. 4. 3. 7 Avaliação da toxicidade

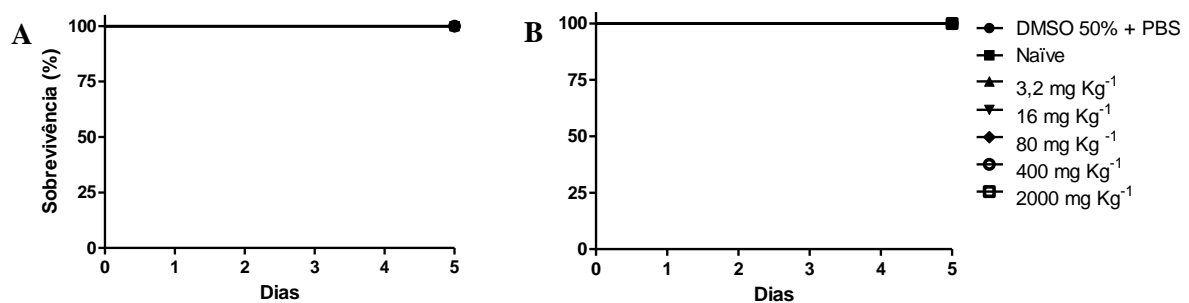
A estimativa da toxicidade de produtos químicos, biocidas, pesticidas e cosméticos é essencial para reduzir o risco de exposição do ser humano a substâncias perigosas que podem causar determinadas doenças. Por isso, esses testes são essenciais e cada vez mais, existem iniciativas para reduzir o uso de mamíferos para avaliação da toxicidade. As larvas da *Galleria mellonella* são consideradas tecnologias não-animais e que refletem aspectos da complexidade do organismo mamífero e são aceitas como uma alternativa ética para as pesquisas (LIONAKIS, 2011; CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016, TSAI; LOH; PROFT, 2016; ALLEGRA et al., 2018). Por exemplo, *G. mellonella* possui um sistema imunológico inato que é estrutural e funcionalmente semelhante ao dos mamíferos (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; WOJDA, 2017).

Maguire e colaboradores (2016) utilizaram larvas de *G. mellonella* para medir a toxicidade relativa de oito conservantes alimentares e foi demonstrada uma correlação entre os valores de DL<sub>50</sub> em larvas de *G. mellonella* e em camundongos. Outro estudo analisando a toxicidade aguda de dezenove produtos químicos utilizando as larvas de *G. mellonella* concluiu que alguns desses produtos foram melhor previstos quando ensaiados em larvas de *G. mellonella* do que nos sistemas de culturas de células. Além disso, os autores ressaltaram que uma avaliação robusta da toxicidade química

deve levar em consideração a avaliação da toxicidade em culturas de células e em larvas de *G. mellonella* (ALLEGRA et al., 2018).

Dessa forma, os metabólitos mais promissores extraídos do fungo *P. echinulatum* no presente estudo, a viridicatina e o viridicatol foram avaliados quanto a sua toxicidade em modelo de animal invertebrado. De acordo com os resultados obtidos, tanto a viridicatina (3,2 a 400 mg Kg<sup>-1</sup>), quanto o viridicatol (3,2 a 2000 mg Kg<sup>-1</sup>) em todas as concentrações analisadas não apresentaram toxicidade para o modelo animal *G. mellonella* (Fig. 28).

**Figura 28.** Curva de sobrevivência das larvas *Galleria mellonella* após inoculação de diferentes concentrações das substâncias viridicatina (A) e viridicatol (B).



## 2. 5 CONCLUSÕES

A princípio foram isolados e identificados dois fungos associados à macroalga parda *A. utricularis*, o *Aspergillus unguis* e o *Penicillium echinulatum*, ambos filamentosos. Posteriormente, outras 17 linhagens fúngicas foram isoladas de amostras de *A. utricularis* coletadas em diferentes regiões da Antártica, as quais se encontram codificadas e armazenadas no LQOAM-NPPNS-USP para utilização em trabalhos posteriores.

O cultivo do fungo *P. echinulatum* em meio BDC apresentou maior número de metabólitos quando comparado com o cultivo em meio Czapek caldo. O estudo químico das frações CLV E, F e H proporcionou o isolamento de oito substâncias, identificadas como ciclopenina (CLV E-4 p1, CLV F p2), desidrociclopeptina (CLV E3-4 p2), viridicatina (CLV E3-4 p3, CLV E 6-20 p1, CLV F p5, CLV H p4), ciclopenol (CLV F p1), viridicatol (CLV F p3, CLV H p3) e ciclopeptina (CLV F p4), além de um par de diastereoisômeros inéditos que encontram-se em processo final de elucidação estrutural (CLV H p1 e p2).

Para todas as atividades biológicas avaliadas o extrato bruto EB BDC apresentou maior atividade em comparação ao EB Czapek, exceto para atividade leishmanicida. Dentre as frações obtidas por CLV do EB BDC, a fração CLV E foi mais promissora para as atividades leishmanicida e antimalárica e as frações CLV C, D e E apresentaram atividade anti-*Neospora*.

Para as substâncias isoladas, a viridicatina e o viridicatol apresentaram atividade leishmanicida frente a forma amastigora de *L. amazonensis*, sendo que o viridicatol ( $CI_{50AMA}$  de  $8,40 \pm 0,20 \mu M$ ) apresentou melhor valor de  $CI_{50AMA}$  quando comparado a viridicatina ( $CI_{50AMA}$  de  $17,0 \pm 0,6 \mu M$ ). No ensaio de inibição da enzima CPB, apenas a viridicatina apresentou atividade ( $CI_{50}$  de  $11,5 \pm 0,5 \mu M$ ). Em relação a atividade antimalárica os compostos minoritários da fração CLV E, ciclopenina ( $CI_{50}$  de  $3,37 \pm 0,64 \mu M$ ) e desidrociclopeptina ( $CI_{50}$  de  $5,95 \pm 1,71 \mu M$ ) apresentaram resultados: ativa e moderadamente ativa, respectivamente. Para o ensaio de proliferação do parasita *N. caninum*, apenas a viridicatina apresentou atividade com valor de  $CI_{50}$  de  $9,3 \pm 0,1 \mu M$ . Além disso, a viridicatina e o viridicatol foram capazes de inibir a atividade peroxidase da enzima rNcPrx (de *N. cananimum*) em todas as concentrações analisadas (80 -  $1,5 \mu M$ ), com valores de porcentagem de inibição

10,08 ± 3,18 a 13,52 ± 3,67 % para viridicatina e de 6,17 ± 1,41 a 19,85 ± 2,02 % para o viridicatol.

Os resultados para atividade fotoprotetora foram publicados em Abril/2021 no artigo intitulado “In Vitro Evaluation of the Photoprotective Potential of Quinolinic Alkaloids Isolated from the Antarctic Marine Fungus *Penicillium echinulatum* for Topical Use” no periódico Marine Biotechnology. Resumidamente, as substâncias viridicatina e viridicatol apresentaram absorção nas regiões UVA-II e UVB, foram consideradas fotoestáveis após irradiação UVA e apresentaram potencial fototóxico em 3T3 NRU PT, porém não foi observada fototoxicidade no modelo de pele humana reconstituída 3D (redução da viabilidade celular < 30%) para ambas substâncias. A viridicatina foi considerada fracamente fotorreativa, enquanto o viridicatol não apresentou fotorreatividade; ambos inibiram a geração de ERO induzida por UVA em células HaCaT, embora o viridicatol não tenha sido capaz de proteger o modelo de pele reconstituído 2D contra a produção de ERO induzida por UVA.

Para atividade imunomoduladora, o extrato bruto EB CBD foi capaz de reduzir a produção de ERO nas concentrações de 112,50 e 56,25 µg mL<sup>-1</sup> e para as frações, aquelas que apresentaram melhores resultados foram: CLV E, CLV G e CLV H, sendo a fração CLV H a melhor dentre estas (14,06 µg mL<sup>-1</sup>). Para as substâncias isoladas, a viridicatina apresentou melhores resultados quando comparada com o viridicatol, uma vez que foi capaz de reduzir a produção de ERO a 50 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto o viridicatol não reduziu de maneira significativa a produção das ERO por neutrófilos humanos em comparação com o grupo controle positivo.

O extrato bruto EB CBD apresentou atividade moderada para o microrganismo *P. mirabilis* (CIM: 200 µg mL<sup>-1</sup> e CBM: 400 µg mL<sup>-1</sup>) e dentre as frações analisadas apenas CLV C e D apresentaram fraca atividade frente a este microrganismo, com valores de CIM e CBM de 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Finalmente, na avaliação da toxicidade em modelo animal invertebrado (*G. mellonella*), tanto a viridicatina (3,2 a 400 mg Kg<sup>-1</sup>), quanto o viridicatol (3,2 a 2000 mg Kg<sup>-1</sup>) não apresentaram toxicidade em todas as concentrações analisadas.

Os resultados obtidos neste trabalho trazem dados químicos e de atividades biológicas que evidenciam o potencial biotecnológico dos metabólitos biosintetizados pelo fungo *P. echinulatum* associado a macroalga antártica *A. utricularis*.

## **CAPÍTULO II**

**Avaliação da interação química do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. com o fungo marinho *Penicillium echinulatum***

### **3. CAPÍTULO II - Avaliação da interação química do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. com o fungo marinho *Penicillium echinulatum***

#### **3. 1 INTRODUÇÃO**

##### **3. 1. 1 Cianobactérias marinhas**

As cianobactérias marinhas filamentosas são microrganismos procariontes, pois não apresentam núcleo ou estruturas definidas e estão presentes em diversos ecossistemas, como o terrestre, marinho, fluvial, glacial, deserto e águas termais (GERWICK; FENNER, 2013; PARTENSKY; HESS; GARCZAREK, 2022). Elas são os organismos mais primitivos da Terra, conhecidas antigamente como algas verde-azuladas desempenham um papel vital como fontes primárias de oxigênio e como agentes fixadores de nitrogênio em ambientes aquáticos. De fato, as propriedades de fixação de oxigênio desses organismos tornaram possível a vida na Terra bilhões de anos atrás (SINGH et al., 2016; KHALIFA et al., 2021). As cianobactérias podem ainda existir em simbiose com outros organismos marinhos, como os fungos, corais, esponjas, acídias, moluscos, dentre outros (GERWICK; FENNER, 2013; TAN et al., 2020; MUTALIPASSI et al., 2021; PARTENSKY; HESS; GARCZAREK, 2022). Como descrito anteriormente, elas agem como agentes fixadores de nitrogênio e liberadores de carbono orgânico dissolvido que beneficiam seus hospedeiros, produzindo também metabólitos especializados defensivos que evitam que eles sejam atacados por predadores. Um dos principais organismos hospedeiros de cianobactérias são as esponjas, por exemplo, o filo bacteriano mais encontrado nas diferentes esponjas do Golfo Pérsico foram as cianobactérias, constituindo mais de 44% da diversidade total de bactérias (NAJAFI; MORADINASAB; NABIPOUR, 2018).

A pesquisa de produtos naturais provenientes de cianobactérias marinhas revelou sua impressionante capacidade biossintética na produção de metabólitos secundários bioativos estruturalmente novos. De acordo com Leão et al. (2012), a alta taxa de sucesso de cianobactérias marinhas na colonização de diferentes habitats aquáticos pode ser atribuída aos papéis ecológicos desses compostos, como proteção contra radiação UV, alelopatia e sinalização. Cerca de 550 metabólitos secundários já foram relatados de diversos gêneros de cianobactérias, incluindo *Lyngbya*, *Moorea*, *Symploca* e *Oscillatoria* (DEMAY et al., 2019; TAN et al., 2020). A maioria dessas

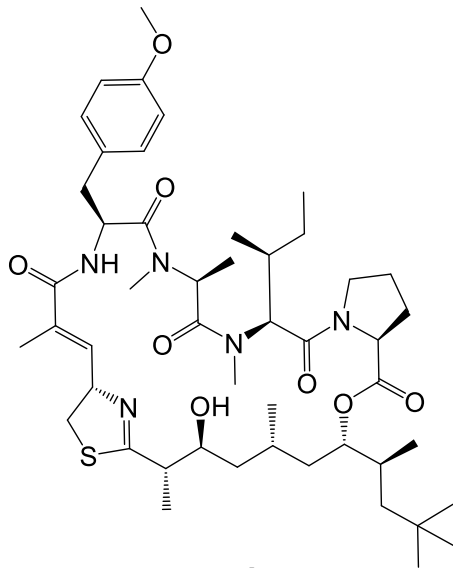
biomoléculas contêm nitrogênio e são produtos de enzimas biossintéticas modulares, como as sínteses de peptídeos não ribossomais (do inglês *non-ribosomal peptide synthetases* - NRPS), sintases de policetídeos (*polyketide synthases*- PKS) e NRPS-PKS híbridas (KLEIGREWE et al., 2016).

Esses organismos marinhos são conhecidos há muito tempo por produzirem eficientes metabólitos especializados em defesa química de diferentes classes, como lipopeptídeos, alcaloides, depsipeptídeos, macrolídeos/lactonas, peptídeos, terpenos, polissacarídeos, lipídios e policetídeos (DEMAY et al., 2019). Tais substâncias apresentam diversas atividades biológicas significativas, incluindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antituberculose, imunossupressoras, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antioxidantes (TAN et al., 2020; KHALIFA et al., 2021). A apratoxina D, isolada de *Lyngbya* sp., apresenta forte citotoxicidade contra células de câncer de pulmão humano (GUTIÉRREZ et al., 2008). Enquanto, a simplocamida A que foi isolada da cianobactéria marinha *Symploca* sp. mostrou citotoxicidade para células de neuroblastoma e células de câncer de pulmão (LININGTON et al., 2008). Outros exemplos de substâncias isoladas de cianobactérias com propriedades citotóxicas são largazol, curacina A e coibamida A (Fig. 29) (MONDAL et al., 2020). Podemos citar também ação neuromoduladora apresentada, por exemplo, pela antilatoxina, calquitoxina e jamaicamida A (ARÁOZ; MOLGO; TANDEAU DE MARSAC, 2010) e ainda ação anti-infecciosa como as almiramidas e galinamida A (Fig. 30) (SANCHEZ et al., 2010; BOUDREAU et al., 2019).

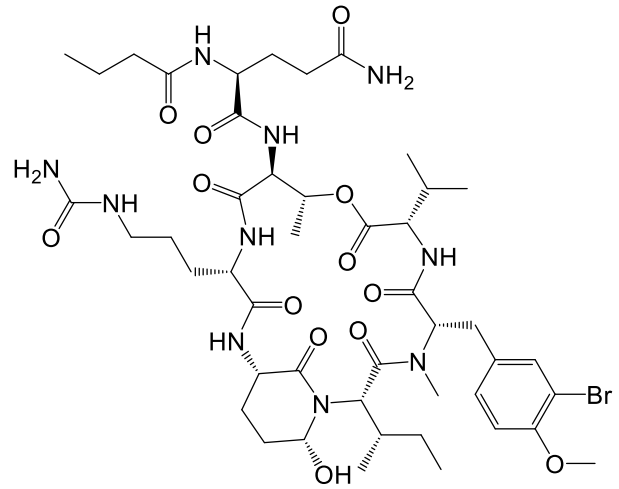
Algumas das substâncias isoladas de cianobactérias marinhas e seus análogos mostraram resultados interessantes e foram utilizados com sucesso em ensaios clínicos de fases II ou III, como a soblidotina, dolastatinas 10 e 15, cemadotina e tasidotina (Fig. 31). Além das aplicações médicas para diversas doenças humanas, as cianobactérias também estão sendo amplamente estudadas focando em aplicações biotecnológicas, tais como em cosméticos, suplementos alimentares, produção de bioplásticos, tratamento de água, produção de hidrogênio e nanobiotecnologia (KHALIFA et al., 2021).

Esses dados evidenciam a riqueza de metabólitos biologicamente ativos produzidos e isolados a partir das cianobactérias marinhas, o que ressalta a importância de estudar esses organismos.

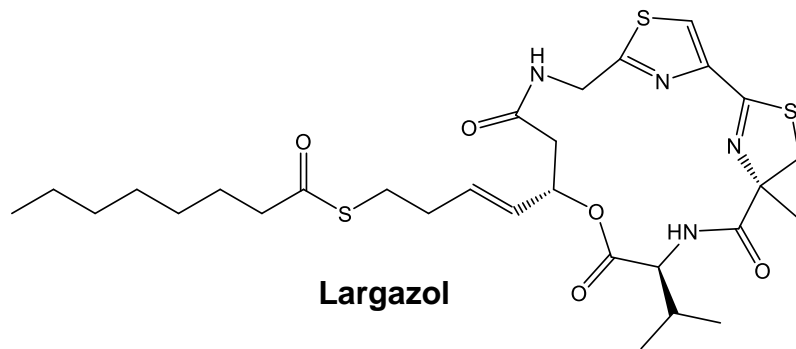
**Figura 29.** Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com atividade citotóxica.



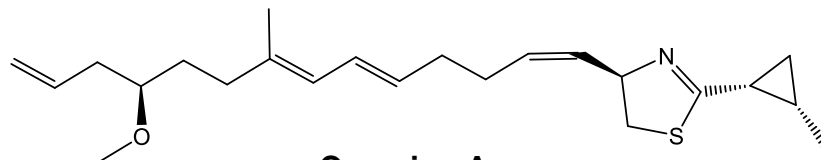
**Apratoxina D**



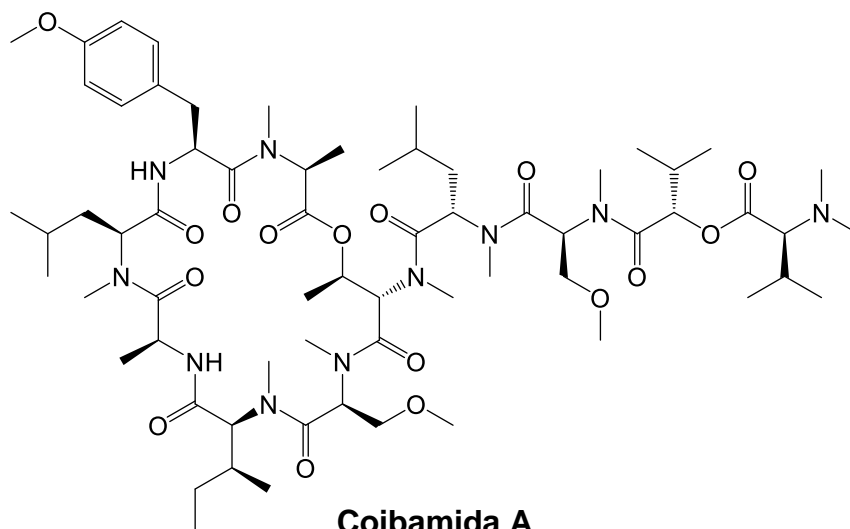
**Simplocamida A**



**Largazol**



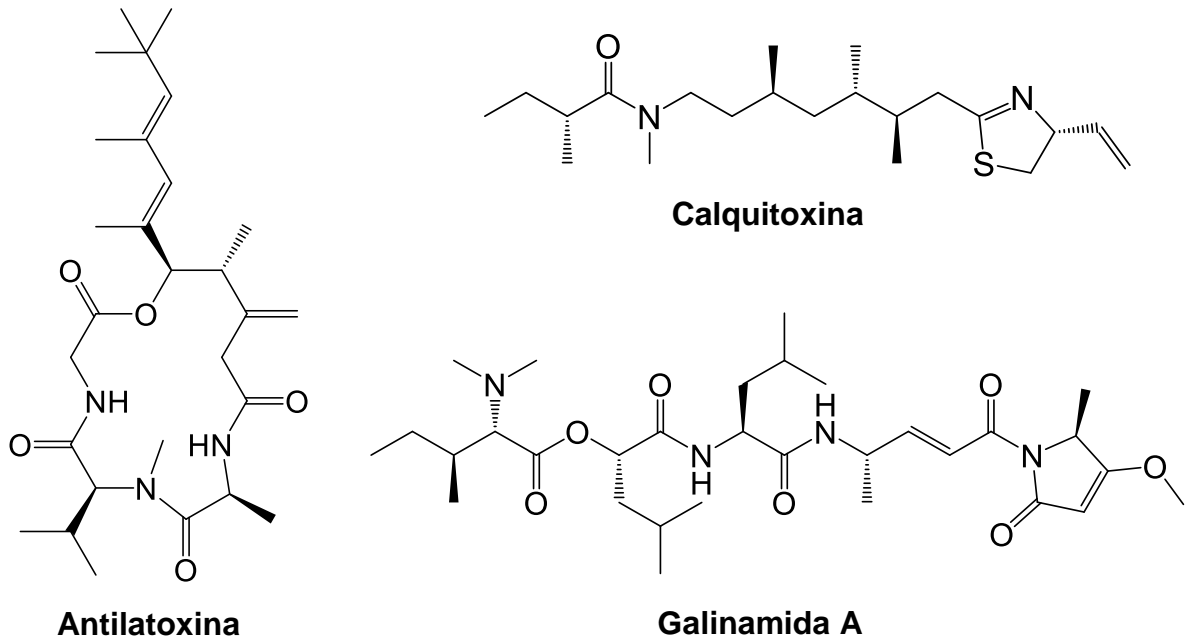
**Curacina A**



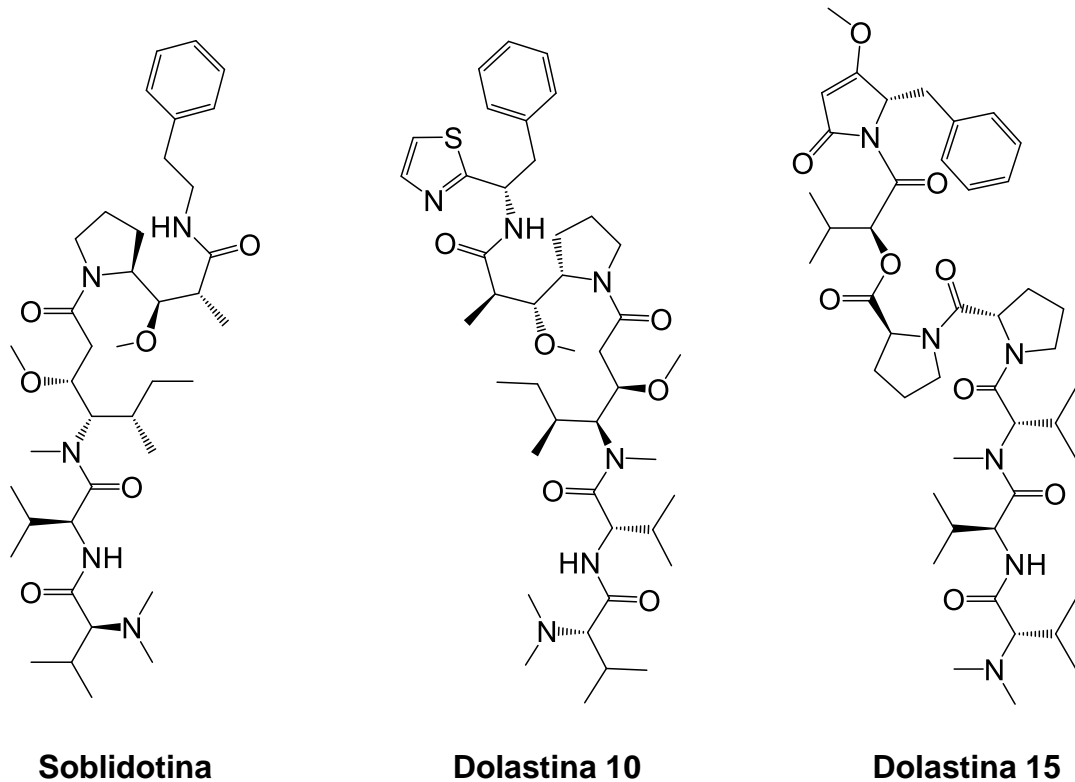
**Coibamida A**



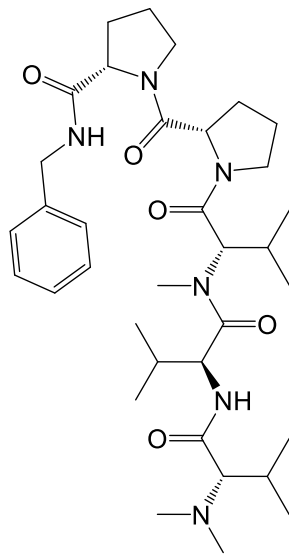
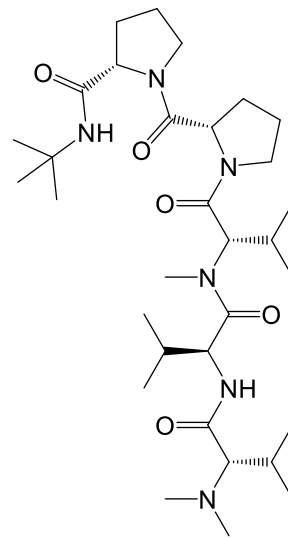
**Figura 30.** Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com atividades neuromoduladora e anti-infecciosa.



**Figura 31.** Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas que apresentaram resultados promissores em estudos clínicos de fase II ou III.



*Continua...*

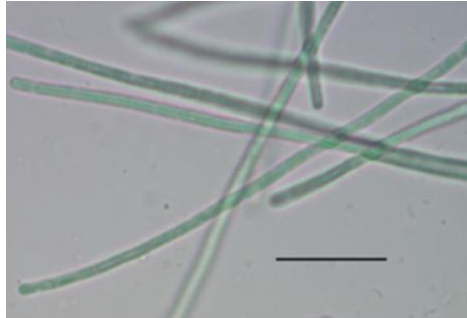
**Cemadotina****Tasidotina**

### 3. 1. 1. 1 O gênero *Geitlerinema*

O primeiro relato do gênero foi publicado por Anagnostidis em 1989, suas espécies são descritas como filamentosas, homocitadas, pertencentes a ordem Oscillatoriales. As principais características deste gênero que o diferenciam de outros são finos e cilíndricos tricomas (< 6 µm), intensa motilidade de deslizamento com oscilação e rotação e falta de material da bainha. Os tricomas relativamente finos com vários tipos de atenuação e flexão de células terminais nunca estão firmemente aderidos a qualquer substrato. A posição dos tilacoides nas células é em princípio parietal, mas com numerosas irregularidades e especificidades (Fig. 32) (JOHANSEN et al., 2017).

Há poucos relatos na literatura a respeito das substâncias isoladas a partir do gênero *Geitlerinema*. Em estudo recente publicado pelo grupo de pesquisa, da Silva e colaboradores (2020) descrevem o processo de identificação da linhagem de cianobactéria CENA 556, a mesma utilizada no presente estudo, além de relatar o isolamento de cinco nucleosídeos (uridina, 2'-deoxiuridina, timidina, adenosina e 2'-deoxiadenosina) conhecidos com atividade biológica e dois aminoácidos (*D*-leucina e *L*-fenilalanina). Foram realizadas também análises de CG-EM da linhagem CENA 556 (*Geitlerinemas*p.) demonstrando diferentes classes de substâncias não-polares com predominância dos hidrocarbonetos octadecano e neofitadieno.

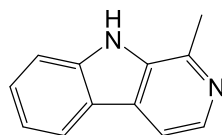
**Figura 32.** Fotomicrografia da linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. isolada do perifíton no litoral brasileiro. Barra representa 20 µm.



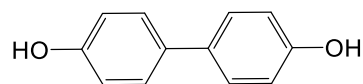
Fonte: DA SILVA et al., 2020.

Caicedo e colaboradores (2012) identificaram dois extrametabólitos bioativos obtidos do cultivo de *Geitlerinemas* sp., o alcaloide indólico harmane e o composto fenólico 4,4'-diidroxibifenil. Outras substâncias já isoladas de espécies de *Geitlerinema* foram: swinholida A (ANDRIANASOLO et al., 2005), mitsoamida (Fig. 33) (ANDRIANASOLO et al., 2007) e o pigmento ficocianina (PATEL et al., 2017; RENUGADEVI et al., 2018). Extratos brutos e frações de linhagens de *Geitlerinema* sp. apresentaram atividade antimicrobiana e antitumoral (CAICEDO et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2015), o que evidencia seu potencial para produção de substâncias bioativas.

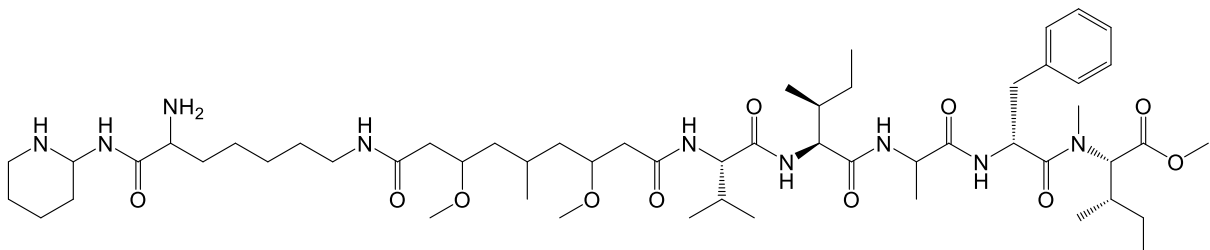
**Figura 33.** Substâncias isoladas de cianobactérias do gênero *Geitlerinema*.



**Harmane**

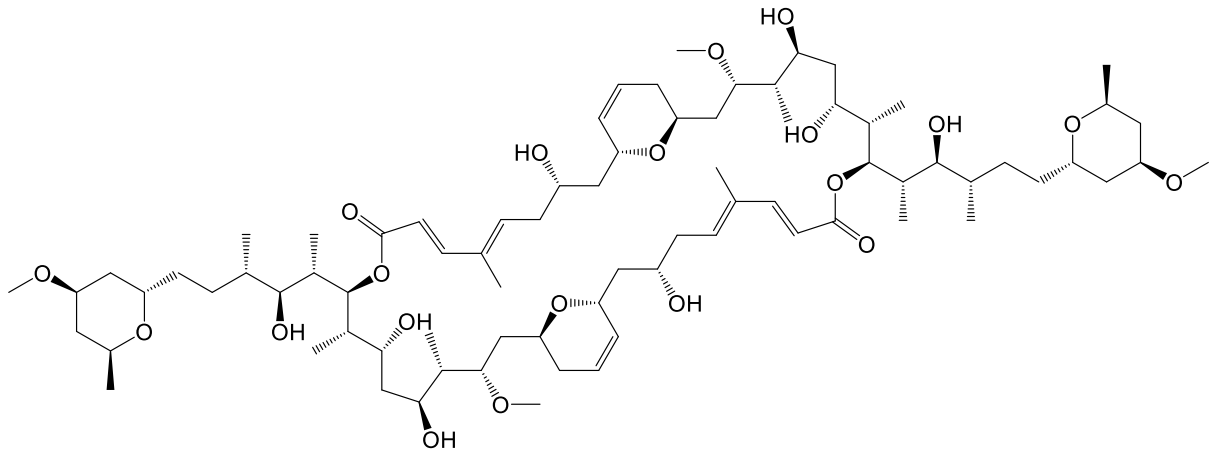


**4,4'-diidroxibifenil**



**Swinholida A**

Continua...



**Mitsoamida**

### 3. 1. 2 Cultivo misto entre cianobactérias e fungos

Como descrito anteriormente as cianobactérias podem ser encontradas em diversos ambientes em simbiose com uma variedade de organismos hospedeiros trazendo vantagens ou desvantagens para os organismos envolvidos (MUTALIPASSI et al., 2021).

Além das já citadas interações entre as cianobactérias e esponjas (THACKER, 2005), corais (LESSER et al., 2004; OSWALD et al., 2007; WEGLEY et al., 2007; OSLON et 2009), ouriços do mar (BALAKIREV; PAVLYUCHKOV; AYALA, 2008), ascídias (TIANERO et al., 2015; BAUERMEISTER et al., 2018) e moluscos (ZHUKOVA et al., 2012; LIN et al., 2013; DISTEL et al., 2017); estes organismos também estão sendo estudados em cultivos mistos com fungos. Na natureza essas interações em sistema de simbiose em associações mutualísticas entre cianobactérias e fungos são denominadas de líquens (JIANG et al., 2020).

Sistemas de cultivo misto estão se tornando amplamente utilizados como plataformas biológicas para imitar as interações célula-célula presentes em sistemas naturais, como os líquens, bem conhecidos por sua capacidade de sobreviverem condições ambientais extremas e por produzirem uma variedade de metabólitos secundários que exibem diversas atividades biológicas como potenciais bioquímicos, biocombustíveis ou produtos farmacêuticos (OKSANEN 2006; HOM; MURRAY, 2014; SANTOS; REIS, 2014; AANEN; BISSELING, 2014; EYMANN et al. 2017; GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2018).

Um exemplo de aplicação biotecnológica da associação entre cianobactérias e fungos foi descrito por Angelin e Kavitha (2020), onde exopolissacarídeos (EPSs)

foram produzidos por diversas espécies de fungos. Este grupo de substâncias são responsáveis pela atividade imunomoduladora no sistema imunológico humano, via NF- $\kappa$ B e MAPK. A produção de EPSs pôde ser aumentada em até 30% no cultivo misto entre cianobactérias e fungos quando comparados às monoculturas (ANGELIS et al., 2012).

O aumento dos níveis de biomassa também foi observado em cultivo misto entre a cianobactéria *Nostoc* e o fungo *Aspergillus nidulans*, neste estudo os níveis de biomassa foram 73% superiores as monoculturas de *Nostoc*. Além disso, o co-cultivo cresceu de forma estável em águas residuais ao longo de cinco semanas. Os autores sugerem que *A. nidulans* pode ter conferido proteção a cianobactéria *Nostoc* neste ambiente hostil, podendo-se estender a aplicação deste líquen artificial para o tratamento de águas residuais (JIANG et al., 2020).

O cultivo misto em laboratório do fungo *Trichoderma citrinoviride* e a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi capaz de inibir o crescimento da mesma, bem como a produção de microcistinas, que são substâncias tóxicas quando ocorrem florações (crescimento excessivo de cianobactérias com liberação de cianotoxinas prejudiciais para os seres humanos e a vida aquática) (MOHAMED; HASEHM; ALAMRI, 2014).

Esses dados demonstram a importância de interações entre as cianobactérias com diferentes organismos com potenciais aplicações biotecnológicas. Ainda, a possível produção de novas substâncias deve ser melhor explorada e estudada, visto que são poucos os relatos na literatura principalmente de interações entre cianobactérias e fungos.

### **3. 1. 3 Dengue**

A Dengue é uma infecção viral transmitida principalmente por fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*, considerada uma doença negligenciada e comum em países de climas quentes e tropicais. A infecção é causada por qualquer um dos quatro vírus da dengue, denominados sorotipos, e estes podem levar a um amplo espectro de sintomas, incluindo alguns que são extremamente leves, às vezes imperceptíveis até aqueles que podem exigir intervenção médica, hospitalização e em casos graves, pode ocorrer fatalidades (OMS, 2022c).

Não há tratamento para a infecção, portanto a Organização Mundial da Saúde indica que o combate ao mosquito transmissor é a estratégia mais eficiente para

controle e prevenção desta doença. Algumas técnicas que atuam nas fases imaturas (ovo, larva e pupa) e na fase adulta já estão sendo utilizadas para o combater o mosquito transmissor (BENELLI, 2015).

Inseticidas sintéticos altamente tóxicos como organofosforados, piretróides e carbamatos têm sido historicamente utilizados no combate ao mosquito, atuando principalmente em larvas de insetos (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle a Dengue tem promovido a substituição desses compostos sintéticos por outros que são menos prejudiciais ao meio ambiente. Os organofosforados (malation, fenitrotione temefós) foram substituídos inicialmente pelos organoclorados, que por sua vez foram substituídos por piretróides (cipermetrina e deltametrina). No entanto, esses compostos ainda apresentam alguma toxicidade, colocando em perigo populações de insetos polinizadores, animais e o meio ambiente (SILVÉRIO et al., 2020; PILON et al., 2022).

Portanto, esforços têm sido feitos para obter produtos de origem natural com atividade contra *A. aegypti*, como a utilização de piretro (extrato de plantas derivado do Crisântemo) e óleo de nim; embora nenhum desses produtos foram aprovados ou autorizados pelos órgãos reguladores brasileiros até o momento para uso comercial. A literatura relata o potencial de diversos inseticidas naturais, principalmente os de ação antimicrobiana e de origem vegetal (SILVÉRIO et al., 2020; SILVA et al., 2020; PILON et al., 2022), porém são poucos os relatos de produtos naturais provenientes de organismos marinhos com ação inseticida.

De maneira geral as substâncias de origem marinha que apresentam atividade inseticida são os alcaloides, terpenos, flavonoides, fenóis, ácidos graxos, peptídeos e proteínas (SONG et al., 2021). Dentre os organismos marinhos que já foram estudados em relação a sua atividade frente ao mosquito *A. aegypti*, podemos citar principalmente as algas marinhas (MANILAL et al., 2011; ALI et al., 2012; MINICANTE et al., 2017; SUGANYA et al., 2019).

Em estudo recente publicado por Hou e colaboradores (2021), o extrato AcOEt do fungo marinho *Penicillium brefeldianum* mostrou atividade larvicida promissora contra *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> de 0,089 mg mL<sup>-1</sup>) e as substâncias isoladas, paspaline e fumitremorgina A apresentaram valores de CL<sub>50</sub> de 0,452 e 0,337 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Uma das vantagens dos produtos naturais marinhos no desenvolvimento de produtos inseticidas é a presença de elementos halogenados, sulfetos e nitratos

bastante comuns em suas estruturas químicas e geralmente raro em produtos naturais terrestres; é importante destacar que esses elementos estão presentes na maioria dos inseticidas sintéticos eficazes de uso comercial (CHEN et al., 2019; KELLER et al., 2020; SONG et al., 2021). Sendo assim, justifica-se a busca por inseticidas de origem natural provenientes de organismos marinhos na tentativa de garantir alternativas de produtos inseticidas mais ecológicos.

## 3. 2 OBJETIVOS

### 3. 2. 1 Objetivo geral

Avaliar a interação química e o potencial larvicida (*Aedes aegypti*) do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo marinho *Penicillium echinulatum*.

### 3. 2. 2 Objetivos específicos

- ✓ Cultivar o fungo marinho *P. echinulatum* em meio CBD/ASN III + vit B<sub>12</sub> (Capítulo I);
- ✓ Cultivar e obter o extrato bruto da linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. em meio ASN III + vit B<sub>12</sub>;
- ✓ Realizar o cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo *P. echinulatum*;
- ✓ Realizar a triagem química (CCDC, CLAE-DAD) dos extratos e frações obtidos do cultivo misto;
- ✓ Realizar a avaliação química do cultivo misto por CLAE-DAD-IES-EM comparando com o perfil obtido das monoculturas;
- ✓ Realizar a avaliação da atividade larvicida (mosquito *Aedes aegypti*) do extrato bruto e frações obtidas do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo *P. echinulatum*.



### 3. 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. 3. 1 Material e equipamentos

##### Material:

- ✓ Coluna Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm);
- ✓ Coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada;
- ✓ Sílica gel-60 (40-70 mesh);
- ✓ Kitassato de 500 e 1000 mL;
- ✓ Placas de alumínio cromatográficas comparativas (CCDC) impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura (Sigma-Aldrich);
- ✓ Reveladores: iodo sublimado, solução de vanilina sulfúrica e luz UV (254 e 365 nm);
- ✓ Placas de petri (90 x 15 mm) descartáveis estéreis lisas;
- ✓ Vitamina B<sub>12</sub> (Sigma-Aldrich).

##### Meios de cultivo:

- ✓ Meio Caldo de Batata Dextrose (CBD, Kasvi);
- ✓ Meio Ágar Batata Dextrose (ABD, Kasvi);
- ✓ Meio ASNIIII (RIPPKA et al., 1979 – Anexo I);
- ✓ Meio SWBG<sub>11</sub> – Água do mar artificial (CASTENHOLZ, 1988 – Anexo I).

##### Solventes:

- ✓ Solventes para extração e fracionamento: metanol, acetato de etila, *n*-hexano, diclorometano, etanol e acetona de grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico;
- ✓ Solventes de grau cromatográfico (CLAE): acetonitrila e metanol (JT Baker).

##### Equipamentos e softwares:

- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Nexera X2 (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) (modelo SPD M20A, Shimadzu) acoplado Espectrômetro de massas (modelo micrOTOF-QII, Bruker Daltonics, EUA) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF);

- ✓ Balança semi-analítica (modelo FA-2204CI-BI, Bioscale);
- ✓ Capela de fluxo laminar (Pachane);
- ✓ Sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm, Bedford);
- ✓ Autoclave vertical (Phoenix);
- ✓ Evaporador rotativo (IKA, modelo RV 10 control e Buchi, modelo R-210);
- ✓ Bomba a vácuo (TE-058, Tecnal);
- ✓ Lavadora ultrassônica;
- ✓ DataAnalysis 4.3 (Bruker).

### **3. 3. 2 Manutenção, cultivo e obtenção do extrato bruto da linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp.**

A linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. foi coletada na região de Ubatuba, Praia da Fortaleza (23° 31' 53,88" S x 45° 9' 51,63" O) no litoral norte do estado de São Paulo (Brasil) em setembro de 2011. As amostras coletadas e identificadas (colaboração com a Profa. Dra. Marli Fátima Fiore) foram transferidas para o LQOAM-NPPNS-FCFRP-USP, onde se encontram mantidas em cultivo até os dias atuais por meio de repicagens periódicas em meio de cultura líquido SWBG<sub>11</sub>.

Em um estudo realizado pela Dra. Ezequiane Machado da Silva foi selecionado o melhor meio de cultura para obtenção de maior biomassa de diferentes linhagens de cianobactérias presentes no LQOAM. Sendo que, neste estudo a linhagem de cianobactéria CENA 556 cultivada em meio ASN III suplementado com vitamina B<sub>12</sub> demonstrou ser a linhagem mais promissora para obtenção de substâncias bioativas (SILVA, 2016). Por isso, selecionou-se esta linhagem, bem como este meio de cultura para o cultivo da cianobactéria CENA 556 e posteriormente a realização do cultivo misto entre a cianobactéria e o fungo marinho *P. echinulatum*.

Para o cultivo da cianobactéria, transferiu-se um inóculo inicial da linhagem CENA 556 (cerca de 50 mL) para três frascos do tipo Erlenmeyer de 2 L contendo 400 mL do meio de cultura ASN III suplementado com vitamina B<sub>12</sub>. Os frascos de cultivo foram mantidos sob iluminação fluorescente em fotoperíodos de 14 horas claro: 10 horas escuro, com agitação ocasional e temperatura de 24 ± 2 °C em cultivo durante 180 dias com trocas de meio realizadas a cada 30 dias.

Ao final dos 180 dias, a biomassa de dois frascos contendo a linhagem CENA 556 foi filtrada sob pressão reduzida em papel de filtro, lavada com água purificada e

seca em estufa a 30 °C até peso constante. Posteriormente, a biomassa seca foi extraída 3 vezes consecutivas com 500 mL de AcOEt e após filtração do extrato, este foi concentrado em evaporador rotativo dando origem ao extrato bruto EB CENA 556 biomassas. O meio aquoso em que a linhagem foi cultivada também foi extraído 2 vezes com AcOEt na proporção de 2:1 (meio:AcOEt) por partição líquido-líquido, sendo a fase orgânica recolhida e concentrada em evaporador rotativo, obtendo-se então o extrato bruto do meio (EB CENA 556 meio). Após análise em CCDC dos dois extratos brutos obtidos, estes foram reunidos dando origem ao EB CENA 556.

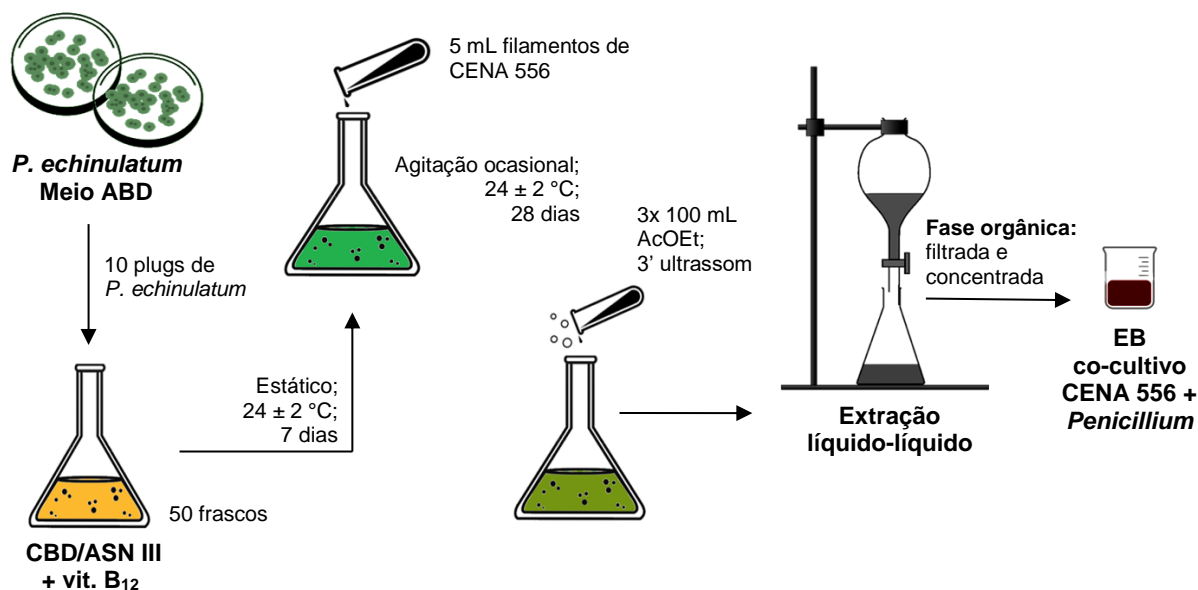
### **3. 3. 3 Cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo marinho *P. echinulatum***

Duas placas de Petri contendo meio ABD foram inoculadas com fungo *P. echinulatum* e incubadas em temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) por 7 dias. Posteriormente, com auxílio de transfertubos, 10 plugs de meio contendo o fungo crescido foram transferidos para 50 frascos do tipo Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio CBD preparado em água marinha artificial (ASN III + vitamina B<sub>12</sub>). Os cultivos foram mantidos em temperatura ambiente a  $24 \pm 2$  °C durante 7 dias, em modo estático. Após 7 dias, 5 mL de meio contendo filamentos da linhagem de cianobactéria CENA 556 foram adicionados a cada frasco de cultivo. Manteve-se o cultivo misto durante 28 dias, em temperatura de  $24 \pm 2$  °C, na ausência de luz e com agitação ocasional. Todos estes procedimentos envolvendo a manipulação dos microrganismos foram realizados em capela de fluxo laminar com material esterilizado.

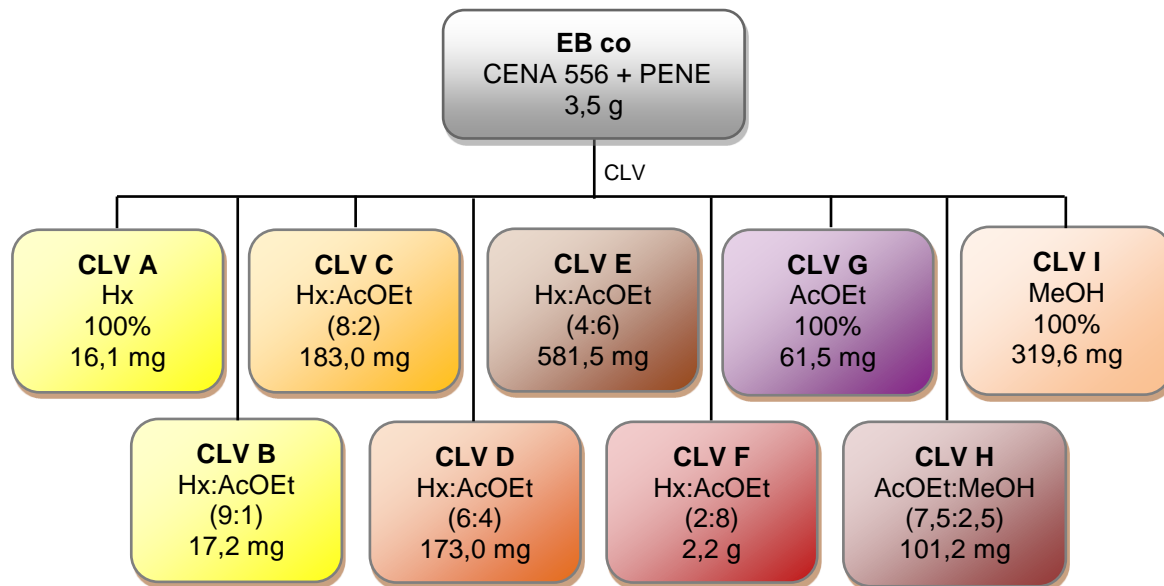
### **3. 3. 4 Obtenção do extrato bruto e fracionamento do cultivo misto**

Após o período de incubação, foi realizado o processo de extração conforme o método descrito no item 2. 3. 5 do Capítulo I, obtendo-se desta forma o extrato bruto EB co-cultivo CENA 556 + *Penicillium* (ou EB co CENA 556 + PENE) (Fig.34). Cerca de 3,5 g deste extrato foi solubilizado em acetato de etila, incorporado em sílica-gel 60 (40-70 mesh) e submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV). Utilizou-se como eluentes, *n*-hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em gradiente de polaridade, obtendo-se o total de nove frações de 500 mL cada (Fr. CLV A-I) (Fig.35). O perfil cromatográfico das frações foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

**Figura 34.** Esquema de cultivo misto entre a cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo marinho *P. echinulatum* e obtenção do extrato bruto.



**Figura 35.** Fluxograma representando o fracionamento do extrato bruto EB co CENA 556 + PENE.



### 3. 3. 5 Atividade larvicida (*Aedes aegypti*)

O ensaio larvicida foi realizado utilizando cepas de *Aedes aegypti* Rockefeller como descrito por Silva e colaboradores (2020). As larvas em seu terceiro instar de desenvolvimento (L3) foram obtidas a partir de colônias não infectadas mantidas no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UNB) de acordo com as

diretrizes da Organização Mundial de Saúde. Inicialmente, as amostras (extratos brutos, frações e substâncias isoladas a 250, 125 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionadas em placas de 12 poços. Um total de 120 larvas foram expostas em 4 réplicas de 10 larvas, para cada poço com volume final de 3 mL. O ensaio foi realizado em triplicata. Após 24 h, 48 h e 72 h de exposição, o número de larvas mortas foi registrado e a porcentagem de mortalidade calculada. As larvas sem movimento, confirmadas pela agitação leve da placa foram consideradas mortas. O larvicida Temefós ( $0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo e DMSO (<1,0% DMSO em água de torneira) como controle negativo. A temperatura foi mantida em  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ , com fotoperíodo de 12 horas.

### **3. 3. 6 Avaliação do perfil químico por CLAE-DAD-IES-EM do extrato bruto obtido por cultivo misto e construção da rede molecular**

Os extratos brutos da cianobactéria CENA 556 (EB CENA 556), do fungo *P. echinulatum* (EB CBD), do cultivo misto entre os dois organismos (EB co CENA 556 + PENE), bem como as frações EB CBD\_CLV E e EB co CENA + PENE\_CLV E foram analisados em CLAE-DAD-IES-EM. Para estas análises, as amostras foram solubilizadas em 1,0 mL de metanol grau cromatográfico e centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para *vial* de 1,5 mL e injetado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a detectores de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de ionização por *electrospray* (IES-EM), monitorado entre 220-800 nm e operado em modo de ionização positivo, com tempo de transferência de íons de 70  $\mu\text{s}$  e prépulso de 5  $\mu\text{s}$ . O intervalo de massas selecionado foi de  $m/z$  50-1200, modo AutoMS, com energia de colisão variando de 20 - 65 eV de acordo com  $m/z$  50 - 600, mantendo-se a energia constante em 65 eV para valores de massa acima de  $m/z$  600. Foi adquirido o máximo de cinco íons precursores por ciclo. Os parâmetros de funcionamento do equipamento foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 4 bars, gás secante (nitrogênio) 9,0 L  $\text{min}^{-1}$ , temperatura da fonte 200  $^\circ\text{C}$ . Para calibração interna do sistema foi utilizada solução de formiato de sódio 10 nM em isopropanol/água (1:1 v/v).

O volume injetado de todas as amostras foi de 5  $\mu\text{L}$  com tempo de eluição de 20 minutos em diferentes gradientes de concentração (Tabela 23). A separação dos

compostos foi realizada em coluna analítica Kinetex C-18 (Phenomenex, EUA) mantida em 50 °C com vazão de 0,35 mL min<sup>-1</sup>. As fases móveis utilizadas foram água deionizada (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambas grau cromatográfico, contendo 20 mM de ácido fórmico como aditivo.

**Tabela 23.** Gradiente de solventes utilizado para análise em CLAE-DAD-IES-EM.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>Bomba B Acetonitrila</b>
0,01	15
2,00	15
12,00	95
17,00	95
20,00	15
20,01	Stop

Para construção da rede molecular os dados de CL-EM/EM foram convertidos para arquivos de mzML online (<https://gnps-quickstart.ucsd.edu/conversion>) ou utilizando o programa MSConvert. Posteriormente, estes dados foram submetidos à plataforma GNPS Molecular Networking. As redes moleculares foram geradas pela interconexão de espectros EM/EM das amostras comparadas e processadas pelo programa Cytoscape 3.2.1 para melhor visualização e comparação entre as amostras trabalhadas (WANG et al., 2016).

### 3. 4 RESULTADOS E DICUSSÃO

#### 3. 4. 1 Avaliação da atividade larvicida (*Aedes aegypti*)

Os resultados obtidos no bioensaio para os extratos brutos EB CENA 556, EB CBD e EB co CENA + PENE, bem como para as frações obtidas após fracionamento dos extratos brutos EB co CENA + PENE e EB CBD (Capítulo I) por CLV estão apresentados na Tabela 24.

Dentre os extratos brutos apenas aquele obtido a partir do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 e o fungo marinho *P. echinulatum* (EB co CENA + PENE) foi capaz de matar 77,5% das larvas de *A. aegypti* após 72 horas de exposição. A fração EB CBD\_CLV E apresentou atividade tempo-dependente, com valores de mortalidade de 30, 60 e 87,5% após exposição de 24, 48 e 72 horas. Este mesmo perfil pôde ser observado para as frações EB co CENA + PENE\_CLV B (% de mortalidade de 50,0; 66,7 e 80,0% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente) e EB co CENA + PENE\_CLV E (% de mortalidade de 67,5; 90,0 e 92,5% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente), sendo esta última a amostra que apresentou melhores resultados entre todas as avaliadas. As amostras que apresentam valores de % de mortalidade  $\geq 80\%$  são consideradas promissoras e devem ser melhores investigadas (SILVA et al., 2020; PILON et al., 2022).

Os produtos naturais provenientes de plantas têm sido amplamente estudados quanto ao potencial larvicida e inseticida (SILVA et al., 2020), principalmente óleos essenciais (PILON et al., 2022), porém são poucos os relatos de produtos naturais marinhos que apresentam tais atividades. Dentre as classes de substâncias com potencial inseticida provenientes de plantas, animais e microrganismos marinhos, podemos citar os alcaloides, terpenos, flavonoides, fenóis, ácidos graxos, peptídeos e proteínas (SONG et al., 2021).

Hou e colaboradores (2021) investigaram a atividade larvicida frente às larvas L3 de *A. aegypti* de extratos do fungo marinho *Penicillium brefeldianum* e observaram atividade promissora para extrato AcOEt com valor de  $CL_{50}$  de  $0,089 \text{ mg mL}^{-1}$  e as substâncias isoladas, paspaline e fumitremorgina A (alcaloide indólico) apresentaram  $CL_{50}$  de  $0,452$  e  $0,337 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 24.** Resultados do ensaio larvicida (taxa de mortalidade) dos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD, EB co CENA + PENE ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), frações ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e substâncias isoladas: ciclopenina e viridicatina ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) contra *A. aegypti* após exposição de 24, 48 e 72 horas.

Amostras	Mortalidade (%)		
	24 h	48 h	72 h
EB CENA 556	3,3	6,7	13,3
EB CBD	0,0	0,0	6,7
EB CBD_CLV D	0,0	0,0	0,0
EB CBD_CLV E	30,0	60,0	87,5
EB CBD_CLV F	0,0	0,0	0,0
EB CBD_CLV G	0,0	0,0	0,0
EB CBD_CLV H	0,0	0,0	0,0
EB CBD_CLV I	0,0	0,0	0,0
EB co CENA + PENE	10,0	50,0	77,5
EB co CENA + PENE_CLV A	6,7	26,7	36,7
EB co CENA + PENE_CLV B	50,0	66,7	80,0
EB co CENA + PENE_CLV C	10,0	36,7	43,3
EB co CENA + PENE_CLV D	6,7	23,3	36,7
EB co CENA + PENE_CLV E	67,5	90,0	92,5
EB co CENA + PENE_CLV F	6,7	23,3	36,7
EB co CENA + PENE_CLV G	3,3	43,4	43,3
EB co CENA + PENE_CLV H	0,0	23,3	36,7
EB co CENA + PENE_CLV I	0,0	0,0	0,0
Ciclopenina	0,0	0,0	0,0
Viridicatina	0,0	0,0	0,0
Temefós ( $0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	100,0	100,0	100,0
DMSO (< 1%)	-	-	-



### 3. 4. 2 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD e EB co-cultivo CENA 556 + *Penicillium* (EB co CENA + PENE)

O extrato bruto EB co CENA + PENE obtido após extração líquido-líquido de 50 frascos tipo Erlenmeyers contendo o cultivo misto da cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo *P. echinulatum* crescidos em meio CBD suplementado com vitamina B<sub>12</sub> apresentou coloração marrom/caramelo e massa de 3,8 g. Enquanto o extrato bruto EB CENA 556 da cianobactéria cultivada em meio ASN III + vitamina B<sub>12</sub> exibiu coloração verde escuro e massa de 1,0 g.

O mesmo processo de fracionamento por CLV foi realizado para o extrato bruto EB co CENA + PENE (rendimento de aproximadamente 100%) e os dados de massa, coloração e aspecto das frações obtidas estão mostradas na Tabela 25.

**Tabela 25.** Massa, cor e aspecto das frações obtidas após submissão do EB co CENA + PENE à cromatografia líquida a vácuo (CLV).

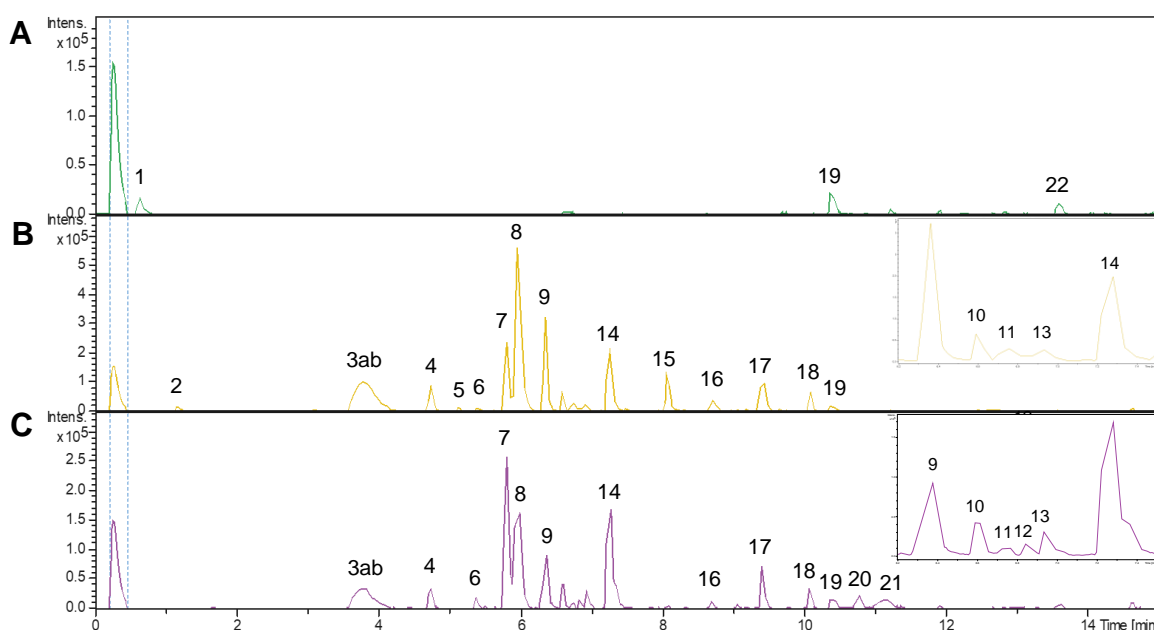
Fração	Massa (mg)	Cor	Aspecto
A	16,1	Amarela	Pó
B	17,2	Amarela	Pó
C	183,0	Amarela	Pó
D	173,0	Amarela	Pastosa
E	581,5	Marrom clara	Pó
F	2165,6	Marrom escura	Pastosa
G	61,5	Marrom	Pastosa
H	101,2	Marrom	Pastosa
I	319,6	Castanha	Pó

Todos os extratos foram analisados por CLAE-DAD-IES-EM, e seus constituintes foram identificados baseado no espectro de UV, espectrometria de massas de alta resolução, incluindo padrões de fragmentação, além de comparação com dados da literatura. Os cromatogramas de pico base ou do inglês *base peak chromatogram* (BPC) estão mostrados na Figura 36 e os principais constituintes identificados na Tabela 26.

Em análise dos cromatogramas podemos notar semelhança nos perfis químicos do EB CBD e EB co CENA + PENE, exceto para os picos em 1,2 (pico 2) e 5,10 (pico 5) minutos com  $m/z$  261,1 e 297,1, respectivamente, que estão presentes apenas no EB CBD (fungo *P. echinulatum*) e os picos em 6,8 (pico 12,  $m/z$  267,1), 10,8

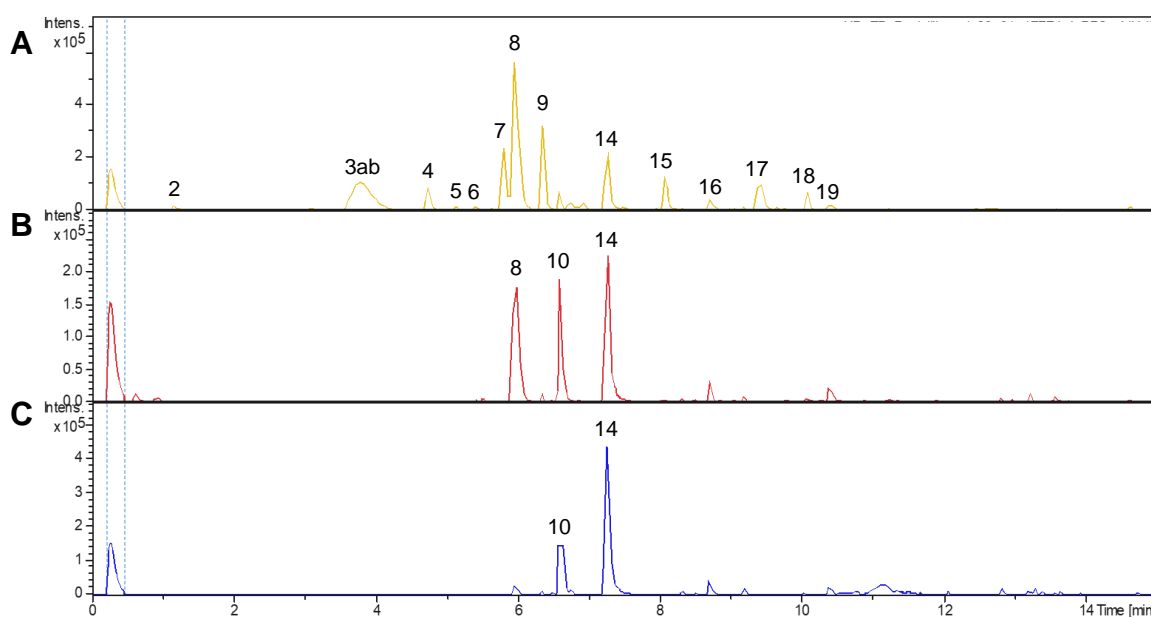
(pico 20,  $m/z$  502,3) e 11,2 (pico 21,  $m/z$  377,4) minutos, somente no EB co CENA + PEN (cultivo misto), todos esses picos são substâncias desconhecidas. Os demais picos estão presentes em ambos os extratos em maior ou menor quantidade, dependendo da amostra, porém para melhor discutir em relação ao teor de cada substância faz-se necessário um estudo quantitativo de tais amostras. Pôde-se observar ainda produção muito reduzida de metabólitos pela cianobactéria *Geitlerinema* sp., porém sua presença em cultura com o fungo *P. echinulatum* parece ter influenciado o desenvolvimento e a produção de novos metabólitos pelo fungo. Levantamos esta hipótese uma vez que no estudo publicado por da Silva et al. (2020) foram isolados cinco nucleosídeos (uridina, 2'-deoxiuridina, timidina, adenosina e 2'-deoxiadenosina) e dois aminoácidos (*D*-leucina e *L*-fenilalanina) da mesma linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. utilizada no presente estudo; e como foi descrito anteriormente no Capítulo I, a rota biossintética do fungo *P. echinulatum* inicia com a combinação do ácido antranílico com *L*-fenilalanina para formação final principalmente das substâncias viridicatina e viridicatol. Dessa forma, sugerimos que a produção do aminoácido *L*-fenilalanina pela cianobactéria descrita anteriormente por da Silva e colaboradores (2020) pode ter sido direcionada para a produção dos metabólitos pelo fungo *P. echinulatum* no cultivo misto.

**Figura 36.** Cromatogramas de pico base dos extratos brutos EB CENA 556 (A, verde), EB CBD (B, amarelo) e EB co CENA + PENE (C, roxo) em modo de ionização positivo.

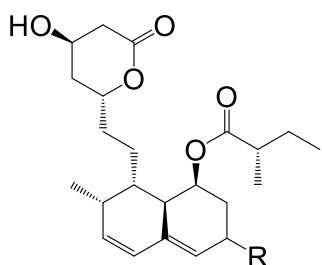


Visto que as frações EB CBD\_CLV E e EB co CENA + PENE\_CLV E apresentaram atividade larvicida promissora, estas também foram analisadas por CLAE-DAD-IES-EM a fim de obter-se uma comparação do perfil químico de ambas. Como pode ser observado na Figura 37, a fração EB CBD\_CLV E obtida a partir do cultivo apenas do fungo *P. echinulatum* apresentou três picos majoritários em 6,0 (pico 8); 6,6 (pico 10) e 7,3 (pico 14) minutos com  $m/z$  295,1; 279,1 e 238,1, correspondentes as substâncias ciclopenina, desidrociclopeptina e viridicatina, respectivamente. Enquanto, no cromatograma da fração EB co CENA + PENE\_CLV E observamos apenas dois picos majoritários referentes a desidrociclopeptina e viridicatina. Com base nesses resultados as substâncias ciclopenina e viridicatina foram também avaliadas em relação a atividade larvicida (*A. aegypti*) e de acordo com os resultados apresentados na Tabela 26 ambas não apresentaram atividade. A desidrociclopeptina não foi ensaiada devido à falta de massa. Esses resultados sugerem que a atividade apresentada pela fração EB co CENA + PENE\_CLV E pode estar relacionada com a desidrociclopeptina, com a ausência da ciclopenina nesta fração ou ainda devido ao efeito de potenciação entre a desidrociclopeptina e a viridicatina.

**Figura 37.** Cromatogramas de pico base do extrato bruto EB CBD (A, amarelo) e das frações EB CBD\_CLV E (B, vermelho) e EB co CENA + PENE\_CLV E (C, azul) em modo de ionização positivo.



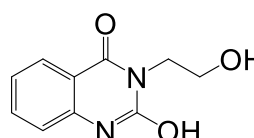
Para melhor visualização e desreplcação dos dados químicos foi obtido também uma rede molecular (ou *molecular networking*) dos extratos brutos EB CENA 556 (verde), EB CBD (amarelo) e EB co CENA + PENE (roxo) e das frações EB CBD\_CLV E (vermelho) e EB co CENA + PENE\_CLV E (azul) (Fig. 38) após submissão dos dados de EM/EM dessas amostras na plataforma GNPS. A partir da rede molecular podemos confirmar por exemplo a ausência da ciclopenina na fração EB co CENA + PENE\_CLV E e maior quantidade de viridicatol no EB co CENA + PENE, quando comparados a fração e ao extrato bruto apenas do cultivo simples do fungo *P. echinulatum* (EB CBD\_CLV E e EB CBD). Além de observar a presença de um *cluster* que foi anotado como sendo correspondente a substância mevastatina ionizada em diferentes adutos  $m/z$  391,2  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  408,2  $[M+NH_4]^+$  e  $m/z$  413,2  $[M+Na]^+$  que está presente nos extratos brutos EB CBD e EB co CENA + PENE e seu análogo lovastatina  $m/z$  405,2  $[M+H]^+$  presente apenas no extrato bruto do fungo *P. echinulatum* (EB CBD). Para o *cluster* que contém os nodos com  $m/z$  295,1 e 311,1 correspondentes as substâncias ciclopenina e ciclofenol, respectivamente, podemos notar também a presença da substância com  $m/z$  268,1 anotada pelo GNPS como 3-(2-hidroxi-etil)-1,3-di-hidroquinazolina-2,4-diona, um alcaloide quinazolínico.



**R = H, Mevastatina**

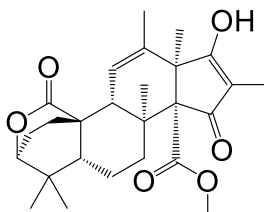
**3-(2-hidroxi-etil)-1,3-di-hidroquinazolina-2,4-diona**

**R = CH<sub>3</sub>, Lovastatina**



A atlantinona A, um meroterpenoide comumente isolado de fungos do gênero *Penicillium* foi outra substância anotada pelo GNPS, que ainda não havia sido identificada no extrato bruto da monocultura do fungo *P. echinulatum* e está presente na rede molecular com  $m/z$  443,23  $[M+H]^+$  nos extratos brutos EB CBD e EB co CENA + PENE, além da fração EB CBD\_CLV E. A atlantinona A foi originalmente produzida e isolada pela primeira vez por manipulação epigenética química de *P. citreonigrum*, no entanto, também pode ser verificada sua produção em condições padrão de crescimento pelas espécies; *P. solitum*, *P. discolor*, *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P.*

*palitans*, *P. novaezeelandiae* e *P. monticola* (WANG et al., 2010; DALSGAARD et al., 2012).

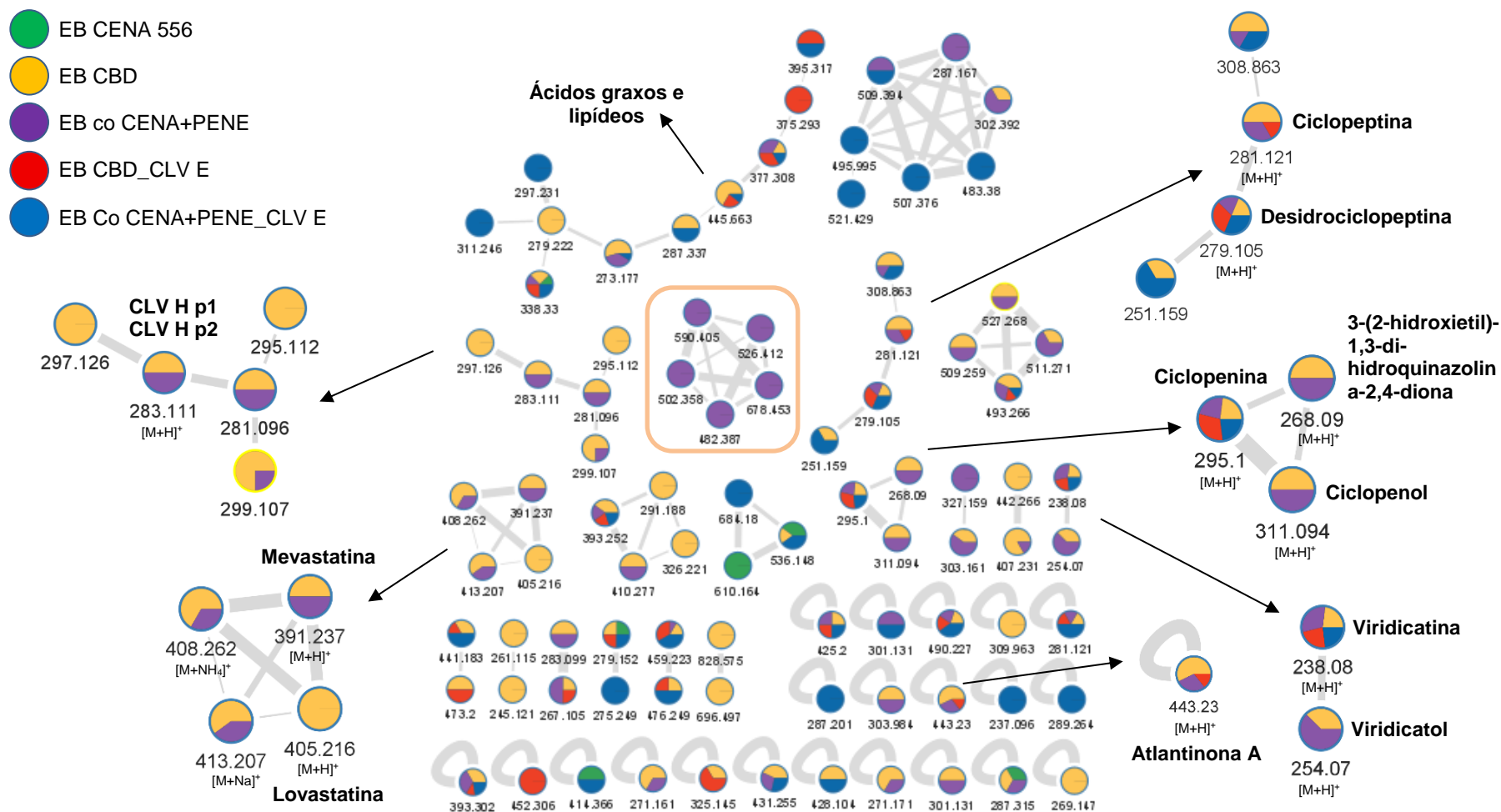


**Atlantinona A**

As substâncias inéditas (CLV H p1 e CLV H p2) isoladas do cultivo do fungo *P. echinulatum* discutidas no Capítulo I e que apresentam  $m/z$  283,1  $[M+H]^+$  podem ser observadas em um *cluster* com nodos interligados de substâncias não anotadas no GNPS ( $m/z$  281,1; 283,1; 295,1; 297,1 e 299,1), o que sugere a presença de um *cluster* com compostos desconhecidos análogos aos inéditos descritos no Capítulo anterior. Além disso, há um *cluster* destacado no centro da Figura 38 que contém apenas substâncias presentes do extrato bruto do cultivo misto (EB co CENA + PENE, roxo), dentre elas o pico 20 ( $m/z$  502,3) e um *cluster* correspondente a ácidos graxos e outros compostos lipídicos de acordo com anotações da plataforma GNPS.

O uso de ferramentas como o GNPS contribui no estudo de produtos naturais evitando perda de informações químicas, além de auxiliar no fracionamento e isolamento bioguiado de novas moléculas bioativas (PHILIPPUS et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020). O estudo recente de Pilon et al. (2022) combinou a abordagem de redes moleculares usando dados de CG-EM/EM com ensaios larvicidas como uma nova estratégia para a descoberta de substâncias bioativas em amostras de óleos essenciais de 20 espécies de plantas através de ensaios larvicida (determinação de  $CL_{50}$ ). De acordo com os resultados, os autores descobriram de maneira rápida, padrões de distribuição entre famílias e classes metabólicas em *clusters*, além de preverem propriedades larvicidas de derivados acíclicos de monoterpenos, incluindo citral, neral, citronelal e citronelol, e suas formas acetato ( $CL_{50} < 50 \text{ g mL}^{-1}$ ).

**Figura 38.** Rede molecular dos extratos brutos e frações analisados por CL-EM/EM em modo de ionização positivo. Os nodos representam as substâncias detectadas e estão coloridos de acordo com o tipo de amostra. Os traços entre os nodos representam a semelhança estrutural molecular entre as substâncias e os nodos sem correspondência espectral com outras substâncias da biblioteca do GNPS estão representados como *self-loops*.



**Tabela 26.** Metabólitos identificados nos extratos brutos EB CENA 556, EB CBD e EB co CENA + PENE por CLAE-DAD-IES-EM em modo de ionização positivo.

Pico (n°)	T <sub>R</sub> (min.)	UV <sub>máx.</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	EM/EM <sup>n</sup>	Substância	Extratos brutos (EB)		
						CENA 556	CBD	Co CENA + PENE
1	0,6	202	245	165, 123, 105, 86	NI	+	-	-
2	1,2	200/222	261	136, 107	NI	-	+	-
3a	3,8	215/282	311	146	Ciclopenol	-	+	+
3b		225/266/274/304/317	283	188, 173, 147, 132	CLV H p1	-	+	+
4	4,8	225/266/274/304/317	283	188, 173, 147, 132	CLV H p2	-	+	+
5	5,1	220	297	214, 187, 147, 132	NI	-	+	-
6	5,4	220	283	265, 224, 196	NI	-	+	+
7	5,8	220/281/305/317/330	254	208, 180, 132	Viridicatol	-	+	+
8	6,0	212/289	295	208, 146	Ciclopenina	-	+	+
9	6,4	217/290	281	148, 134, 120, 91	Ciclopeptina	-	+	+
10	6,6	221/282	279	148, 132, 120, 91	Desidrociclopeptina	-	+	+
11	6,7	221	511	220, 120	NI	-	+	+
12	6,8	222	267	249, 208, 180	NI	-	-	+
13	6,9	222	303	148, 130, 114	NI	-	+	+
14	7,3	220/288/304/317/331	238	192, 165, 132, 105	Viridicatina	-	+	+
15	8,1	222	443	173, 145, 119, 95	Atlantinona A	-	+	+
16	8,7	223	459	145, 119, 95	NI	-	+	+
17	9,4	225	391	211, 185, 159, 143	Mevastatina	-	+	+
18	10,1	223	393	213, 187, 145, 105	NI	-	+	+
19	10,4	224	301	213, 199	NI	-	+	+
20	10,8	224	502	247, 121, 89	NI	-	-	+
21	11,1	224	377	199, 159, 121, 89	NI	-	-	+
22	13,6	226	167	137	NI	+	-	-

NI = não identificada

### 3. 5 CONCLUSÕES

Por meio da avaliação da atividade larvicida contra *A. aegypti* foi possível observar que dentre os extratos brutos analisados apenas aquele obtido a partir do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria CENA 556 *Geitlerinema* sp. e o fungo marinho *P. echinulatum* (EB co CENA + PENE) foi capaz de matar 77,5% das larvas de *A. aegypti* após 72 horas. Os demais extratos de monoculturas da cianobactéria (EB CENA 556) e do fungo (EB CBD) não apresentaram atividade.

A fração EB CBD\_CLV E apresentou atividade tempo-dependente, com valores de mortalidade de 30, 60 e 87,5% após exposição de 24, 48 e 72 horas e este mesmo perfil pôde ser observado para as frações EB co CENA + PENE\_CLV B e EB co CENA + PENE\_CLV E, sendo esta última a amostra que apresentou melhores resultados entre todas as avaliadas.

Em comparação do perfil químico dos extratos brutos do cultivo misto e das monoculturas dos organismos estudados neste Capítulo, os perfis químicos do extrato bruto EB CBD (monocultura de *P. echinulatum*) e EB co CENA + PENE (cultivo misto) foram semelhantes, exceto para os picos em 1,2 e 5,10 minutos com  $m/z$  261,1 e 297,1, respectivamente, presentes apenas no EB CBD e os picos em 6,8 ( $m/z$  267,1), 10,8 ( $m/z$  502,3) e 11,2 ( $m/z$  377,4) observados somente no EB co CENA + PENE. Os demais picos estão presentes em ambos os extratos em maior ou menor quantidade, dependendo da amostra. Pôde-se observar ainda produção reduzida de metabólitos pela monocultura da cianobactéria *Geitlerinema* sp., porém sua presença no cultivo misto parece ter influenciado o desenvolvimento e a produção de novos metabólitos pelo fungo. Ainda, baseados em resultados anteriormente publicados em relação ao isolamento do aminoácido *L*-fenilalanina a partir desta mesma linhagem de cianobactéria, sugerimos que a produção deste aminoácido pode ter sido direcionada para a síntese dos metabólitos pelo fungo *P. echinulatum* no cultivo misto.

A partir da análise do perfil químico das frações EB CBD\_CLV E e EB co CENA + PENE\_CLV E foi possível observar que a fração EB CBD\_CLV E apresentou três picos majoritários correspondentes as substâncias ciclopenina, desidrociclopeptina e viridicatina. Para a fração EB co CENA + PENE\_CLV E foram observados apenas dois picos majoritários referentes a desidrociclopeptina e viridicatina.

As substâncias ciclopenina e viridicatina foram avaliadas em relação a atividade larvicida (*A. aegypti*) e ambas não apresentaram atividade. Esses resultados levaram-



nos a sugerir que a atividade apresentada pela fração EB co CENA + PENE\_CLV E pode estar relacionada com a desidrociclopeptina (que não foi ensaiada por falta de massa), com a ausência da ciclopenina nesta fração ou ainda devido ao efeito de potenciação entre a desidrociclopeptina e a viridicatina.

Além dos resultados observados, com auxílio da plataforma GNPS foi possível confirmar a ausência da substância ciclopenina na fração EB co CENA + PENE\_CLV E e maior quantidade de viridicatol no EB co CENA + PENE, quando comparados a fração e ao extrato bruto apenas do cultivo simples do fungo *P. echinulatum* (EB CBD\_CLV E e EB CBD). Foram anotadas substâncias que ainda não haviam sido observadas para o extrato do fungo *P. echinulatum* (Capítulo I), como por exemplo, a mevastatina, anotada para os extratos brutos EB CBD e EB co CENA + PENE e seu análogo lovastatina apenas para o extrato bruto do fungo; além da substância com  $m/z$  268,1 anotada pelo GNPS como 3-(2-hidroxi-etil)-1,3-di-hidroquinazolina-2,4-diona, um alcaloide quinazolínico presente em ambos os extratos brutos (EB CBD e EB co CENA + PENE) e a substância atlantinona A ( $m/z$  433,2), um meroterpenoide também presente nos extratos brutos e na fração EB CBD\_CLV E.

Portanto, a partir dos resultados apresentados podemos concluir que houve interação química no cultivo misto entre os microrganismos avaliados. Esta interação foi benéfica pois, ficou evidenciado atividade larvicida promissora do extrato bruto e da fração CLV E obtidos a partir do cultivo misto quando comparados com o extrato e frações da monocultura de *P. echinulatum*. Além disso, este trabalho contribuiu com novos dados obtidos de co-culturas entre cianobactérias e fungos que ainda são escassos na literatura e abre caminhos para demais estudos como, por exemplo, isolamento das substâncias produzidas apenas no cultivo misto e avaliação quantitativa destes e outros metabólitos.

## **CAPÍTULO III**

**Uso de redes moleculares (*Molecular networking*) na busca de substâncias antiparasitárias (*Trypanosoma cruzi*) em cianobactérias**

## 4. CAPÍTULO III - Uso de redes moleculares (*Molecular networking*) na busca de substâncias antiparasitárias (*Trypanosoma cruzi*) em cianobactérias

### 4. 1 INTRODUÇÃO

#### 4. 1. 1 Uso de redes moleculares (*Molecular Networking*) na investigação de produtos naturais bioativos

A rede molecular é uma ferramenta de organização e visualização de grandes conjuntos de dados espectrais. A rede molecular facilita a identificação de padrões entre conjuntos amostrais, permitindo reconhecer classes metabólicas, substituintes e funções orgânicas em estruturas complexas de produtos naturais. Esta abordagem organizacional foi recentemente introduzida na descoberta de substâncias bioativas, estudos metabolômicos e na área médica (QUINN et al., 2017; PILON et al., 2021).

Os dados espectrais (EM/EM) são inseridos na plataforma GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking* e então uma rede molecular é gerada através de fragmentos dos espectros que são agrupados de acordo com a similaridade entre eles, que nesse caso é calculado pelo valor de cosseno entre os espectros presentes nas amostras ou entre as amostras e os espectros de referência presentes nos bancos de dados. Assim, são gerados agrupamentos espectrais com base em um valor pré-estabelecido de cosseno, que varia de 0 a 1, sendo que 1 indica 100% de similaridade e 0, totalmente diferentes. Dessa forma, se o pareamento entre dois espectros possuir similaridade de cosseno maior ou igual ao pré-estabelecido pelo usuário, uma conexão ou um traço entre os dois espectros é estabelecido (WANG et al., 2016; ARON et al., 2020).

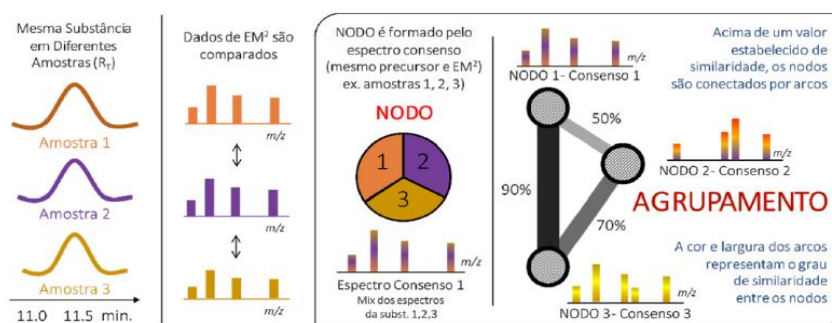
Uma substância pode apresentar um conjunto de espectros, sendo assim é necessária uma etapa de agrupamento de íons de uma mesma substância representado por um nodo (WATROUS et al., 2012; WANG et al., 2016).

Os nodos da rede são então anotados utilizando diferentes bibliotecas de substâncias, seguindo os mesmos critérios de pareamento espectral, número mínimo de picos compartilhados e a maximização da similaridade do cosseno, considerando a diferença das massas entre os íons precursores (WATROUS et al., 2012; WANG et al., 2016; ARON et al., 2020).

De forma resumida, um nodo representa uma substância e a sua similaridade ou parentesco é representado por traços, formando assim, grupos de metabólitos semelhantes gerando a rede molecular (Fig. 39).

Para a construção das redes moleculares, as análises e processamentos devem ser realizados de acordo com as recomendações da plataforma do GNPS. A princípio os dados devem ser convertidos em formatos do tipo *mzXML*, *mzML* ou *mgf*. Posteriormente, esses dados devem ser transferidos para a plataforma, utilizando por exemplo, o pacote gratuito WinSCP. Segue-se então para a etapa de configuração de parâmetros para criação da rede molecular de acordo com a particularidade do estudo, instrumento, técnica e poder de resolução do equipamento (PILON et al., 2021).

**Figura 39.** Esquema representando a formação da rede molecular a partir de espectros EM/EM na plataforma GNPS.



Fonte: PILON et al., 2021

Para visualização e processamento da rede molecular o programa Cytoscape é o mais utilizado e recomendado pelos desenvolvedores da plataforma GNPS. Este programa permite uma navegação dinâmica dos gráficos, além de possibilitar a utilização de etiquetas, cores e formatos diferentes para os nodos. Geralmente o tamanho do nodo é configurado para representar a abundância relativa do íon precursor, enquanto a largura dos traços que liga um nodo ao outro representa principalmente à similaridade entre os nodos (WATROUS et al., 2012; ALLARD et al., 2016).

Dessa forma, a estratégia de desrepliação utilizando as redes moleculares construídas a partir da plataforma GNPS tem alavancado as possibilidades de anotar substâncias conhecidas, bem como auxiliar na identificação de substâncias desconhecidas principalmente em misturas complexas de produtos naturais (GAO et

al., 2019). Porém, neste contexto é importante destacar que a plataforma GNPS, assim como outras podem ser muito úteis para anotação espectral, o que não necessariamente significa identificação estrutural (AKSENOV et al., 2017; PILON et al., 2021).

São diversos os estudos bioguiados de desreplicação e descoberta de novas moléculas bioativas a partir de produtos naturais utilizando as redes moleculares (NAMAN et al., 2017; KLEIN-JUNIOR et al., 2017; OLIVON et al., 2017; FLOROS et al., 2017; CAESAR et al., 2018; HOU et al., 2019; VELASCO-ALZATE et al., 2019). Uma abordagem mais recente das redes moleculares, denominada *bioactive molecular network* foi desenvolvida para acelerar o isolamento de substâncias em estudos bioguiados. Neste caso, os valores de bioatividade das amostras são associados as quantificações dos íons detectados nos experimentos de EM/EM nas redes moleculares. Dessa forma, após identificar correlações significativas, os dados são visualizados através da rede indicando nodos bioativos, facilitando assim o processo de desreplicação (NOTHIAS et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2021; PHAM et al., 2021; PILON et al., 2022).

Portanto, a aplicação de redes moleculares no estudo de produtos naturais permite a visualização de forma estruturada e intuitiva de grandes conjuntos de amostras, facilitando a compreensão em eventos de ecologia química (CARABALLO-RODRIGUEZ et al., 2017; VALLET et al., 2017, COSTA-LOTUFO et al., 2018; HARTMANN et al., 2017; SILVA et al., 2021; TABOADA et al., 2020), biossíntese, quimiotaxonomia (LEÃO et al., 2021) e principalmente na desreplicação e descoberta de novas substâncias bioativas.

#### **4. 1. 2 Doença de Chagas**

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana é uma infecção parasitária causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. A fase sintomática da doença se manifesta através de sintomas cardíacos, levando em alguns casos, à insuficiência cardíaca fatal (McCALL; McKERROW, 2014; OMS, 2022d).

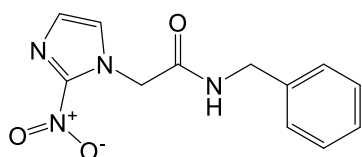
Há um endemismo da doença de Chagas na América Latina, porém houve um aumento do número de casos no Canadá, nos Estados Unidos da América, em muitos países europeus e em alguns africanos, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo (OMS, 2022d).

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta duas fases. A fase inicial aguda é caracterizada por alta parasitemia, onde o parasita assume uma forma tripomastigota e invade o fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central e músculos esqueléticos e cardíacos (RASSI et al., 2010; ECHEVERRIA; MORILLO 2019). Na fase aguda, os pacientes podem apresentar uma doença febril leve ou ser assintomáticos. Após a fase aguda, o *T. cruzi* assume a forma amastigota, desencadeando uma reação inflamatória local. A fase aguda geralmente dura de 1 a 2 meses e é seguida por uma fase indeterminada assintomática, sem manifestações clínicas. Cerca de 30% dos pacientes infectados desenvolvem doença de Chagas crônica, na qual os parasitas causam danos aos órgãos-alvo (RASSI et al., 2017; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

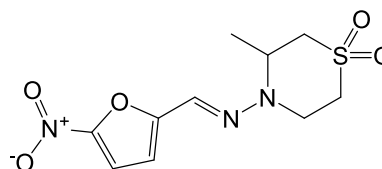
O envolvimento cardíaco é a manifestação mais grave da doença de Chagas, acometendo 1/3 dos indivíduos infectados em algum momento de suas vidas. A cardiomiopatia chagásica crônica caracteriza-se por miocardite difusa, com substituição tecidual por fibrose e anormalidade da motilidade segmentar da parede, sendo a cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca considerada o estágio tardio da evolução clínica (NUNES et al., 2013; LIDANI et al., 2019).

Os médicos ainda não são capazes de prever aqueles pacientes que desenvolverão a forma mais grave da doença e aqueles que permanecerão assintomáticos, dessa forma as diretrizes atuais do tratamento recomendam tratar todos os pacientes soropositivos com 50 anos ou menos, mesmo que as drogas utilizadas, benzonidazol (primeira opção) e nifurtimox (Fig. 40), causem efeitos adversos significativos (BERN et al., 2007; McCALL et al., 2017; OMS, 2022d).

**Figura 40.** Medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.



**Benznidazol**



**Nifurtimox**

Esses medicamentos foram desenvolvidos na década de 1970 e ainda são as únicas opções comerciais com eficácia estabelecida para a doença. No entanto, essas

drogas têm eficácia comprovada apenas durante a infecção precoce e os benefícios na fase crônica são questionáveis. Algumas limitações do uso clínico do benzonidazol são o baixo benefício na fase crônica da doença, as variações regionais na eficácia, o surgimento de cepas resistentes, além da série de efeitos colaterais. Dessa forma, o reposicionamento e a associação de fármacos tem sido consideradas estratégias para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença (SOBRINHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2020). Neste contexto, há uma necessidade crescente de novas alternativas farmacológicas, seja pela otimização de medicamentos existentes ou pela busca de novas substâncias eficazes e seguras.

As substâncias de origem marinha presentes no mercado incluem medicamentos para o tratamento de câncer, infecções virais, neuropatias e hipertrigliceridemia, porém não há nenhum medicamento de origem marinha para o tratamento de doenças negligenciadas como a doença de Chagas. No entanto, muitos produtos naturais marinhos têm demonstrado atividade antiprotozoária (ÁLVAREZ-BARDÓN et al., 2020; NWEZE et al., 2021), dentre eles podemos destacar a substância galinamida A e seus análogos sintéticos que inibem potentemente a enzima cruzaina e são extremamente tóxicos para o parasita *T. cruzi* no estágio amastigota intracelular (BOUDREAU et al., 2019). A galinamida A foi isolada pela primeira vez de uma coleção de cianobactérias marinhas coletadas no Panamá em 2009 e apresentou atividade contra o parasita causador da malária *Plasmodium falciparum* (LININGTON et al., 2009). Estes dados evidenciam o potencial antiparasitário de metabólitos provenientes de cianobactérias marinhas que necessitam ser melhor explorado.

## 4. 2 OBJETIVOS

### 4. 2.1 Objetivo geral

Realizar estudos químicos utilizando a ferramenta de rede molecular (*molecular networking*) visando a identificação de classes de substâncias com atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de cianobactérias pertencentes à biblioteca de extratos e frações do Laboratório do Prof. William H. Gerwick no Scripps – Instituto de Oceanografia da Universidade da Califórnia San Diego, EUA (SIO-UCSD).

### 4. 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a triagem biológica através da ferramenta de *High Throughput Screening* dos extratos brutos e frações pertencentes à biblioteca do Prof. William H. Gerwick frente ao parasita *T. cruzi*;
- ✓ Aplicar a ferramenta de rede molecular (*molecular networking*) na busca e identificação de substâncias classes de substâncias bioativas.



## 4. 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4. 3. 1 Material e equipamentos

#### Material:

- ✓ Coluna analítica Phenomenex Kinetex C-18 (100 x 4,60 mm, 5 µm)

#### Solventes:

- ✓ Solventes para extração e fracionamento: metanol, acetato de etila, *n*-hexano, diclorometano, etanol e acetona de grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico;
- ✓ Solventes de grau cromatográfico (CLAE): hexano, acetato de etila, acetonitrila e metanol (JT Baker);

#### Equipamentos e softwares:

- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific);
- ✓ Cromatógrafo Líquido Thermo Finnigan Surveyor Auto-amostrador-Plus/LC-Pump-Plus/PDA-Plus com Sistema acoplado a espectrômetro de massas de baixa resolução Thermo Finnigan LCQ Advantage Max ajustado;
- ✓ Sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm, Bedford);
- ✓ Equipamento para transferência de amostras Acoustic Transfer System-ATS (Biosera);
- ✓ Balança semi-analítica;
- ✓ Lavadora ultrassônica;
- ✓ Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific);
- ✓ Xcalibur Software (Thermo Fisher Scientific).

### 4. 3. 2 Coleção de extratos de cianobactérias marinhas

Ao longo dos anos diversas espécies de cianobactérias marinhas foram coletadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. William H. Gerwick. Estas coletas foram realizadas em diferentes localidades, tais como: Curaçao, Panamá, Papua Nova Guiné, Indonésia, Havaí, dentre outros. Após serem coletadas, as

amostras de cianobactérias foram trazidas para o laboratório, identificadas e algumas são mantidas em culturas isoladas (Scripps – Instituto de Oceanografia, UCSD) ou estão preservadas em soluções contendo etanol para eventuais estudos químicos e biológicos. Além dessa coleção de cianobactérias, existe também uma biblioteca de extratos brutos e frações devidamente codificadas de todas as espécies que já foram estudadas por membros do grupo de pesquisa do Prof. William Gerwick, bem como material resultante de estudos anteriores. Esta biblioteca é mantida sobre refrigeração ( $4 \pm 2$  °C) em placas de 96 poços a  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  em DMSO e as amostras totalmente secas estão armazenadas em uma sala sob refrigeração ( $-20 \pm 2$  °C).

#### **4. 3. 3 Avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*)**

Os ensaios de avaliação da atividade tripanocida foram realizados pela pesquisadora Dra. Miriam Aparecida Giardini com auxílio da doutoranda no Centro de Descoberta e Inovação em Doenças Parasitárias (do inglês *Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases - CDIPD*) no Skaggs – Faculdade de Farmácia e Ciências Farmacêuticas UCSD sob a supervisão do Prof. Dr. Jair L. Siqueira-Neto.

Para a triagem da atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* foram confeccionadas 10 placas de 384 poços do tipo Aurora contendo 20  $\mu\text{L}$  de amostras na concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

A linhagem celular de mioblastos de camundongo C2C12 (ATCC #CRL-1772) foi cultivada em meio Dulbecco modificado contendo  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino, 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina,  $100 \text{ U mL}^{-1}$  de penicilina e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* CA-1/72 foram obtidas de sobrenadantes de culturas C2C12 infectadas após 4-7 dias de infecção. As culturas foram mantidas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Para o ensaio de infecção para avaliar a atividade antiparasitária das amostras, 25  $\mu\text{L}$  de meio DMEM contendo aproximadamente 700 células C2C12 foram semeadas em cada poço em placas de 384 poços. Posteriormente foram adicionadas 25  $\mu\text{L}$  de solução contendo cerca de 7.000 parasitas e 250 nL de amostras a  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  por poço para uma concentração final de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de amostras em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Para transferência das amostras foi utilizado o sistema de transferência acústica (ATS-Acoustic Transfer System, Biosera). As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, as placas foram fixadas com solução de *p*-formaldeído a 8% (50

µL por poço). Finalmente, uma solução de coloração contendo 0,5 µg mL<sup>-1</sup> de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi adicionada a cada poço das placas e estas foram incubadas por pelo menos 4 horas antes das leituras. As imagens foram adquiridas por um microscópio IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) e analisadas pelo programa IN Cell Analyzer Developer 1.6. Os parâmetros de tamanho usados para diferenciar organelas do hospedeiro e do parasita foram 125 µm<sup>2</sup> para o núcleo das células do hospedeiro e 1–2 µm<sup>2</sup> para núcleo/cinetoplasto dos parasitas. Os números de células hospedeiras e amastigotas intracelulares foram determinados com base na quantificação da célula hospedeira e do núcleo do parasita, fornecendo uma medida de inibição do crescimento durante as primeiras 48 h de tratamento pós-infecção em comparação com os controles não tratados. Os resultados antiparasitários foram expressos em termos de atividade relativa normalizada com base na taxa média de infecção (número de células infectadas/número total de células) de controles negativos (0,1% de DMSO, 0% de atividade) e controles positivos (40 µM de benzonidazol). A viabilidade celular foi avaliada com base no número total de células divididas pelo número médio de células de controles não tratados (0,1% DMSO), sendo < 0,5, considerada uma amostra citotóxica.

#### **4. 3. 4 Obtenção das redes moleculares e estudo químico das frações bioativas**

A partir dos dados de atividade biológica foram selecionadas 10 frações da coleção de extratos e frações da biblioteca do Prof. William H. Gerwick para desreplicação e estudo químico mais detalhado (Tabela 27). O método de extração para obtenção dos extratos brutos que foi aplicado para todas as amostras foi extração exaustiva por sonicação utilizando como solventes uma mistura de diclorometano:metanol (2:1) e o processo de fracionamento foi o mesmo descrito no item 2. 3. 5 do Capítulo I obtendo-se 9 frações (A-I) após submissão dos extratos brutos obtidos a cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Foram obtidos dados de CL-EM/EM (colocar metodologia) das 10 amostras mais ativas frente ao parasita *T. cruzi*. Esses dados foram convertidos para arquivos de *mzML* online (<https://gnps-quickstart.ucsd.edu/conversion>) ou utilizando o programa MSConvert, posteriormente foram submetidos à plataforma GNPS Molecular Networking. As redes moleculares foram geradas pela interconexão de espectros EM/EM das amostras comparadas e processadas pelo programa

Cytoscape 3.9.0 para visualização e seleção de amostras a serem trabalhadas (WANG et al., 2016).

**Tabela 27.** Códigos e dados das frações selecionadas pertencentes a biblioteca do Prof. William H. Gerwick – Scripps-SIO-UCSD.

<b>Código interno</b>	<b>Código da coleção</b>	<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>
1927B	SS23SEP09-1	<i>Lyngbya</i>	Mar de Salton
A2142F	PAB-7APR13-3	NI	Panamá
1704A	PNG4MAY07-4	<i>Lyngbya</i>	Kenst Teef
A2141E	PAP-25APR13-3	<i>Symploca</i>	Panamá
1927A	SS23SEP09-1	<i>Lyngbya</i>	Mar de Salton
A2142G	PAB-7APR13-3	NI	Panamá
A1845A	PAP26OCT08-1	<i>Lyngbya</i> sp.	Panamá
1599A	PAC12MAR06-D38	<i>Lyngbya</i>	Ilha Coiba
1646F	ISB3NOV94-8	<i>Leptolyngbya</i>	Indonésia
A2143B	PAB-6APR13-2	<i>Symploca</i>	Panamá

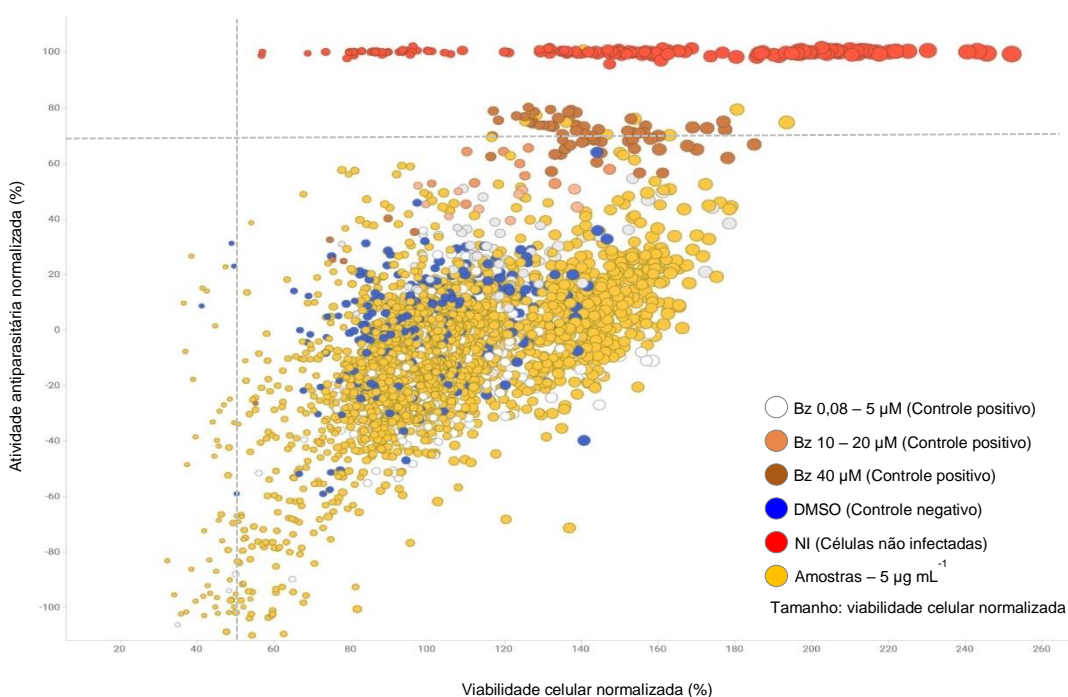
NI: Não identificada

## 4. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. 4. 1 Avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*)

Aproximadamente 2.800 amostras pertencentes à biblioteca de extratos e frações do Laboratório do Prof. William H. Gerwick no SIO-UCSD tiveram atividade antiparasitária avaliada frente ao parasita *T. cruzi*. A Figura 41 mostra os resultados obtidos de forma geral em um gráfico de dispersão. O benzonidazol em diferentes concentrações (0,08 – 40  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo, e o DMSO (< 0,4%) como controle negativo. Além desses controles, para o cálculo de porcentagem de inibição do crescimento do parasita também são considerados os poços contendo apenas células não infectadas, o que seria uma resposta ideal de atividade antiparasitária (~ 100%). Na Tabela 28 estão os dados de atividade antiparasitária, citotoxicidade (células C2C12) e quantidade de amostras restantes no laboratório das frações mais ativas da biblioteca, ou seja, que apresentaram inibição de crescimento do parasita  $\geq 70\%$  quando testadas na concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Figura 41.** Gráfico de dispersão demonstrando os resultados de inibição do crescimento *in vitro* de *T. cruzi* (atividade antiparasitária normalizada %) e citotoxicidade (viabilidade celular – C2C12 normalizada %) de extratos e frações da biblioteca avaliada.



**Tabela 28.** Resultados de atividade antiparasitária (porcentagem de inibição do crescimento do parasita *T. cruzi*), viabilidade celular (C2C12) e massa remanescente das frações mais ativas da biblioteca de extratos e frações de cianobactérias do Prof. William Gerwick.

Amostras	Atividade antiparasitária (%)	Viabilidade celular (%)	Massa (mg)
1927B	79	183	-
A2142F	78	128	19,1
1704A	77	131	24,8
A2141E	75	123	-
1927A	75	188	-
A2142G	75	132	5,6
A1845A	70	149	-
1599A	70	167	62,3
1646F	70	140	-
A2143B	70	115	46,2

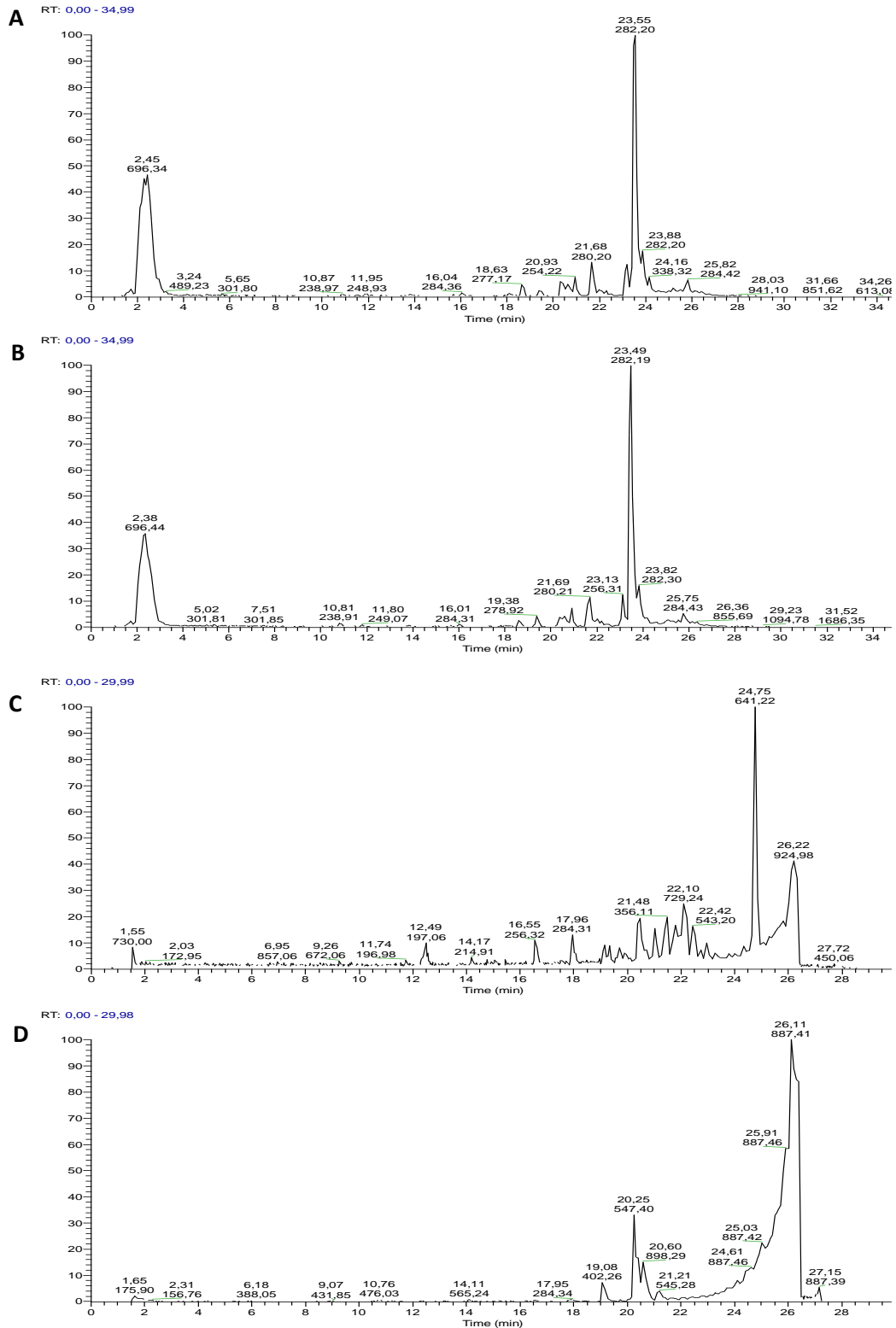
Espécies do gênero *Lyngbya*, *Symploca* e *Leptolyngbya* apresentaram atividade tripanocida. Dentre essas frações mais ativas, podemos destacar os pares 1927 A (75 %) e B (79 %) e A2142F (78 %) e G (75 %) pertencentes a mesma linhagem de cianobactéria, 1927 e A2142, respectivamente. Sendo a linhagem 1927 do gênero *Lyngbya* coletada no Mar de Salton (ou *Salton Sea*) e A2142, ainda não identificada, coletada no Panamá.

#### 4. 4. 2 Rede molecular e estudo químico das frações bioativas

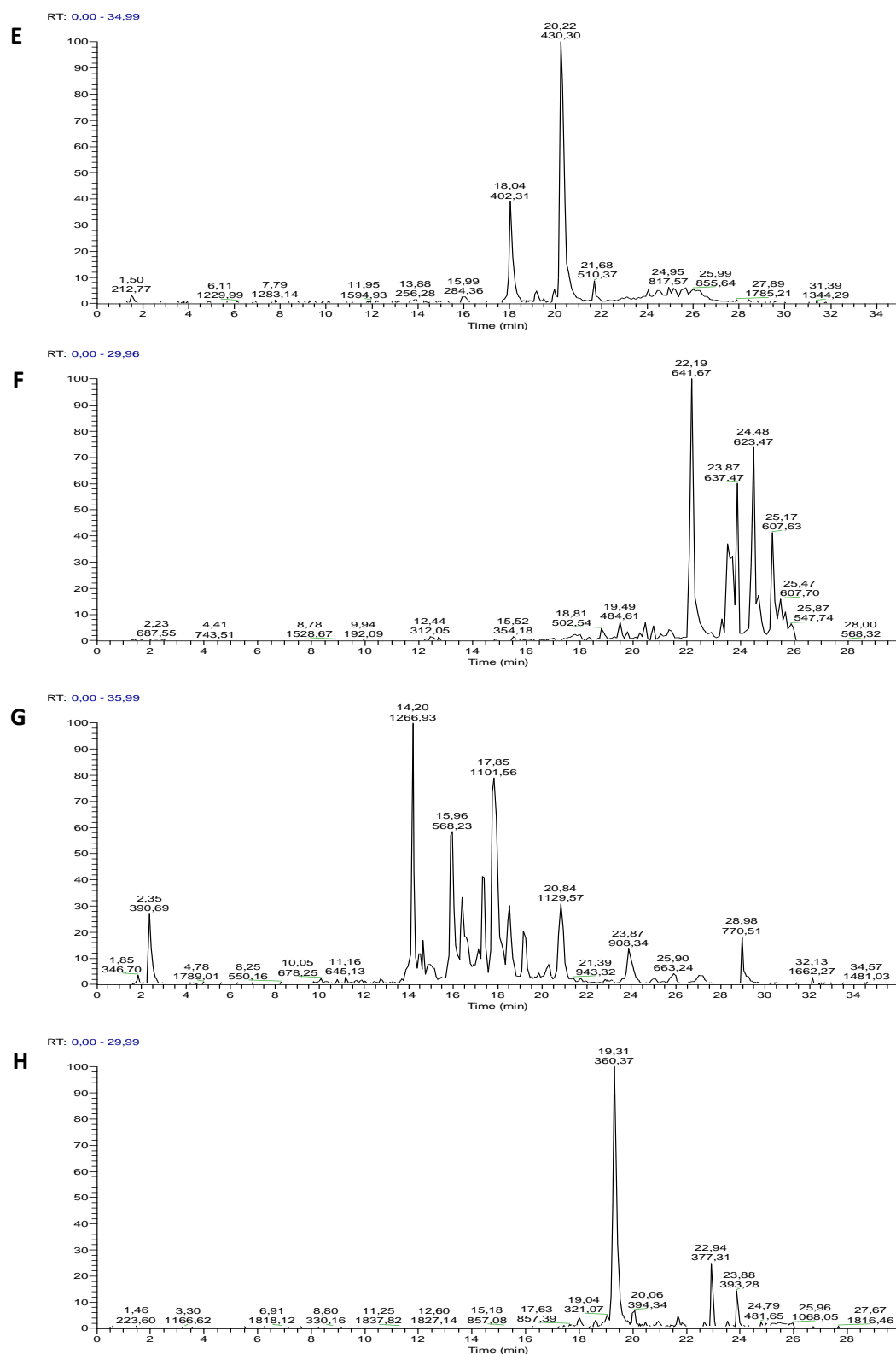
Para todas as 10 frações mais ativas foram obtidos dados de CL-EM/EM para construção da rede molecular e desreplicação, exceto para as frações A1845A e 1599A, devido à perda de informações e dados a respeito dessas amostras.

Como podemos observar nos cromatogramas de pico base das frações provenientes do mesmo extrato bruto (1927 e A2142) são semelhantes entre seus pares (Fig. 42A-D).

**Figura 42.** Cromatogramas de pico base das frações 1927A (A), 1927B (B), A2142F (C), A2142G (D), 1704A (E), A2141E (F), 1646F (G) e A2143B (H) em modo de ionização positivo.



Continua...



Para a fração 1704A notamos principalmente a presença de dois compostos majoritários, com  $m/z$  402,31 e 430,30, respectivamente (Fig. 42E). A diferença entre as massas é de 27,99 Da, sugerindo por exemplo uma metilação da substância com  $m/z$  402,31 ou a perda de uma unidade monóxido de carbono -CO por  $m/z$  430,30,



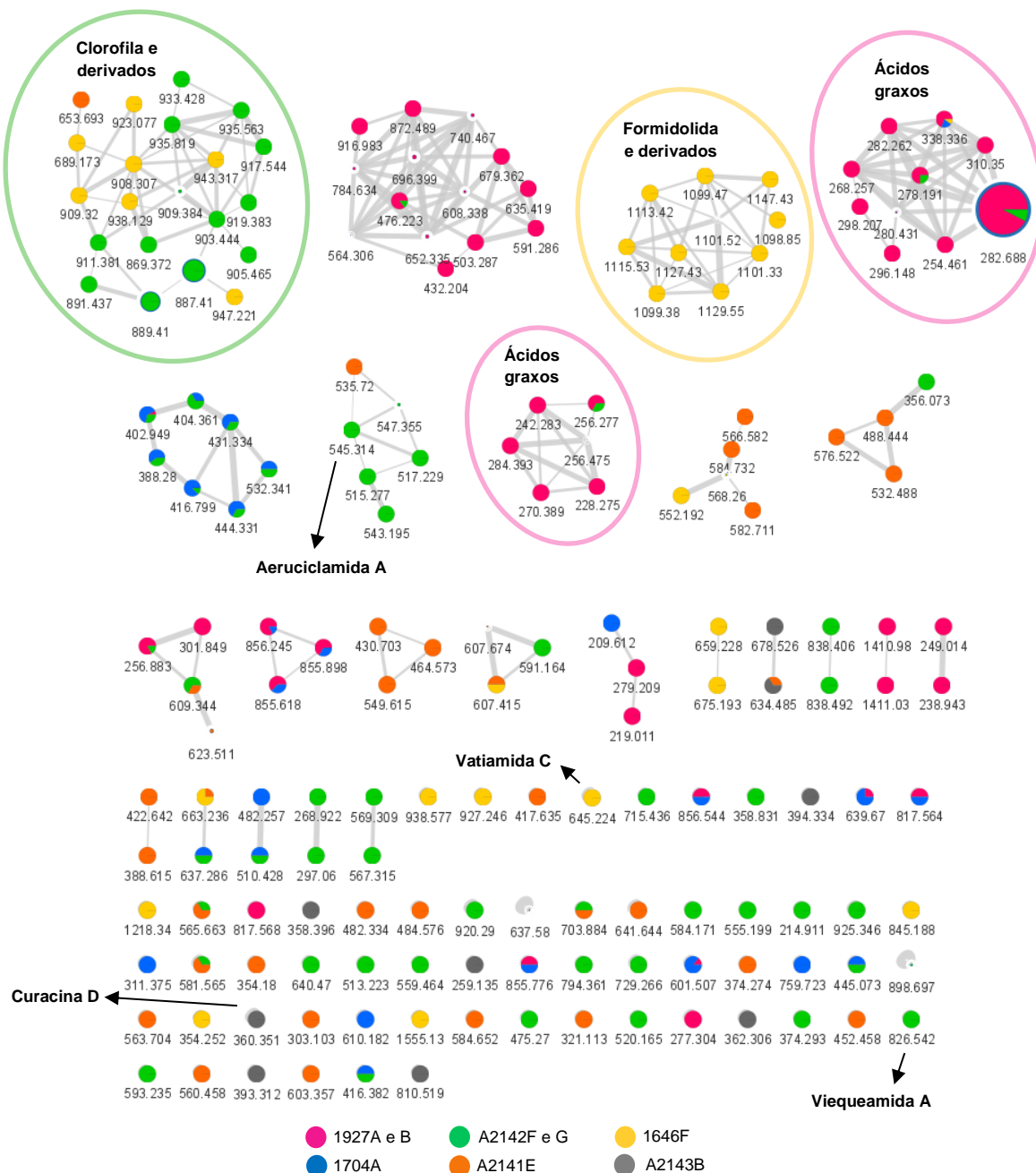
comum em aldeídos e cetonas (JUNG et al., 2008). Entretanto, podemos observar na rede molecular obtida que esses nodos não estão diretamente ligados apesar de pertencerem ao mesmo *cluster* (Fig. 43)

A rede molecular resultou em 183 nodos, conectados por 285 traços, agrupados em 14 *clusters* maiores, 10 pares solitários e 61 nodos sem correspondência espectral com outras substâncias da biblioteca do GNPS, representados como *self-loops* (Fig. 43). Uma das vantagens desta abordagem em redes moleculares é a capacidade de criar filtros para os nodos e traços a fim de reconhecer padrões no conjunto de dados. Nesse sentido, diferentes cores foram atribuídas aos nodos considerando o tipo de amostra (frações 1927A e B: rosa, 1704A: azul, A2142F e G: verde, A2141E: laranja, 1646F: amarelo e A2143B: cinza) e a abundância relativa de íons representada pelos tamanhos dos nodos (Fig. 43).

Em relação a desreplicação e identificação das moléculas presentes nas amostras mais ativas foi possível identificar que os ácidos graxos e seus derivados é a principal classe de substâncias que pode estar relacionada com a atividade antiparasitária. Essas substâncias são comumente encontradas em frações apolares como a maioria dentre as mais ativas (frações com as letras A e B no final do código).

Alguns derivados de ácidos graxos de origem natural e sintética como por exemplo, derivados conjugados de ácidos graxos acetilênicos comumente encontrado em plantas e bisfosfonatos derivados de ácidos graxos tem sido considerados com importantes classes de compostos com atividades farmacológicas e dentre elas atividade antiprotozoária contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* (BRANDÃO et al., 1997; SZAJNMAN et al., 2003 e 2005; SENN et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2015; LONDERO et al., 2018). Além disso, foi relatado que derivados de ácidos graxos 2-alcinoicos podem atuar como inibidores da topoisomerase de *L. donovani*, *T. cruzi* e *T. brucei* (CARCALLEIRA et al., 2012).

**Figura 43.** Rede molecular das frações mais ativas frente ao parasita *T. cruzi* analisadas por CL-EM/EM em modo de ionização positivo. Os nodos representam as substâncias detectadas e estão coloridos de acordo com o tipo de amostra e o tamanho representa a abundância relativa do íon precursor. Os traços representam o grau de similaridade entre os nodos e os nodos sem correspondência espectral na biblioteca do GNPS estão representados como *self-loops*.



Algumas substâncias já conhecidas foram anotadas a partir da análise da rede molecular e desreplicação na plataforma GNPS e aquelas que tiveram correspondências com os padrões já isolados e identificados no laboratório foram vatiamida C, encontrada na fração 1646F (*Leptolyngbya*); curacina D presente na fração A2143B (*Symploca*), viequeamida A e aeruciclâmica A anotadas para as

frações A2142F e G (espécie ainda não identificada). Além do *cluster* correspondente a formidolida e seus derivados apenas na fração 1646F (Fig. 44); alguns nodos presentes neste *cluster* não foram anotados pela plataforma GNPS, o que sugere a presença de substâncias inéditas. A vatiamida C foi caracterizada pela primeira vez em um estudo de rota biossintética PKS/NRPS tipo I na espécie de cianobactéria *Moorea producens* (MOSS et al., 2019) e a curacina D foi identificada como agente antimetabólico isolado da cianobactéria *Lyngbya majuscula* coletada nas Ilhas Virgens (MÁRQUEZ et al., 1998). A substância viequeamida A foi isolada da cianobactéria *Rivularia* sp. na região de Vieques em Porto Rico e apresentou potente atividade citotóxica para células tumorais de pulmão (H460) com valor de  $Cl_{50}$  de  $60 \pm 10$  nM (BOUDREAU et al., 2012), enquanto aeruciclamida A, um peptídeo cíclico obtido pela primeira vez da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* apresentou toxicidade para o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus* com valor de CL de 34  $\mu$ M (PORTMANN et al., 2008).

Os estudos de desreplicação e descoberta de novas substâncias bioativas a partir de produtos naturais são os tipos de estudos mais comuns na aplicação de redes moleculares. Naman et al. (2017) analisaram 10 linhagens de cianobactérias do gênero *Symploca* sp. na busca por substâncias citotóxicas. As amostras analisadas por redes moleculares e a partir da biblioteca do GNPS levou a identificação de um peptídeo inédito com atividade antitumoral, a samoamida A.

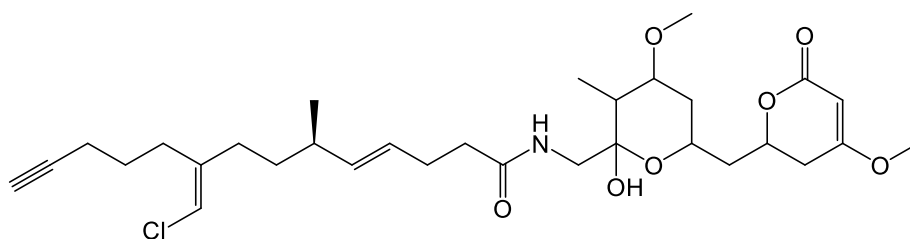
Hou e colaboradores (2019) utilizando dados de CLAE-EM/EM, redes moleculares e dados de RMN de  $^1H$ , identificaram ciclohexadepsipeptídeos bioativos (crysogeamidias A-G) de *Penicillium chrysogenum*.

Em um estudo desenvolvido por Floros e colaboradores (2017) foram analisados cerca de 1.000 microrganismos marinhos, dos quais mais de 70% não haviam sido taxonomicamente caracterizados. Os autores avaliaram o perfil químico de produtos naturais marinhos priorizando extratos na ausência de informações genômicas ou de atividade biológica e agrupamentos específicos para algumas cepas levaram ao isolamento e elucidação de novas duas substâncias, os ácidos marídricos A e B.

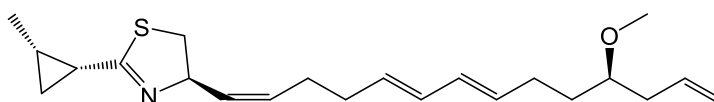
Sendo assim, podemos observar que a abordagem utilizando redes moleculares está entre os avanços das ferramentas computacionais aplicada a química de produtos naturais do século XXI. A visualização de forma estruturada e intuitiva de grandes conjuntos de amostras facilita a compreensão de eventos

multifatoriais encontrados em ecologia química, estudos de biossíntese, quimiotaxonomia, e na desreplcação e descoberta de novas substâncias bioativas (PILON et al., 2021).

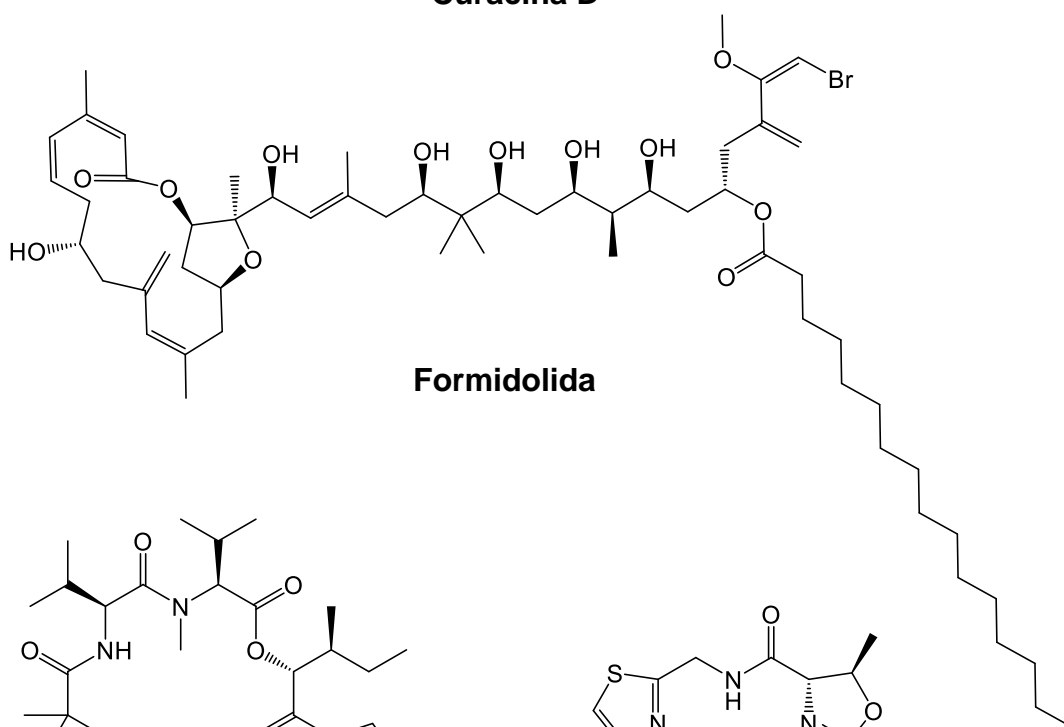
**Figura 44.** Substâncias anotadas para as amostras analisadas na plataforma GNPS.



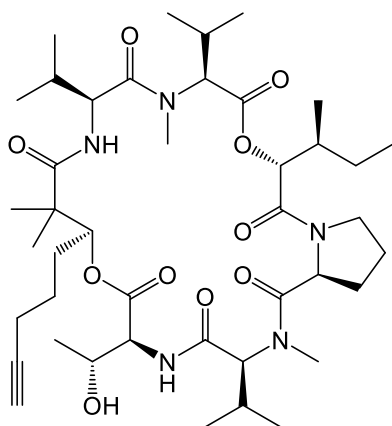
**Vatiamida C**



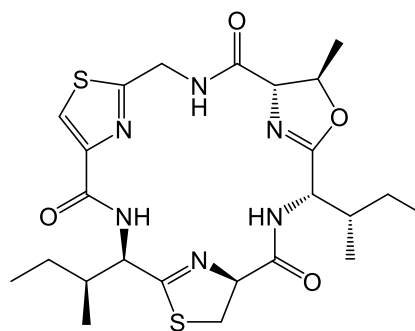
**Curacina D**



**Formidolida**



**Viequeamida A**



**Aeruciclamida A**

## 4. 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho toda a biblioteca de extratos e frações de cianobactérias (aproximadamente 2.800 amostras) pertencentes ao Laboratório coordenado pelo prof. Dr. William H. Gerwick no Scipps – Instituto de Oceanografia – UCSD foi avaliada frente ao parasita *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Essa abordagem foi possível devido a colaboração com o prof. Dr. Jair L. Siqueira-Neto, coordenador do Centro de Descoberta e Inovação em doenças Parasitárias no Skaggs – Faculdade de Farmácia e Ciências Farmacêuticas – UCSD.

Dentre todas as amostras avaliadas, 10 frações apresentaram inibição do crescimento do parasita  $\geq 70\%$  quando testadas na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir desses resultados de *screening* biológico, um estudo químico de desreplicação utilizando dados de CL-EM/EM, plataforma GNPS e rede molecular foi realizado com objetivo de identificar as classes de metabólitos que apresentavam atividade antiparasitária. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os ácidos graxos e seus derivados é a principal classe de substâncias que pode estar relacionada com a atividade antiparasitária.

Além disso, por meio da análise dos dados da rede molecular obtida foram identificadas cinco substâncias conhecidas: vatiamida C, curacina D, viequeamida A, aeruciclamida A e formidolida.

Os resultados obtidos favorecem a perspectiva de continuidade dos estudos com a finalidade de descobrir quais substâncias são responsáveis pela atividade antiparasitária, além de investigar por exemplo, nodos presentes em *clusters* que não apresentaram correspondência com nenhuma substância da plataforma GNPS e do Dicionário de Produtos Naturais Marinhos (MarinLit), o que pode levar ao isolamento de metabólitos bioativos inéditos.

## 5. REFERÊNCIAS

- AANEN, D. K.; BISSELING, T. The birth of cooperation. **Science**, v 345, p. 2, 2014.
- ABDEL-HADI, A. M.; AWAD, M.; ABO-DAHAB N.; EL-SHANAWANY, A.; ABDELKADER, M.; ABO KADOUM, M. Viridicatin and Dehydrocyclopeptine, two bioactive alkaloids isolated from marine derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 9759. **Issues Biol Sci Pharma Res.**, v. 3, p 115-122, 2015.
- AKSENOV, A. A.; DA SILVA, R.; KNIGHT, R.; LOPES, N. P.; DORRESTEIN, P. C.; Global chemical analysis of biology by mass spectrometry. **Nat Rev Chem.**, v. 1, p. 1, 2017.
- ALI, M. S.; RAVIKUMAR, S.; BEULA J. M. Bioactivity of seagrass against the dengue fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Asian Pac J Tro Bio.**, v. 2, p. 570- 573, 2012.
- ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J.-L. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Anal Chem.**, v. 88, n. 6, p. 3317-23, 2016.
- ALLEGRA, E.; TITBALL, R. W.; CARTER, J.; CHAMPION, O. L. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469-472, 2018.
- ÁLVAREZ-BARDÓN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; ORDÓÑEZ, C.; SEPÚLVEDA-CRESPO, D.; CARBALLEIRA, N. M.; TEKWANI, B. L. *et al.* Screening marine natural products for new drug leads against trypanosomatids and malaria. **Mar Drugs**, v. 18:1–42, 2020.
- ALVES, C. M.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, I. F.; LUCISANO VALIM, Y. M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, v. 60, p. 601-608, 2003.
- ANDERSON, H. A.; BRACEWELL, J. M.; FRASER, A. R.; JONES, D.; ROBERTSON, G. W.; RUSSEL, J. D. 5-hydroxymaltol and mycophenolic acid, secondary metabolites from *Penicillium echinulatum*. **Trans Br Myco. Soc.**, v. 91, p. 649-651, 1988.
- ANDOH, Y.; MIZUTANI, A.; OHASHI, T.; KOJO, S.; ISHII, T.; ADACHI, Y.; IKEHARA, S.; TAKETANI, S. The Antioxidant Role of a Reagent, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Detecting Reactive-Oxygen Species and Blocking the Induction of Heme Oxygenase-1 and Preventing Cytotoxicity. **J Biochem.**, v. 140, p. 483-489, 2006.
- ANDRADE, M. F.; KABEYA, L. M.; AZZOLINI, A. E.; SANTOS, E. O.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S.; PARIS, M. R.; EMERY, F. S.; PUPO, M. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. **Int Immunopharmacol.**, v. 15, p. 387-394, 2013.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S. *et al.* In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 359-365, 2007.

ANDRIANASOLO, E. H.; GOEGER, D.; GERWICK, W. H. Mitsoamide: a cytotoxic linear lipopeptide from the Madagascar marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp. **Pure Appl Chem.**, v. 79, p. 593-602, 2007.

ANDRIANASOLO, E. H.; GROSS, H.; GOEGER, D.; MUSAFIJA-GIRT, M.; MCPHAIL, K.; LEAL, R. M.; MOOBERRY, S. L.; GERWICK, W. H. Isolation of swinholidide A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. **Org Lett.**, v. 7, p. 1375-1378, 2005.

ANGELIN, J.; KAVITHA, M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. **Int j Biol Macro.**, v. 162, p. 853-865, 2020.

ANGELIS, S.; NOVAK, A. C.; SYDNEY, E. B.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; NOSEDA, M. D.; THOLOZAN, J. L.; LORQUIN, J.; SOCCOL, C.R. Co-Culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process preliminary optimization and partial characterization. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 167, p.1092-1106, 2012.

ANGHEL, N.; BALMER, V.; MÜLLER, J.; WINZER, P.; AGUADO-MARTINEZ, A.; ROOZBEHANI, M.; POU, S.; NILSEN, A.; RISCOE, M.; DOGGETT, J. S.; HEMPHILL, A. Endochin-like quinolones exhibit promising efficacy against *Neospora caninum* in vitro and in experimentally infected pregnant mice. **Front Vet Sci.**, v. 5, p. 285, 2018.

ANTONY, H. A.; PARIJA, S. C. Antimalarial drug resistance: an overview. **Trop Parasitol.**, v. 6, p. 30-41, 2016.

ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon.**, v. 56, p. 813-828, 2010.

ARCANGELI, C.; CANNISTRARO, S. In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids: approach to monitoring of UV-B irradiation stress on Antarctic fungus. **Biopolymers**, v. 57, p. 179-186, 2000.

ARMENTO, A. J.; OLDACH, J.; STOLPER, G.; LI, M.; BACHELOR, M.A.; HAYDEN, P.J. Evaluation of Cutaneous Damage and Repair Following Acute Solar Ultraviolet Radiation Exposure: Experiments with an In Vitro Reconstructed Human Skin Model and Excised Human Skin. **Appl In Vitro Toxicol.**, v.1, p.109-117, 2015.

ARON, A. T.; GENTRY, E. C.; MCPHAIL, K. L.; NOTHIAS, L. F.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; BOUSLIMANI, A.; PETRAS, D.; GAUGLITZ, J. M.; SIKORA, N.; VARGAS, F.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; ERNST, M.; KANG, K. BIN; ACEVES, C. M.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; KOESTER, I.; WELDON, K. C.; BERTRAND, S.; ROULLIER, C.; SUN, K.; TEHAN, R. M.; BOYA P, C. A.; CHRISTIAN, M. H.; GUTIÉRREZ, M.; ULLOA, A. M.; TEJEDA MORA, J. A.; MOJICA-FLORES, R.; LAKEY-BEITIA, J.; VÁSQUEZ-CHAVES, V.; ZHANG, Y.; CALDERÓN, A. I.; TAYLER, N.; KEYZERS, R. A.; TUGIZIMANA, F.; NDLOVU, N.; AKSENOV, A. A.; JARMUSCH, A. K.; SCHMID, R.; TRUMAN, A. W.; BANDEIRA, N.; WANG, M.; DORRESTEIN, P.

C.; Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nat Protoc.**, v.15, p. 1954-1991, 2020.

ASENSI, A.; DELÉPINE, R.; ROUSSEAU, F.; REVIERS, B. Morphology and taxonomy of *Adenocystis longissima* (Skottsberg) stat. nov. (Phaeophyceae) from subantarctic South America. **Polar Biol.**, v. 28, p. 82-91, 2004.

BALAKIREV, E. S.; PAVLYUCHKOV, V. A.; AYALA, F. J. DNA variation and symbiotic associations in phenotypically diverse sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 105, p. 16218-16223, 2008.

BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M. A.; BURZA, S.; GENOVESE, G. O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Dr.**, v. 17, p. 493-510, 2012.

BARBOSA, F.; PINTO, E.; KIJOA, A.; PINTO, M.; SOUSA, E. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. **Int J Antimicrob Agents**, v. 56, p. 106005, 2020.

BARKER, P. F.; THOMAS, E. Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. **Earth Sci Rev.**, v. 66, p. 143-162, 2004.

BARNADO, A.; CROFFORD, L. J.; OATES, J. C. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. **J Leukoc Biol.**, v. 99, p. 265-278, 2016.

BASSETTI, M.; MERELLI, M.; TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 12, p. 22, 2013.

BAUERMEISTER, A.; BRANCO, P. C.; FURTADO, L. C.; JIMENEZ, P. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; DA CRUZ LOTUFO, T. M. Tunicates: A model organism to investigate the effects of associated-microbiota on the production of pharmaceuticals. **Drug Discov Today Dis Models**, v. 28, p. 13-20, 2018.

BAWEJA, P.; KUMAR, S.; SAHOO, D.; LEVINE, I. Biology of Seaweeds. *In*: Fleurence, J.; Levine, I. (eds.). **Seaweed in Health and Disease Prevention**. Ed. Academic Press, 2016. cap. 3, p. 41-106.

BENELLI, G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: A systematic review. **Parasitol Res.**, v. 114, p. 3201-3212, 2015.

BENELLI, G.; JEFFRIES, C. L.; WALKER, T. Benelli, G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: A systematic review. *Parasitol. Insects*, v. 114, p. 3201-3212, 2016.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. D36-D42, 2013.



BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; MARIN-NETO, J. A.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H. *et al.* Evaluation and treatment of chagas disease in the United States a systematic review. **JAMA**, v. 298, p. 2171-2181, 2007.

BERNEIRA, L., M.; SANTI, I.; DA SILVA, C. C.; VENZKE, D.; COLEPICOLO, P.; VAUCHER, R. A.; DOS SANTOS, M. A. S.; PEREIRA, C. M. P. Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae. **Braz J Microbiol.**, v. 52, p. 1275-1285, 2021.

BLUNT, J. W.; CARROL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine Natural Products. **Nat Prod Rep.**, v. 35, p. 8-53, 2018.

BOUDREAU, P. D.; MILLER, B. W.; MCCALL, L-I.; ALMALITI, J.; REHER, R.; HIRATA, K.; LE, T.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; HOOK, V.; GERWICK, W. H. Design of gallinamide A analogs as potent inhibitors of the cysteine proteases human cathepsin L and *Trypanosoma cruzi* cruzain. **J Med Chem.**, v. 62, p. 9026-9044, 2019.

BRANDÃO, M. G.; KRETTLI, A. U.; SOARES, L. S.; NERY, C. G.; MARINUZZI, H. C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **J Ethnopharmacol.**, v. 57, p. 131-138, 1997.

BRAUN, G. H.; RAMOS, H. P.; CANDIDO, A. C. B. B.; PEDROSO, R. C. N.; SIQUEIRA, K. A.; SOARES, M. A.; DIAS, G. M.; MAGALHÃES, L. G.; AMBRÓSIO, S. R.; JANUÁRIO, A. H.; PIETRO, R. C. L. R. Evaluation of antileishmanial activity of harzialactone a isolated from the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp, **Nat Prod Res.**, v. 35, p. 1644-1647, 2021.

BROWNE, N., HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, p. 597-603, 2013.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Mar Genomics**, v. 2, p. 43-50, 2009.

CADENA-AIZAGA, M. I.; MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Organic UV filters in marine environments: an update of analytical methodologies, occurrence and distribution. **Trends Environ Anal Chem.**, v. 25, p. e00079, 2020.

CAESAR, L. K.; KELLOGG, J. J.; KVALHEIM, O. M.; CECH, R. A.; CECH, N. B. Integration of Biochemometrics and Molecular Networking to Identify Antimicrobials in *Angelica keiskei*. **Planta Med.**, v. 84, p. 721, 2018.

CAICEDO, N. H.; KUMIRSKA, J.; NEUMANN, J.; STOLTE, S.; THÖMING, J. Detection of bioactive exometabolites produced by the filamentous marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp. **Mar Biotechnol.**, v. 14, p. 436-445, 2012.

CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; DORRESTEIN, P. C.; PUPO, M. T. Molecular inter-kingdom interactions of endophytes isolated from *Lychnophora ericoides*. **Sci Rep.**, v. 7, p. 5373, 2017.

CARBALLEIRA, N. M.; CARTAGENA, M.; SANABRIA, *et al.* 2-Alkynoic fatty acids inhibit Topoisomerase IB from *Leishmania donovani*. **Bioor Med Chem Lett.**, V, 22, p. 6185-6189, 2012.

CASTENHOLZ, R. W. Culturing methods for cyanobacteria. **Methos Enzym.**, v. 167, p. 68-93, 1988.

CAVALCANTI, G. A.; BORGES, R. M.; CARNEIRO, G. R. A.; PADILHA, M. C.; PEREIRA, H. M. G. Variable Data Independent Acquisition and Data Mining Exploring Feature-Based Molecular Networking Analysis for Untargeted Screening of Synthetic Cannabinoids in Oral Fluids. **J Am Soc Mass Spectrom.**, v. 32, p. 2417-2424, 2021.

CELSO, A.; JOANA, S.; SUSETE, P.; HELENA, G.; MARIA, C. A.; LUIS, M. B.; RUI, P.; From marine origin to therapeutics: the antitumor potential of marine algae-derived compounds. **Front Pharmacol.**, v. 9, p. 1-24, 2018.

CHAMPION, O. L.; WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. **Virulence**, v. 7, p. 840-845, 2016.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **J Parasit Dis.**, v. 34, p. 1-13, 2010.

CHEN, C.; TSAI, Y.; CHANG, W.; YANG, S.; HWANG, T. Marine Natural Products Inhibitors of Neutrophil-Associated Inflammation. **Mar Drugs**, v. 14, p. 1-17, 2016.

CHEN, M.; ZHENG, Y.; CHEN, Z.; SHEN, N.; SHEN, L.; ZHANG, F.; ZHOU, X.; WANG, C. NaBr-Induced Production of Brominated Azaphilones and Related Tricyclic Polyketides by the Marine-Derived Fungus *Penicillium janthinellum* HK1 – 6'. **J Nat Prod.**, v. 82, p. 368-374, 2019.

CHENG, Z.; LIU, D.; CHENG, W.; PROKSCH, P.; LIN, W. Versiquinazolines L–Q, new polycyclic alkaloids from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **RSC Adv.**, v. 8, p. 31427, 2018.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res.**, v. 70, p. 440-446, 2010.

CLEMENTINO, L. D. C.; FERNANDES, G. F. S.; PROKOPCZYK, I. M.; LAURINDO, W. C.; TOYAMA, D.; MOTTA, B. P.; BAVIERA, A. M.; HENRIQUE-SILVA, F.; DOS SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. A. S. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent in vivo antileishmanial activity. **PLoS ONE**, v. 16, p. e0259008, 2021.

COMPAGNONE, R. S.; PIÑA, I. C.; RANGEL, H. R.; DAGGER, F.; SUÁREZ A. I.; REDDY, M. V. R. Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*, **Tetrahedron.**,v. 54, p. 3057-3068, 1998.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CARNEVALE-NETO, F.; TRINDADE-SILVA, A. E.; SILVA, R. R.; SILVA, G. G. Z.; WILKE, D. V.; PINTO, F. C. L.; SAHM, B. D. B.; JIMENEZ, P. C.; MENDONÇA, J. N.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, O. D. L.; LOPES, N. P.; Chemical profiling of two congeneric sea mat corals along the Brazilian coast: adaptive and functional patterns. **Chem Commun.**, v. 54, p. 1952, 2018.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug lead. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DA SILVA, E. M.; VAZ, M. G.; M. V.; GENUARIO, D. B.; ARMSTRONG, L., FIORE, M. F.; DEBONSI, H. M. Novel marine cyanobacteria from the Atlantic coast of Brazil. **Appl Phycol.**, v. 1, p. 58-71, 2020.

DAHMANE, R.; PANDEL, R.; TREBSE, P.; POLJSKAK, B. The role of sun exposure in skin aging. *In*: RAINES, C. P. **Sun Exposure: Risk Factors, Protection Practices and Health Effects**. New York: Nova Science Publishers, p. 1-40, 2015.

DALSGAARD, P. W.; PETERSON, B. O.; DUUS, J. O. ZIDORN, C.; FRISVAD, J. C.; CHRISTOPHERSEN, C.; LARSEN, T. O. Atlantione A, a Meroterpenoid Produced by *Penicillium ribeum* and Several Cheese Associated *Penicillium* Species. **Metabolites**, v. 2, v. 214-220, 2012.

DANOVARO. R.; BONGIORNI, L.; CORINALDESI, C.; GIOVANNELLI, D.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; GRECI, L.; PUSCEDDU, A. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. **Environ Health Perspect.**, v. 116, p. 441-447, 2008.

DEMAY, J.; BERNARD, C.; REINHARDT, A.; MARIE, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. **Mar Drugs**, v. 17, p. 320, 2019.

DIFFEY, B.L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **Int J Cosmet Sci.**, v. 16, p. 47-52, 1994.

DINARDO, J. C.; DOWNS, C. A. Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/ benzophenone-3. **J Cosmet Dermatol.**, v. 17, p. 15-19, 2018.

DISTEL, D.L.; ALTAMIA, M.A.; LIN, Z.; SHIPWAY, J.R.; HAN, A.; FORTEZA, I.; ANTEMANO, R.; LIMBACO, M.G.J.P.; TEOBOE, A.G.; DECHAVEZ, R.; *et al.* Discovery of chemoautotrophic symbiosis in the giant shipworm *Kuphus polythalamia* (Bivalvia: Teredinidae) extends wooden-steps theory. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 114, p. E3652–E3658, 2017.

DOS SANTOS, CAVALHEIRO, A. J.; TEMPONE, A. G.; *et al.* Antrypanosomal Acetylene Fatty Acids Derivatives from the Seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). **Molecules**, v, 20, p, 8168-8180, 2015.

DOS SANTOS, G. S.; RANGEL, K. C.; TEIXEIRA, T. R.; GASPAR, L. R.; ABREU-FILHO, P. G.; PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P.; GALLON, M. E.; GOBBO-NETO, L.; CLEMENTINO, L. C.; GRAMINHA, M. A. S.; JORDÃO, L. G.; POHLIT, A. M.;

COLEPICOLO-NETO, P.; DEBONSI, H. M. GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. **Planta Med Int Open**, p. e122-e132, 2020.

DOS SANTOS, G. S.; TEIXEIRA, T. R.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M. Natural Products from the Poles: Structural Diversity and Biological Activities. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 31, p. 531-560, 2021.

DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M.; ANGUS, B. J., NOSTEN, F. PRINCE, R. N. Artemisinin combination therapy for vivax malaria. **Lancet Infect Dis.**, 2010, v. 10, p. 405-416.

DOWNS, C. A.; KRAMARSKY-WINTER, E.; SEGAL, R.; FAUTH, J.; KNUTSON, S.; BRONSTEIN, O.; CINER, F. R.; JEGER, R.; LICHTENFELD, Y.; WOODLEY, C. M.; PENNINGTON, P.; CADENAS, K.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 702, p. 265-288, 2016.

DUARTE, A. W. F.; PASSARINI, M. R. Z.; DELFORNO, T. P.; PELLIZZARI, F. M.; CIPRO, C. V. Z.; MONTONE, R. C.; PETRY, M. V.; PUTZKE, J.; ROSA, L. H.; SETTE, L. D. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environ Microbiol Rep.**, v. 8, p. 874-885, 2016.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infect Dis Clin N Am.**, v. 33, p. 119-134, 2019.

ERBERT, C.; LOPES, A. A.; YOKOYA, N. S.; FURTADO, N. A. J. C.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; LOPES, J. L. C.; DEBONSI, H. M. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. **Bot Mar.**, v. 55, p. 435-440, 2012.

EYMANN, C.; LASSEK, C.; WEGNER, U.; BERNHARDT, J.; FRITSCH, O. A.; FUCHS, S.; OTTO, A.; ALBRECHT, D.; SCHIEFELBEIN, U.; CERNAVA, T.; ASCHENBRENNER, I.; BERG, G.; GRUBE, M. RIEDEL, K. Symbiotic interplay of fungi, algae, and bacteria within the lung lichen *Lobaria pulmonaria* L. Hoffm. as assessed by state-of-the-art metaproteomics. **J Proteome Res.**, v. 16, p. 14, 2017.

FADINI, G. P.; MENEGAZZO, L.; SCATTOLINI, V.; GINTOLI, M.; ALBIERO, M.; AVOGARO, A. A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 26, p. 1-8, 2016.

FALKENBERG, M.; NAKANO, E.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; ZATELLI, G. A.; PHILIPPUS, A. C.; IMAMURA, K. B.; VELASQUEZ, A. M. A.; FREITAS, R. P.; TALLARICO, L. F.; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. S. Bioactive compounds against neglected diseases isolated from macroalgae: A review. **J Appl Phycol.**, v. 31, p. 797-823, 2019.

FELCZYKOWSKA, A.; BLOCH, S.K.; NEJMAN-FALENCZYK, B.; BARANSKA, S. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. **Acta Biochim Pol.**, v. 59, p. 501-505, 2012.

FERRANDIZ, M.L.; SANZ, M.J.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J.; DE ROSA, S. Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin. **Eur J Pharmacol.**, v. 253, p. 75-82, 1994.

FLEWELLING, A. J.; CURRIE, J.; GRAY, C. A.; JOHNSON, J. A. Endophytes from marine macroalgae: Promising sources of novel natural products. **Curr Sci.**, v. 109, p. 88-111, 2015.

FLOROS, D. J.; JENSEN, P. R.; DORRESTEIN, P. C.; KOYAMA, N.; DIEGO, S.; JOLLA, L.; DIEGO, S.; JOLLA, L.; SPECTROMETRY, C. M.; DIEGO, S.; JOLLA, L. Mass spectrometry based molecular 3D-cartography of plant metabolites. **Metabolomics**, v. 12, p. 145, 2017.

FORSYTH, C. Repairing the antibiotic pipeline: Can the gain act do it? **Techonol Arts**, v. 9, p. 1-18, 2013.

FREMLIN, L. J.; PIGGOTT, A. M.; LACEY, E.; CAPON, R. J. Cottoquinazoline A and Cotteslosins A and B, Metabolites from an Australian Marine-Derived Strain of *Aspergillus versicolor*. **J Nat Prod.**, v. 72, p. 666-670, 2009.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Stud Mycol.**, v. 49, p. 201-41, 2004.

FUJII, M.T.; YOKOYA, N. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; COLEPICOLO, P. **Macroalgas Marinhas da Antártica**, Ed. Cubo, 2014, 96p.

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

FURBINO, L. E.; PELLIZZARI, F. M.; NETO, P. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biol.**, v. 41, p. 527-535, 2018.

GAMBATO G.; BARONI, E.G.; GARCIA, C.S.C.; FRASSINI R.; FROZZA, C.O.S.; MOURA, S.; PEREIRA, C.M.P.; FUJII, M.T.; COLEPICOLO, P.; LAMBERT, A.P.F.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis-mediated cell death in tumor cells. **Adv Biol Chem.**, v. 4, p. 98-108, 2014.

GAO, J.; RADWAN, M. M.; LEÓN, F.; WANG, X.; JACOB M. R.; TEKWANI, B. L. Antimicrobial and antiprotozoal activities of secondary metabolites from the fungus *Eurotium repens*. **Med Chem Res.**, 21:3080-3086, 2012.

GAO, S. S.; LI, X. M.; LI, C. S. *et al.* Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 21, p. 2894-2897, 2011.

GAO, Y-L.; WANG, Y-J.; CHUNG, H-H.; CHEN, K-C.; SHEN, T-L.; HSU, C-C. Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, v. 34, p. e8549, 2020.

GARCÍA-ESTRADA, C.; MARTIN, J. F.; CUETO, L.; BARREIRO, C. Omics Approaches Applied to *Penicillium chrysogenum* and Penicillin Production: Revealing the Secrets of Improved Productivity. **Genes**, v. 11, p. 712-738, 2020.

GASPAR, L. R.; KAWAKAMI, C. M.; BENEVENUTO, C. G. Overview on the Current Status of Available Test Methods and Additional Promising Methods for Assessing UV-Induced Effects. *In*: ESKES C, VAN VLIET E, MAIBACH H (eds.). **Alternatives for Dermal Toxicity Testing**, Switzerland: Springer International Publishing AG. p. 463-476,m2017

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV filters combinations and vitamins A, C and E. **Int J Pharm.**, v. 343, p. 181-189, 2007.

GASPAR, L. R.; THARMANN, J. MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; LIEBSCH, M. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicol in Vitro**, v. 27, p. 418-425, 2013.

GERHARDS, N.; NEUBAUER, L.; TUDZYNSKY, P.; LI, S-M. Biosynthetic Pathways of Ergot Alkaloids. **Toxins**, v. 6, p. 3281-3295, 2014.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 800-806.

GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chem Biol.**, v. 19, p. 85-98, 2012.

GHAREEB, M. A.; TAMMAM, M. A.; EL-DEMERDASH, A.; ATANASOV, A. G. Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. **Curr Res Biotechnol.**, v. 2, p. 88-102, 2020.

GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N.; PUPO, D.; ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME J.**, v. 7, p. 1434-1451, 2013.

GODINHO, V. M.; GONÇALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; KROON, E. G.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O.; ALI, A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H.

Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, p. 585-596, 2015.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **J R Soc Interface**, v. 11, p. 1-13, 2018.

GOMES, E. C. Q.; GODINHO, V. M.; SILVA, D. A. S.; DE PAULA, M. T. R.; VITORELI, G. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, F. S.; CARVALHO, C. R.; FERREIRA, M. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, p. 381-393, 2018.

GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, A. J.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biol.**, v. 38, p. 1143-1152, 2015.

GRIJSEELS, S.; NIELSEN, J. C.; NIELSEN, J.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; FRANDBSEN, R. J. N.; WORKMAN, M. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. **Fungal Biol Biotechnol.**, v. 4, p. 1-12, 2017.

GUITIÉRREZ, M.; SUYAMA, T. L.; ENGENE, N.; WINGERD, J. S.; MATAINAHO, T.; GERWICK, W. Apratoxin D, a potent cytotoxic cyclodepsipeptide from papua new guinea collections of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 1099-1103, 2008.

HA, T. M.; KIM, D. C.; SOHN, J. H.; YIM, J. H.; OH, H. Anti-inflammatory and protein tyrosine phosphatase 1b inhibitory metabolites from the antarctic marine-derived fungal strain *Penicillium glabrum* sf-7123. **Mar Drugs**, v. 18, p. 247-261, 2020.

HADER, D. P. Effects of solar UV-B radiation on aquatic ecosystems. **Adv Space Res.**, v. 26, p. 2029-2040, 2000.

HÄGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **J Intern Med.**, v. 268, p. 25-34, 2010.

HAI, Y.; CAI, Z-M.; LI, P-J.; WEI, M.Y.; WANG, C-Y.; GU, Y-C.; SHAO, C-L. Trends of antimalarial marine natural products: progresses, challenges and opportunities. **Nat Prod Rep.**, 2022.

HARMSE R, WONG HN, SMIT FJ, MULLER J, HEMPHILL A, N'DA DD, N'DA, D. D.; HAYNES, R. K. Activities of 11-azaartemisinin and *N*-sulfonyl derivatives against *Neospora caninum* and comparative cytotoxicities. **Chem Med Chem.**, v. 12, p. 2094-2098, 2017.

HARTMANN, A. C.; PETRAS, D.; QUINN, R. A.; PROTSYUK, I.; ARCHER, F. I.; RANSOME, E.; WILLIAMS, G. J.; BAILEY, B. A.; VERMEIJ, M. J. A.; ALEXANDROV,

T.; DORRESTEIN, P. C.; ROHWER, F. L. Meta-mass shift chemical profiling of metabolomes from coral reefs. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 114, p. 11685-11690, 2017.

HOM, E. F. Y.; MURRAY, A. W. Niche engineering demonstrates a latent capacity for fungal-algal mutualism. **Science**, v. 345, p. 5, 2014.

HOU, X. M.; LI, Y. Y.; SHI, Y. W.; FANG, Y. W.; CHAO, R.; GU, Y. C.; WANG, C. Y.; SHAO, C. L. Integrating Molecular Networking and <sup>1</sup>H NMR To Target the Isolation of Chrysogeamides from a Library of Marine-Derived *Penicillium* Fungi. **J Org Chem.**, v. 84, p. 1228-1237, 2019.

HOU, Z-M.; YU, S-Q.; TAO, M.; XIA, C-B.; XIA, Y-L.; WU, X-F.; DONG, C-Z. New Purinyl-Steroid and Other Constituents from the Marine Fungus *Penicillium brefeldianum* ABC190807: Larvicidal Activities against *Aedes aegypti*. **J Chem.**, v. 2021, p. 1-6, 2021.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. **IMA Fungus**, v. 2, 87-95, 2011.

IGNASIAK, K.; MAXWELL A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Res. Notes.**, v. 10, p. 428, 2017.

ISHIKAWA, N.; TANAKA, H.; KOYAMA, F.; NOGUCHI, H.; WANG, C. C.; HOTTA, K.; WATANABE, K. Non-heme dioxygenase catalyzes atypical oxidations of 6,7-bicyclic systems to form the 6,6-quinolone core of viridicatin-type fungal alkaloids. **Angew Chem., Int Ed Engl.**, v. 53, p. 12880, 2014.

JACVAM - Japanese Center for the Validation of Alternative Methods. Reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals (2013) Disponível em: [http:// www. jacvam. jp/ files/ news/ ROS\\_ proto col\\_ v3.1\\_ 130920\\_ clean. pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_proto_col_v3.1_130920_clean.pdf). Acessado em: 15 de fevereiro de 2022.

JESUS, A.; SOUSA, E.; CRUZ, M. T.; CIDADE, H.; LOBO, J. M. S.; ALMEIDA, I. F. UV Filters: Challenges and Prospects. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 263, 2022.

JIANG, L.; LI, T.; JENKINS, J.; HU, Y.; BRUECK, C. L.; PEI, H.; BETENBAUGH, M.J. Evidence for a mutualistic relationship between the cyanobacteria *Nostoc* and fungi *Aspergilli* in different environments. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 104, p. 6413-6426, 2020.

JIMÉNEZ, C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. **ACS Med Chem Lett.**, v. 9, p. 959-961, 2018.

JOHANSEN, J. R.; STRUNECKÝ, O.; BOHUNICKÁ, M; ČAPKOVÁ, K. Č.; RAABOVÁ, L.; DVOŘÁK, P.; KOMÁREK, J. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriophycidae, Cyanobacteria). **J Czech Geol Soc.**, v. 40, 2017.



JONES, E.B.G.; PANG, K. 2012. **Marine Fungi: and Fungal-like Organisms**. Ed. Walter de Gruyter, 2012, 532p.

JUSSILA, A.; HUOTARI-ORAVA, R.; YLIANTTILA, L.; PARTONEN, T.; SNELLMAN, E. Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of beta-endorphin in human skin *in vivo*. **J Photochem Photobiol B**, v. 155, v. 104-108, 2016.

KALININA, S. A.; KALININ, D. V.; HOVELMANN, Y.; DANILIUC, C. G.; MUCK-LICHTENFELD, C.; CRAMER, B.; HUMPF, H-U. Auranthine, a Benzodiazepinone from *Penicillium aurantiogriseum*: Refined Structure, Absolute Configuration, and Cytotoxicity. **J Nat Prod.**, v. 81, p. 2177-2186, 2018.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J.; DENNERY, P. A.; FORMAN, H. J.; GRISHAM, M. B.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic Biol Med.**, v. 52, p. 1-6, 2012.

KANDAROVÁ, H.; LIEBSCH, M. The EpiDerm™ phototoxicity test (EpiDerm™ H3d-PT). **Altern Dermal Toxic Test.**, p. 483-506, 2018.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDO VÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁROVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicol In Vitr.**, v. 21, p. 1298-1303, 2007.

KELLER, L.; CANUTO, K. M.; LIU, C.; SUZUKI, B. M.; ALMALITI, J.; SIKANDAR, A.; NAMAN, B. C.; GLUKHOV, E.; LUO, D.; DUGGAN, B. M.; LUESCH, H.; KOEHNKE, J.; O'DONOGHUE, A. J.; GERWICK, W. H. Tutuilamides A – C: Vinyl-Chloride-Containing Cyclodepsipeptides from Marine Cyanobacteria with Potent Elastase Inhibitory Properties'. **ACS Chem Biol.**, v. 15, p. 751-757, 2020.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatol Clin.**, v. 33, p. 579-593, 2015.

KHALIFA, S. A. M.; SHEDID, E. S.; SAIED, E. M.; JASSBI, A. R.; JAMEBOZORGI, F. H.; RATEB, M. E.; DU, M.; ABDEL-DAIM, M. M.; KAI, G-Y.; AL-HAMMADY, M. A. M. XIAO, J.; GUO, Z.; EL-SEEDI, H. R. Cyanobacteria—From the Oceans to the Potential Biotechnological and Biomedical Applications. **Mar Drugs**, v. 19, p. 241, 2021.

KHAN, I.; ZHANG, H.; LIU, W.; ZHANG, L.; PENG, F.; ZHANG, Q.; ZHANG, G.; ZHANG, W.; ZHANG, C. Identification and bioactivity evaluation of secondary metabolites from Antarctic-derived *Penicillium chrysogenum* CCTCC M 2020019. **RSC Adv.**, v. 10, p. 20738-20744, 2020.

KISHIMOTO, S.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; HIRAYAMA, Y.; CHAMPAGNE, P. A.; HOUK, K. N.; TANG, Y.; WATANABE, K. Enzymatic one-step ring contraction for quinolone biosynthesis. **Nat Commun.**, v. 9, 2826, 2018.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nat Protoc.**, v. 5, p. 479-490, 2010.

KLEIGREWE, K.; GERWICK, L.; SHERMAN, D. H.; GERWICK, W. H. Unique marine derived cyanobacterial biosynthetic genes for chemical diversity. **Nat Prod Rep.**, v. 33, p. 348-364, 2016.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CRETTON, S.; ALLARD, P. M.; GENTA-JOUVE, G.; PASSOS, C. S.; SALTON, J.; BERTELLI, P.; PUPIER, M.; JEANNERAT, D.; HEYDEN, Y. VANDER; GASPER, A. L.; WOLFENDER, J. L.; CHRISTEN, P.; HENRIQUES, A. T. Targeted Isolation of Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea sessilis*. **J Nat Prod.**, v. 80, p. 3032, 2017.

KOGEJ, T.; GOSTINCAR, C.; VOLKMANN, M.; GORBUSHINA, A. A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines in extremophilic fungi-novel complementary osmolytes. **Environ Chem.**, v. 3, p. 105-110, 2006.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Marine Ascomycetes from algae and animal hosts. **Bot Mar.**, v. 34, p. 1-35, 2003.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, p. 159- 175, 2013.

KOSSUGA, M. H.; NASCIMENTO, A. M.; REIMAO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; TANIWAKI, N. N.; VELOSO, K. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 334-339, 2008.

KOZLOVSKY, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Biologically active metabolites of *Penicillium* fungi. **J Org Biomol Chem.**, v. 1, p. 11-21, 2013.

KUMAR, A.; ASTHANA, M.; GUPTA, A.; NIGAM, D.; MAHAJAN, S. Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*. In: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, *Penicillium* System Properties and Applications**. Elsevier, cap. 3, p. 47-68, 2018.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J.**, v. 15, p. 71, 2015.

KUSANO, M.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Nematicidal Alkaloids and Related Compounds Produced by the Fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 64, p. 2559-2568, 2000.

LEÃO, P.N.; ENGENE, N.; ANTUNES, A.; GERWICK, W.H.; VASCONCELOS, V. The chemical ecology of cyanobacteria. **Nat Prod Rep.**, v. 29, p. 372-391, 2012.

LEÃO, T.; WANG, M.; MOSS, N.; DA SILVA, R.; SANDERS, J.; NURK, S.; GUREVICH, A.; HUMPHREY, G.; REHER, R.; ZHU, Q.; BELDA-FERRE, P.;

GLUKHOV, E.; WHITNER, S.; ALEXANDER, K. L.; REX, R.; PEVZNER, P.; DORRESTEIN, P. C.; KNIGHT, R.; BANDEIRA, N.; GERWICK, W. H.; GERWICK, L. A Multi-Omics Characterization of the Natural Product Potential of Tropical Filamentous Marine Cyanobacteria. **Mar Drugs**, v. 19, p, 20, 2021.

LEESOMBUN A, BOONMASAWAI S, NISHIKAWA Y. Effects of Thai piperaceae plant extracts on *Neospora caninum* infection. **Parasitol Int.**, v. 66, p. 219-226, 2017.

LENZ, A. R.; BALBINOT, E.; DE OLIVEIRA, N. S.; DE ABREU, F. P.; CASA, P. L.; CAMASSOLA, M.; PEREZ-RUEDA, E.; SILVA, S. A.; DILLON, A. J. P. Analysis of carbohydrate-active enzymes and sugar transporters in *Penicillium echinulatum*: A genome-wide comparative study of the fungal lignocellulolytic system. **Gene**, v. 822, p. 146345, 2022.

LESSER, M. P.; MAZEL, C. H.; GORBUNOV, M. Y.; FALKOWSKI, P. G. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science*, v. 305, p. 997-1000, 2004.

LI, X. D.; MIAO, F. P.; LIANG, X. R.; JI, N. Y. Meroterpenes from an algicolous strain of *Penicillium echinulatum*. **Magn Reson Chem.**, v. 52, p. 247-250, 2014a.

LI, J.; WANG, J.; JIANG, C-S.; LI, G.; GUO, Y-W. (+)-Cyclophenol, a new naturally occurring 7-membered 2,5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum* endogenous with the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **J Asian Nat Prod Res.**, v. 16, 542-548, 2014b.

LI, W-T.; LUO, D.; HUANG, J-N.; WANG, L-L.; ZHANG, F-G.; XI, T.; LIAO, J-M.; LU, Y-Y. Antibacterial constituents from Antarctic fungus, *Aspergillus sydowii* SP-1. **Nat Prod Res.**; v. 32, p. 662-667, 2018.

LI, X.; LI, X. M.; ZHANG, P. *et al.* A new phenolic enamide and a new meroterpenoid from marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium oxalicum* EN-290. **J Asian Nat Prod Res.**, v. 17, p. 1204-1212, 2015.

LI, Y.; LI, X.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. New radical scavenging and ultraviolet-A protecting prenylated dioxopiperazine alkaloid related to isoechinulin A from a marine isolate of the fungus *Aspergillus*. **J Antibiot.**, v. 57, p. 337-340, 2004a.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S. K.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. W. Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. **Chem Pharmaceut Bull.**, v. 52, p. 375-376, 2004b.

LI, Y.; SUN, B.; LIU, S.; JIANG, L.; LIU, X.; ZHANG, H.; CHE, Y. Bioactive asteric acid derivatives from the Antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 1643-1646, 2008.

LIANG, P.; ZHANG, Y. Y.; YANG, P.; GROND, S.; ZHANG, Y.; QIAN, Z. J. Viridicatol and viridicatin isolated from a shark-gill-derived fungus *Penicillium polonicum* AP2T1 as MMP-2 and MMP-9 inhibitors in HT1080 cells by MAPKs signaling pathway and docking studies. **Med Chem Res.**, v. 28, p. 1039-1048, 2019.

LIAW, P.C.; ITO, T.; IBA, T.; THACHIL, J.; ZEERLEDER, S. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. **Blood Rev.** v. 30, p. 257-260, 2015

LIDANI, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S.; BELTRAME, M. H.; MESSIAS-REASON, I. J.; SANDRI, T. L. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Front Publ Health**, v. 7, p. 1-13, 2019.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. INVITTOX Protocol no. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database, 1998.

LIN, A.; WU, G.; GU, Q.; ZHU, T.; LI, D. New eremophilane-type sesquiterpenes from an Antarctic deep-sea derived fungus *Penicillium* sp. PR19 N-1. **Arch Pharm Res.**, v. 37, p. 839-844, 2014.

LIN, Z.; TORRES, J. P.; AMMON, M. A.; MARETT, L.; TEICHERT, R. W.; REILLY, C. A.; KWAN, J. C.; HUGHEN, R. W.; FLORES, M.; TIANERO, M. D.; *et al.* A bacterial source for mollusk pyrone polyketides. **Chem Biol.**, v. 20, p. 73-81, 2013.

LININGTON, R. G.; CLARK, B. R.; TRIMBLE, E. E.; ALMANZA, A.; UREÑA, L-D.; KYLE, D. E.; GERWICK, W. H. Antimalarial Peptides from Marine Cyanobacteria: Isolation and Structural Elucidation of Gallinamide A. **J Nat Prod.**, v. 72, p. 14-17, 2009.

LININGTON, R.G.; EDWARDS, D.J.; SHUMAN, C.F.; MCPHAIL, K.L.; MATAINAHO, T.; GERWICK, W.H. Symplocamide A, a potent cytotoxin and chymotrypsin inhibitor from the marine cyanobacterium *Symploca* sp. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 22-27, 2008.

LIONAKIS, M. S. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, p. 521-527, 2011.

LIU, C. C.; ZHANG, Z. Z.; FENG, Y. Y.; GU, Q. Q.; LI, D. H.; ZHU, T. J. Secondary metabolites from Antarctic marine-derived fungus HDN153086. **Nat Prod Res.**, v. 33, p. 414-419, 2019.

LIU, H.; LI, X. M.; LIU, Y. *et al.* Chermesins A–D: meroterpenoids with a drimane-type spirosesquiterpene skeleton from the marine algal-derived endophytic fungus *Penicillium chermesinum* EN-480. **J Nat Prod.**; v. 79, p. 806-811, 2015.

LONDERO, V. S.; COSTA-SILVA, T. A. GOMES, K. S. *et al.* Acetylenic fatty acids from *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: Effect of octadic-9-ynoic acid in plasma membrane electric potential. **Bioor Chem.**, v. 78, p. 307-311, 2018.

LOQUE, C. P.; MEDEIROS, A. O.; PELIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biol.**, v. 33, p. 641-648, 2010.

LYU, C.; CHEN, T.; QIANG, B.; LIU, N.; WANG, H.; ZHANG, L.; LIU, Z. CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean. **Nucleic Acid Res.**, v. 49, p. D509-D515, 2021.

MA, M.; GE, H.; YI, W. *et al.* Bioactive drimane sesquiterpenoids and isocoumarins from the marine-derived fungus *Penicillium minioluteum* ZZ1657. **Tetrahedron Lett.**, v. 61, p. 151504, 2020.

MACHADO, F. L. DA S.; PACIENZA-LIMA, W.; ROSSI-BERGMANN, B.; SOUZA GESTINARI, L. M.; FUJII, M. T.; PAULA, J. C.; COSTA, S. S.; LOPES, N. P.; KAISER, C. R.; SOARES, A. R. Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Med.**, v. 77, p. 733-735, 2011.

MACIEL, O. M. C.; TAVARES, R. S. N.; CALUZ, D. R. E.; GASPAS, L. R.; DEBONSI, H. M. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **J Photochem Photobiol B**, v. 178, p. 316-322, 2018.

MACINTYRE, F.; ADOKE, Y.; TIONO, A. B. *et al.* A randomised, doubleblind clinical phase II trial of the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose combination treatment with artefenomel and piperazine in adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **BMC Med.**, v. 15, p. 181, 2017.

MAGUIRE, R.; DUGGAN, O.; KAVANAGH, K. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. **Cell Biol Toxicol.**, v. 32, p. 209-216, 2016.

MANCIBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens: A Review of Health Benefits, Regulations, and Controversies. **Dermatol Clin.**, v. 32, p. 427-38, 2014.

MANILAL, A.; SUJITH, S.; SABARATHNAM, B.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. SHAKIR, C.; LIPTON, A. P.; Biological activity of the red alga *Laurencia brandenii*. **Acta Bot Croat.**, v. 70, p. 81-90, 2011.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; CERQUEIRACOUTINHO, C.; VERMELHO, A. B.; SILVA, R. S.; PRESGRAVE, O. A. F. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 26, p. 251-258, 2016.

MARIONNET, C.; PIERRARD, C.; GOLEBIEWSKI, C.; BERNERD, F. Diversity of Biological Effects Induced by Longwave UVA Rays (UVA1) in Reconstructed Skin. **PLoS ONE**, v. 9, p. e105263, 2014.

MÁRQUEZ, B.; PINARD-VERDIER, P.; HAMEL, E.; GERWICK, W. H. Curacin D, a mitomycin agent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Phytochem.** v. 49, p. 2387-89, 1998.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour Technol.**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ALVES, C. M.; AZZOLINI, A. E.; POLIZELLO, A. C.; CARVALHO, I. F.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Fcγ and complement receptors: expression, role and cooperation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 11, p. 240-248, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 30, n. 2, p. 234, 1997.

MATSUI, M. S. The Role of Topical Antioxidants in Photoprotection. *In*: WANG S, LIM H (eds.). **Principles and Practice of Photoprotection**. New York: Springer. cap. 20, p. 361-375, 2016.

McCALL L. I.; MORTON J. T.; BERNATCHEZ J. A.; DE SIQUEIRA-NETO J. L.; KNIGHT R.; DORRESTEIN P. C.; *et al.* Mass Spectrometry-Based Chemical Cartography of a Cardiac Parasitic Infection. **Anal Chem.**, v. 89, p. 10414–10421, 2017.

McCALL, L-I.; McKERROW, J. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. **Trends Parasitol.**, v. 30, p. 342-329.

McCARTHY, J. S.; BAKER, M.; O'ROURKE, P.; MARQUART, L.; GRIFFIN, P.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; MOHRLE, J. J. Efficacy of OZ439 (artefenomel) against early *Plasmodium falciparum* blood-stage malaria infection in healthy volunteers. **J Antimicrob Chemother.**, v. 71, p. 2620-2627, 2016.

MELO, I. S.; SANTOS, S. N.; ROSA, L. H.; PARMA, M. M.; SILVA, L. J.; QUEIROZ, S. C. N.; PELLIZARI, V. H. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, p. 15–23, 2014.

MENAA, F.; WIJESINGHE, P. A. U. I.; THIRIPURANATHAR, G.; UZAIR, B.; IQBAL, H.; KHAN, B. A.; MENAA, B. Ecological and industrial implications of dynamic seaweed associated microbiota interactions. **Mar Drugs**, v. 18, p. 641, 2020.

MENG, L. H.; LI, X. M.; LIU, Y. *et al.* Antimicrobial alkaloids produced by the mangrove endophyte *Penicillium brocae* MA-231 using the OSMAC approach. **RSC Adv.**, v. 7, p. 55026-55033, 2017.

MENG, L. H.; LI, X. M.; LIU, Y. *et al.* Penicibilaenes A and B, sesquiterpenes with a tricyclo [6.3. 1.01, 5] dodecane skeleton from the marine isolate of *Penicillium bilaiae* MA-267. **Org Lett.**, v. 16, p. 6052-6055, 2014.

MENG, L. H.; ZHANG, P. LI, X. M. *et al.* Penicibrocazines A–E, five new sulfide diketopiperazines from the marine-derived endophytic fungus *Penicillium brocae*. **Mar Drugs**, v. 13, p. 276-287, 2015.

METHVEN, L.; TSOUKKA, M.; ORUNA-CONCHA, M. J.; PARKER, J. K.; MOTTRAM, D. S. Influence of sulfur amino acids on the volatile and nonvolatile components of cooked salmon (*Salmo salar*). **J Agric Food Chem.**, v. 55, p. 1427-1436, 2007.

MINICANTE, S. A.; CARLIN, S.; STOCCO, M.; SFRISO, A.; CAPELLI, G.; MONTARSI, F. Preliminary Results on The Efficacy of Macroalgal Extracts Against Larvae of *Aedes Albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 33, p. 352-354, 2017.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; NIKZAD, S.; KADIR, H. A.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Potential antiviral agents from marine fungi: An overview. **Mar Drugs**, v. 13, p. 4520-4538, 2015.

MOHAMED, A. Z.; MOHAMED, H.; ALAMRI, S. A. Growth inhibition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and degradation of its microcystin toxins by the fungus *Trichoderma citrinoviride*. **Toxicon.**, v. 86, p. 51-8, 2014.

MONDAL, A.; BOSE, S.; BANERJEE, S.; PATRA, J. K.; MALIK, J.; MANDAL, S. K.; KILPATRICK, K. L.; DAS, G.; KERRY, R. G.; FIMOGNARI, C.; BISHAYEE, S. Marine Cyanobacteria and Microalgae Metabolites—A Rich Source of Potential Anticancer Drugs. **Mar Drugs**, v. 18, p. 476, 2020.

MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Leishmaniasis. **Clinical Med.**, v. 11, p. 492-497, 2011.

MOSS, N. A.; SEILER, G.; LEÃO, T. F.; CASTRO-FALCON, G.; GERWICK, L., HUGHES, C. C.; GERWICK, W. H. Nature's Combinatorial Biosynthesis Produces Vatiamides A-F. **Communication**, v. 58, p. 9027-9031, 2019.

MUÑOZ, P. A.; FLORES, P. A.; BOEHMWALD, F.; BLAMEY, J. M. Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. **Antarct Sci.**, v. 23, p. 549-555, 2011.

MUTALIPASSI, M.; RICCIO, G.; MAZZELLA, V.; GALASSO, C.; SOMMA, E.; CHIARORE, A.; DE PASCALE, D.; PUPO, V. Symbioses of Cyanobacteria in Marine Environments: Ecological Insights and Biotechnological Perspectives. **Mar Drugs**, v. 19, p. 227, 2021.

NAJAFI, A.; MORADINASAB, M.; NABIPOUR, I. First record of microbiomes of sponges collected from the Persian Gulf, using tag pyrosequencing. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 1500, 2018.

NAMAN, C. B.; RATTAN, R.; NIKOULINA, S. E.; LEE, J.; MILLER, B. W.; MOSS, N. A.; ARMSTRONG, L.; BOUDREAU, P. D.; DEBONSI, H. M.; VALERIOTE, F. A.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H.; Integrating Molecular Networking and Biological Assays To Target the Isolation of a Cytotoxic Cyclic Octapeptide, Samoamide A, from an American Samoan Marine Cyanobacterium. **J Nat Prod.**, v. 80, 625-633, 2017.

NARAIAN, R. GAUTAM, R. L. *Penicillium* Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. *In*: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **New and**

**Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, *Penicillium* System Properties and Applications.** Elsevier, cap. 6, p. 121-136, 2018.  
 NAYLOR, M. The life history of *Adenocystis utricularis* (Bory) H. et H. **Trans Royal Soc.**, v. 83, p. 295-301, 1954.

NEVILLE, A. J.; ZACH, S. J.; WANG, X.; LARSON, J. J.; JUDGE, A. K.; DAVIS, L. A.; VANNERSTROM, J. L.; DAVIS, P. H. Clinically available medicines demonstrating antitoxoplasma activity. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 7161- 7169, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.**, v. 83, p 770-803, 2020.

NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; BEKHIT, A. A.; BEKHIT, A. E-D. Antibacterial products of marine organisms. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 99, p. 4145-4173, 2015.

NOTHIAS, L. F.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; DA SILVA, R.; WANG, M.; PROTSYUK, I.; ZHANG, Z.; SARVEPALLI, A.; LEYSSEN, P.; TOUBOUL, D.; COSTA, J.; PAOLINI, J.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; DORRESTEIN, P. C.; Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **J Nat Prod.**, v. 81, p. 758-767, 2018.

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A., ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am College Cardiol.**, v. 62:767-776, 2013.

NWEZE, J. A.; MBAOJI, F. N.; LI, Y-M.; YANG, L-Y., HUANG, S-S.; CHIGOS, V. N.; EZE, E. A.; PAN, L-X.; ZHANG, T.; YANG, D-F. Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis parasites: a review of recent articles. **Infect Dis Poverty**, v. 10, p. 9, 2021.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Teste n° 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, 18 de junho de 2019a.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Teste n° 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for photoreactivity, 18 de junho de 2019b.

OGAKI, M. B.; DE PAULA, M. T.; RUAS, D.; PELIZZARI, F. M.; GARCÍA-LAVINA, C. X. G.; ROSA, L. H. Marine Fungi Associated with Antarctic Macroalgae. *In: The Ecological Role of Microorganisms in the Antarctic Environment.* Switzerland: Springer Nature, cap. 11, p. 239-255, 2019.

OKSANEN, I Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 73, p. 723-734, 2006.

OLIVEIRA, *et al.* Diversity of Antarctic Seaweeds. *In: GOMEZ, I.; HUOVINEN, P. (eds.). Antarctic Seaweeds: Diversity, Adaptation and Ecosystem Services.* Switzerland: Springer Nature, 2020. cap. 2, p. 23-39.



OLIVEIRA, M. J., CUCUNUBÁ, Z. M., VALENCIA-HERNÁNDEZ, *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLoS One**, p, 1-13, 2017.

OLIVON, F.; ALLARD, P. M.; KOVAL, A.; RIGHI, D.; GENTA-JOUVE, G.; NEYTS, J.; APEL, C.; PANNECOUQUE, C.; NOTHIAS, L. F.; CACHET, X.; MARCOURT, L.; ROUSSI, F.; KATANAEV, V. L.; TOUBOUL, D.; WOLFENDER, J. L.; LITAUDON, M. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks. **ACS Chem Biol.**, v. 12, p. 2644-2651.

OLSEN, E. K.; DE CERF, C. K.; DZIWORNU, G. A.; PUCCINELLI, E.; ANSORGE, I.; SAMAAI, T.; DINGLE, L. M. K.; EDKINS, A. L.; SUNASSEE, S. N. Cytotoxic activity of marine sponge extracts from the sub-Antarctic Islands and the Southern Ocean. **S Afr J Sci.**, v. 112, p. 1-5, 2016.

OLSON, N. D.; AINSWORTH, T. D.; GATES, R. D.; TAKABAYASHI, M. Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian Montipora corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. **J Exp Mar Biol Ecol.**, v. 371, p. 140-146, 2007.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2022) Leishmaniasis. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1);. Acessado em: 03 de março de 2022.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2022b) Malaria. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1);. Acessado em: 03 de março de 2022b.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2022c) Dengue and severe dengue. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_1);. Acessado em: 03 de março de 2022c.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2022d) Chagas Disease. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1);. Acessado em: 03 de março de 2022d.

ONOUE, S.; SUZUKI, G.; KATO, M.; HIROTA, M.; NISHIDA, H.; KITAGAKI, M.; KOUZUKI, H.; YAMADA, S. Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. **Toxicol In Vitro.**, v. 27, p. 2316-24, 2013.

OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporinelike amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? **FEMS Microbiol Lett.**, v. 269, p. 1-10, 2007.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pac J Trop Med.**, v. 9, p. 901-909, 2016.

OSWALD, F.; SCHMITT, F.; LEUTENEGGER, A.; IVANCHENKO, S.; D'ANGELO, C.; SALIH, A.; MASLAKOVA, S.; BULINA, M.; SCHIRMBECK, R.; NIENHAUS, G.U.; *et*

al. Contributions of host and symbiont pigments to the coloration of reef corals. **FEBS J.**, v. 274, p. 1102-1122, 2007.

PARTENSKY, F.; HESS, W. R.; GARCZAREK, L. Marine Cyanobacteria. In: STAL, L.; CRETOIU, M. S. **The Marine Microbiome**. Switzerland: Springer Nature, cap. 3, p. 103-157, 2022.

PATEL, G.; PATIL, M.D.; SONI, S.; KHODRAGADE, T.P.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum* – A comparison of two methods of optimization. **Biotechnol Rep.**, v. 11, p. 77-85, 2016.

PATEL, H. M.; RASTOGI, R. P.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. **Algal Res.**, v. 32, p. 372-383, 2018.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a espectroscopia**. 4 ed., 2010, 716 p.

PAWLOWSKI, S.; PETERSEN-THIERY, M. Sustainable sunscreens: A challenge between performance, animal testing ban, and human and environmental safety. In: BARCELO, D.; KOSTIANOY, A. G. **Handbook of Environmental Chemistry**. Heidelberg: Springer, v. 94, p. 185-207, 2020.

PEREIRA LM, MOTA CM, BARONI L, BRONZON DA COSTA CM, BROCHI JCV, WAINWRIGHT M, MINEO, T. W. P.; BRAGA, G. U. L.; YATSUDA, A. P. Inhibitory action of phenothiazinium dyes against *Neospora caninum*. **Sci Rep.**, v. 10, p. 7483, 2020.

PEREIRA, L. M.; DE LUCA, G.; ABICHABKI, N. L. M.; BROCHI, J. C. V.; BARONI, L.; ABREU-FILHO, P. G.; YATSUDA, A. P. Atovaquone, chloroquine, primaquine, quinine and tetracycline: antiproliferative effects of relevant antimalarials on *Neospora caninum*. **Braz J Vet Parasitol.**, v. 30, p. e022120, 2021.

PEREIRA, L. M.; DE LUCA, G.; ABICHABKI, N. L. M.; DACOSTA, C. M. B.; YATSUDA, A. P. Synergic *in vitro* combinations of artemisinin, pyrimethamine and methylene blue against *Neospora caninum*. **Vet Parasitol.**, v. 249, p. 92-97, 2018.

PEREIRA, L. M.; VIGATO-FERREIRA, I. C.; DE LUCA, G.; BRONZON DA COSTA, C. M.; YATSUDA, A. P. Evaluation of methylene blue, pyrimethamine and its combination on an *in vitro* *Neospora caninum* model. **Parasitology**. V. 144, p. 1-7, 2017.

PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P. Comparison of an ELISA assay for the detection of adhesive/invasive *Neospora caninum* tachyzoites. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 23, p. 36-43, 2014.

PHAM, H. T.; LEE, K. H.; JEONG, E.; WOO, S.; YU, J.; KIM, W-Y.; LIM, Y, W.; KIM, K. H.; KANG, K. B. Species Priorization Based on Spectral Dissimilarity: A Case Study of Polyporoid Fungal Species. **J Nat Prod.**, v. 84, p. 298-309, 2021.

PHILIPPUS, A. C.; ZATELLI, G. A.; WANKE, T.; GABRIELA DE BARROS, M. A.; KAMI, S. A.; LHULLIER, C.; ARMSTRONG, L.; SANDJO, L. P.; FALKENBERG, M. Molecular networking prospection and characterization of terpenoids and C15-acetogenins in Brazilian seaweed extracts. **RSC Adv.**, v. 8, p. 29654-29661, 2018.

PILON, A. C.; GRANDE, M. D.; SILVÉRIO, M. R. S.; SILVA, R. S.; ALBERNAZ, L. C.; VIEIRA, P. C.; LOPES, J. L. C.; ESPINDOLA, L. S.; LOPES, N. P. Combination of GC-MS Molecular Networking and Larvicidal Effect against *Aedes aegypti* for the Discovery of Bioactive Substances in Commercial Essential Oils. **Molecules**, v. 27, p. 1588, 2022.

PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARA, J. G.; MONTEIRO, A. F.; DA SILVA, R. R.; SPINDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes moleculares: Uma Análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Quim Nova**, v. 44, p. 1168-1179, 2021.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; MOLL H.; HENTSCHEL, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. **Mar Drugs**, v. 8, p. 373-380, 2010.

PINTO, M. C.; BARBIERI, K.; SILVA, M. C. E.; GRAMINHA, M. A. S.; CASANOVA, C.; ANDRADE, A. J.; EIRAS, A. E. Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the field. **J Med Entomol.**, v. 48, p. 39-44, 2011.

PONCE, N. M. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; FLORES, M. L.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr Res.**, v. 338, p. 153-165, 2003.

PONTIUS, A.; KRICK, A.; MESRY, R.; KEHRAUS, S.; FOEGEN, S. E.; MULLER, M.; KLIMO, K.; GERHAUSER, C.; KOING, G. M. Monodictyochromes A and B, dimeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 1793-1799, 2008.

PORTMANN, C.; BLOM, J. F.; GADEMANN, K.; JUTTNER, F. Aerucyclamides A and B: Isolation and Synthesis of Toxic Ribosomal Heterocyclic Peptides from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 1193-1196, 2008.

PRENCIPE, S.; SICILIANO, I.; GATTI, C.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L.; BOTTA, R.; SPADARO, D. Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. **Food Microbiol.**, v. 76, p. 396-404, 2018.

PUSHPAMALI, W. A.; DE ZOYSA, M.; KANG, H. S.; OH, C. H.; WHANG, I.; KIM, S. J.; LEE, J. Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 24, p. 294-307, 2008.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, L-F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 38, p. 143-155, 2017.

RANGEL, K. C., VILLELA, L. Z.; PEREIRA, K. C.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M.; GASPAR, L. R. Assessment of the photoprotective potential and toxicity of Antarctic red macroalgae extracts from *Curdiea racovitzae* and *Iridaea cordata* for cosmetic use. **Algal Res.**, v. 50, p. 101984-101997, 2020.

RANGEL, K. C.; DEBONSI, H. M.; CLEMENTINO, L. C.; GRAMINHA, M. A. S.; VILELA, L. Z.; COLEPICOLO, P.; GASPAR, L. R. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinaceae; Rhodophyta). **J Appl Phycol.**, v. 31, p. 825-834, 2019.

RASMUSSEN, C.; GRATZ, K.; LIEBEL, F.; SOUTHALL, M.; GARAY, M.; BHATTACHARYYA, S.; SIMON, N.; ZANDEN, M. V.; WINKLE, K. V.; PIRNSTILL, S.; COMER, A.; ALLEN-HOFFMANN, B. L. The StrataTest® human skin model, a consistent in vitro alternative for toxicological testing. **Toxicol In Vitro**, v. 24, p. 2021-2029, 2010.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet.**, 2010, v. 375, p. 1388-402, 2010.

RASSI, D. C.; VIEIRA, M. L. C.; FURTADO, R. G.; TURCO, F. P.; MELATO, L. H.; HOTTA, V. T.; GODOY, C.; NUNES, C. G. O.; RASSI JR, L.; RASSI, S. Dobutamine Stress Echocardiography Safety in Chagas Disease Patients. **Arq Bras Cardiol.**, v. 108, p. 122-128, 2017.

REN, C-G.; LIU, Z-Y.; WANG, X-L.; QIN, S. The seaweed holobiont: from microecology to biotechnological applications. **Microb Biotechnol.**, v. 15, p. PMC8913876, 2022.

RENUGADEVI, K.; NACHIYAR, V.; SOWMIYA, P.; SUNKAR, S. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. **Biocatal Agric Biotechnol.**, v. 16., p, 237-242, 2018.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTROM-BEZ, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **IJP: Drud and Drug Resis.**, v. 12, p, 7-17, 2020.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J General Micro.**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RITTER, C. E. T.; CAMASSOLA, M.; ZAMPIERI, D.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Cellulase and Xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged containing cellulose amended with sorbitol. **Enzyme Res.**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

ROSA, L. H. **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. 1. ed. Switzerland: Springer Nature, 2019. 352p.

ROUT, P. K.; RAO, Y. R.; SREE., A.; NAIK, S. N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (Linn.) Jack flowers. **Flavour Fragr J.**, v. 22, p. 352-357, 2007.

SANCHES, P. F.; PELLIZZARI, F. M.; HORTA, P. H. Multivariate analyses of Antarctic and sub-Antarctic seaweed distribution patterns: an evaluation of the role of the Antarctic Circumpolar Current. **J Sea Res.**, v. 110, p. 29-38, 2016.

SANCHEZ, L. M.; LOPEZ, D.; VESELY, B. A.; TOGNA, G. D.; GERWICK, W. H.; KYLE, D. E.; LININGTON, R. G. Almiramides A–C: Discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. **J Med Chem.**, v. 53, p. 4187-4197, 2010.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ R, FERRE I, RE M, VÁZQUEZ P, FERRER LM, BLANCO-MURCIA J, *et al.* Safety and efficacy of the bumped kinase inhibitor BKI-1553 in pregnant sheep experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.**, v. 8, p. 112-124, 2018a.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; VÁZQUEZ, P.; FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L. M. Treatment of toxoplasmosis and neosporosis in farm Ruminants: state of knowledge and future trends. **Curr Top Med Chem.**, v. 18, p. 1304-1323, 2018b.

SANTIAGO, I. F.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES-JÚNIOR, 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 angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, p. 95-103, 2012.

SANTOS, A. O.; BRITTA, E. A.; BIANCO, E. M.; UEDA- NAKAMURA, T.; FILHO, B. P.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Mar Drugs**, v. 9, p. 2369-2383, 2011.

SANTOS, A. O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Mar Drugs**, v. 8, p. 2733-2743, 2010.

SANTOS, C. A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 98, p. 5839-5846, 2014.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. **Parasitol Res.**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SARASAN, M.; PUTHUMANA, J.; JOB, N.; HAN, J.; LEE, J-S.; PHILIP, R. Marine Algicolous Endophytic Fungi - A Promising Drug Resource of the Era. **J Microbio Biotechnol.**, v. 27, p. 1039-1052, 2017.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (eds.). **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Dordrecht: Springer, 2009, p. 3-18.

SCHNEIDER, S. L.; LIM, H. W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. **J Am Acad Dermatol.**, v. 80, p. 266-271, 2019.

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMA, C. A.; COUGER, M. B.; PRADE, R.; SQUINA, F. M.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 1-26, 2016.

SENN, M.; GUNZENHAUSER, S.; BRUN, R.; SÉQUIN, U. Antiprotozoal polyacetylenes from the Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. **J Nat Prod.**, v. 70, p. 1565–1569, 2007.

SEO, H. S.; KIM, K. H.; KIM, D. Y.; PARK, B. K.; SHIN, N. S.; KIM, J. H.; YOUN, H. GC/MS analysis of high-performance liquid chromatography fractions from *Sophora flavescens* and *Torilis japonica* extracts and their *in vitro* anti-neosporal effects on *Neospora caninum*. **J Vet Sci.**, v. 14, p. 241-248, 2013.

Shaath, N. A. The Chemistry of Ultraviolet Filters. *In*: WANG S, LIM H (eds.). **Principles and Practice of Photoprotection**. New York: Springer. cap. 9, p. 217-238, 2016.

SHAH, M.; SUN, C.; SUN, Z.; ZHANG, G.; CHE, Q.; GU, Q.; ZHU, T.; LI D. Antibacterial polyketides from Antarctica sponge-derived fungus *Penicillium* sp. HDN151272. **Mar Drugs**, v. 18, p. 71-79, 2020.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. *In*: SILBER, J.; KRAMER, A.; LABES, A.; TASDEMIR, D. From Discovery to production: Biotechnology of Marine Fungi for the Production of New Antibiotics. **Mar Drugs**, v. 14, p. 1-20, 2016.

SILVA, E. M. **Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella***. 2016. 148 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SILVA, E.; DA GRAÇA, J. P.; PORTO, C.; MARTIN DO PRADO, R.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MEYER, M. C.; DE OLIVEIRA NUNES, E.; PILAU, E. J. Untargeted Metabolomics Analysis by UHPLC-MS/MS of Soybean Plant in a Compatible Response to *Phakopsora pachyrhizi* Infection. *Sci Rep.*, v. 11, 2021.

SILVA, R. L.; DEMARQUE, D. P.; DUSI, R. G.; SOUSA, J. P. B.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. Residual Larvicidal Activity of Quinones against *Aedes aegypti*. **Molecules**, v. 25, p. 3978, 2020.

SILVÉRIO, M. R. S.; ESPINDOLA, L. S.; LOPES, N. P.; VIEIRA, P. C. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25, p. 3484, 2020.

SIMÕES, J. C. O ambiente antártico: domínio de extremos. *In*: SIMÕES, J. C. *et al.* (eds.). **Antártica e as Mudanças Globais: um desafio para a humanidade**. São Paulo: Edgard Blucher, 2011, p. 15-27.

SIMÕES, J. C.; ARIGONY NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesq Antart Bras.**, v. 4, p. 191-197, 2004.

SINGH, J. S.; KUMAR, A.; RAI, A. N.; SINGH, D. P. Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 529, 2016.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac J Trop Med.**, v. 5, p. 485-497, 2012.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Front Immunol.**, v. 5, p. 296, 2014.

SINGH, R.P.; KUMARI, P.; REDDY, C.R.K. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 99, p. 1571-1586, 2015.

SMITH, C. K.; KAPLAN, M. J. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 27, p. 448-53, 2015.

SOARES, D. C.; CALEGARI-SILVA, T. C.; LOPES, U. G.; TEIXEIRA, V. L.; PALMER PAIXÃO, I. C. N.; CIRNESANTOS, C.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. Dolabelladienetriol, a compound from *Dictyota paffii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, p. 1-12, 2012.

SOBRINHO, J. L. S., FONTES, D. A. F., DE LYRA, M. A. M., *et al.* Chagas's disease: 100 years from its Discovery. **Rev Bras Ciencias Farm.**, p. 283-289, 2009.

SOHN, J.; LEE, Y-R.; LEE, D-S.; KIM, Y-C.; OH, H. PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *Penicillium* spp. and *Eurotium* sp. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 33, p. 1206-1211, 2013.

SONG, C.; YANG, J.; ZHANG, M.; DING, G.; JIA, C.; QIN, J.; GUO, L. Marine Natural Products: The Important Resource of Biological Insecticide. **Chem Biod.**, v. 18, p. e2001020, 2021.

SOUZA, C. R. M.; BEZERRA, W. P.; SOUTO, J. T. Marine Alkaloids with Anti-Inflammatory Activity: Current Knowledge and Future Perspectives. **Mar Drugs**, v. 18, 0. 147, 2020.

SRIVASTAVA, A.; TIWARI, R.; SRIVASTAVA, V.; SINGH, T. B.; ASTHANA, R. K. Fresh water cyanobacteria *Geitlerinema* sp. CCC728 and *Arthrospira* sp. CCC729 as an anticancer drug resource. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-18, 2015.

STAPELS, D. A.; GEISBRECHT, B. V.; ROOIJAKKERS, S. H. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. **Curr Opin Microbiol.**, v. 23, p. 42-48, 2015.

STEERT, K.; BERG, M.; MOTTRAM, J. C.; WESTROP, G. D.; COOMBS, G. H.; COS, P.; MAES, L.; JOOSSENS, J.; VAN DER VEKEN, P.; HAEMERS, A.; AUGUSTYNS, K.  $\alpha$ -Ketoheterocycles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. **Chem Med Chem.**, v. 5, p. 1734-1748, 2010.

SUGANYA, S.; ISHWARYA, R.; JAYAKUMAR, R.; GOVINDARAJAN, M.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; AL-ANBR, M. N.; VASEEHARAN, B. New insecticides and antimicrobials derived from *Sargassum wightii* and *Halimeda gracillis* seaweeds: Toxicity against mosquito vectors and antibiofilm activity against microbial pathogens. **S Afr J Biotechnol.**, v. 125, p. 466-480, 2019.

SUN, G.; STREMPLE, P., Retention index characterization of flavor, fragrance, and many other compounds on DB-1 and DB-XLB, 2003, retrieved from <http://www.chem.agilent.com/cag/cabu/pdf/b-0279.pdf>.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother.**, v. 16, p. 237-252, 2015.

SURYANARAYANAN, T. S. Fungal endosymbionts of seaweeds. *In*: RAGHUKUMAR, C. (Eds.), **Biology of Marine Fungi. Progress in Molecular and Subcellular Biology**, Springer, cap. 3, v. 53, p. 53-69, 2012.

SZAJNMAN, S. H.; MONTALVETTI, A.; WANG, Y.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Bisphosphonates Derived from fatty acids are potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase. **Bioor Med Chem Lett.**, v. 13., p. 3231-3235, 2003.

SZAJNMAN, S. H.; RAVASCHINO, E. L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase, **Bioor Med Chem Lett.**, v. 15., p. 4685-4690, 2005.

TABOADA, C.; BRUNETTI, A. E.; LYRA, M. L.; FITAK, R. R.; FAIGÓN SOVERNA, A.; RON, S. R.; LAGORIO, M. G.; HADDAD, C. F. B.; LOPES, N. P.; JOHNSEN, S.; FAIVOVICH, J.; CHEMES, L. B.; BARI, S. E. Naturally occurring fluorescence in frogs. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 114, 3672-3677, 2017.

TAKAHASHI, C.; MATSUSHITA, T.; DOI, M.; MINOURA, K.; SHING, T.; KUMEDA, Y.; NUMATA, A. Fumiquinazolines A-G, novel metabolites of a fungus separated from a *Pseudolabrus* marine fish. *J Chem Soc Perkin Trans.*, p. 2345-2353, 1995.

TAN, L. T.; PHYO, M. Y. Marine Cyanobacteria: A Source of Lead Compounds and their Clinically-Relevant Molecular Targets. **Mar Drugs**, v. 25, p. 2197, 2020.

TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; AMARAL, G. T.; BENEVENUTO, C. G.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M.; GASPAR, L. R. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by In Vitro Methods. **Antioxidants**, v. 9, p. 328, 2020.



TEIXEIRA, T. R.; RAGEL, K. C.; TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; DOS SANTOS, G. S.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICOLO, P.; GASPAR, L. R.; DEBONSI, H. M. In Vitro Evaluation of the Photoprotective Potential of Quinolinic Alkaloids Isolated from the Antarctic Marine Fungus *Penicillium echinulatum* for Topical Use. **Mar Biotechnol.**, v. 23, p. 357-372, 2021.

TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; TURATTI, I. C. C.; PAZIANI, M. H.; KRESS, M. R. Z.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M. Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Polar Biol.**, v. 42, p. 1431-1444, 2019a.

TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; ARMSTRONG, L.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M. Antitumor Potential of Seaweed Derived-Endophytic Fungi. **Antibiotics**, v. 8, p. 1-24, 2019b.

THACKER, R.W. Impacts of shading on sponge-cyanobacteria symbioses: A comparison between host-specific and generalist associations. **Integr Comp Biol.**, v. 45, p. 369-376, 2005.

TIANERO, M. D. B.; KWAN, J. C.; WYCHE, T. P.; PRESSON, A. P.; KOCH, M.; BARROWS, L. R.; BUGNI, T. S.; SCHMIDT, E. W. Species specificity of symbiosis and secondary metabolism in ascidians. **ISME J.**, v. 9, p. 615-628, 2015.

TOLLER-KAWAHISA, J. E.; CANICOBA, N. C.; VENANCIO, V. P.; KAWAHISA, R.; ANTUNES, L. M.; CUNHA, T. M.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M. Systemic lupus erythematosus onset in lupusprone B6.MRL/lpr mice is influenced by weight gain and is preceded by an increase in neutrophil oxidative burst activity. **Free Radic Biol Med.**, v. 86, p. 362-373, 2015.

TORRES, A.; HOCHBERG, M.; PERGAMENT, I.; SMOUM, R.; NIDDAM, V.; DEMBITSKY, V. M.; TEMINA, M.; DOR, I.; LEV, O.; SREBNIK, M.; ENK, C. D. A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. **Eur J Biochem.**, v. 271, p. 780-784, 2004.

TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A.; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 24, p. 265-276, 2014.

TAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, p. 214-229, 2016.

TSANG, C-C.; TANG, J. Y. M.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Comput Struct Biotechnol J.**, v. 16, p. 197-210, 2018.

TSUI, M. M. P.; LAM, J. C. W.; NG, T. Y.; ANG, P. O.; MURPHY, M. B.; LAM, P. K. S. Occurrence, distribution, and fate of organic UV filters in coral communities. **Environ Sci Technol.**, v. 51, p. 4182-4190, 2017.

United Nations, UNAI Quiz: World Population Day (2022). World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248 Nações Unidas, 2022. | United Nations.

UZUN, M.; DEMIREZER, L. O. Anti-aging power of *Rumex crispus* L.: matrixmetalloproteinases inhibitor, sun protective and antioxidant. **S Afr J Bot.**, v. 124, p. 364-371, 2019.

VALLET, M.; VANBELLINGEN, Q. P.; FU, T.; LE CAER, J. P.; DELLA-NEGRA, S.; TOUBOUL, D.; DUNCAN, K. R.; NAY, B.; BRUNELLE, A.; PRADO, S. An Integrative Approach to Decipher the Chemical Antagonism between the Competing Endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. **J Nat Prod.**, v. 80, p. 2863-2873, 2017.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infec Dis Clin North Am.**, v. 26, p. 309-322, 2012.

VELASCO-ALZATE, K. Y.; BAUERMEISTER, A.; TANGERINA, M. M. P.; LOTUFO, T. M. C.; FERREIRA, M. J. P.; JIMENEZ, P. C.; PADILLA, G.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine Bacteria from Rocas Atoll as a Rich Source of Pharmacologically Active Compounds. **Mar Drugs**, v. 17, p. 671, 2019.

VICENTE, T. F. L.; GONÇALVES, M. F. M.; BRANDÃO, C.; FIDALGO, C.; ALVES, A. Diversity of fungi associated with macroalgae from an estuarine environment and description of *Cladosporium rubrum* sp. nov. and *Hypoxylon aveirense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 71, p. 4630, 2021.

VIEIRA, G.; PURIĆ, J.; MORÃO, L. G.; SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. Citri. **Lett Appl Microbiol.**, v. 67, p. 64-71, 2018.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Stud Mycol.**, v. 78, p. 343-71, 2014.

WANG, C.; LU, Y.; CAO, S. Antimicrobial compounds from marine Actinomycetes. **Arch Pharm Res.**, v. 43, p. 677-704, 2020.

WANG, L.; LI, M.; LIN, Y.; DU, S.; LIU, Z.; JU, J.; SUZUKI, H.; SAWADA, M.; UMEZAWA, K. Inhibition of cellular inflammatory mediator production and amelioration of learning deficit in flies by deep sea *Aspergillus* derived cyclopenin. **J Antibiot.**, v. 73, p. 622-629, 2020.

WANG, C.; TANG, S.; CAO, S. Antimicrobial compounds from marine fungi. **Phytochem Rev.**, v. 20, p. 85-117, 2021.

WANG, J. F.; LEI, P. P.; WANG, Y. *et al.* Antimicrobial aromatic polyketides from gorgonian-associated fungus, *Penicillium commune* 518. **Chin J Chem.**, v. 30, p. 1236-1242, 2012.

WANG, M.; CARVER, J.J.; PHELAN, V.V.; SANCHEZ, L.M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D.D.; WATROUS, J.; KAPONO, C.A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat Biotechnol.**, v. 34, p. 828-837, 2016.

WANG, X.; SENA FILHO, J.G.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R.; CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. **J Nat Prod.**, v. 73, p. 942-948, 2010.

WARNATSCH, A.; IOANNOU, M.; WANG, Q.; PAPAYANNOPOULOS, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. **Science**. v, 349, p. 316-320, 2015.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, M.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C.; Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 109, p. 1743-1752, 2012.

WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H.; ROHWER, F. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environ Microbiol.**, v. 9, p. 2707-2719, 2007.

WEI, M.; YANG, R. Viridicatol from marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5295 exerts anti-inflammatory effects through inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway on lipopolysaccharide-induced RAW264.7 and BV2 cells. **Nat Prod Sci.**, v. 21, p. 240-247.

WEI, M.; YANG, R.; SHAO, C.; WANG, C.; DENG, D.; SHE, Z.; LIN, Y. Isolation, structure elucidation, crystal structure, and biological activity of a marine natural alkaloid, viridicatol. **Chem Nat Compd.**, v. 47, p. 322-325, 2011.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic, p. 315-322, 1990.

WIENCKE, C.; CLAYTON, M.N.; GOMEZ, I.; IKEN, K.; LUDER, U.H.; AMSLER, C.D.; KARSTEN, U.; HANELT, D.; BISCHOF, K.; DUNTON, K. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar water. **Rev Environ Sci Biotechnol.**, v. 6, p. 95-126, 2007.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr Polym.**, v. 84, p. 14-21, 2011.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Sci.**, v. 24, p. 342-357, 2017.

WU, S.; ZORN, H.; KRINGS, U.; BERGER, R.G., Volatiles from submerged and surface-cultured beefsteak fungus, *Fistulina hepatica*, **Flavour Fragr J.**, v. 22, p. 53-60, 2007.

XU, J.; YI, M.; DIANG, L.; HE, S. A Review of Anti-Inflammatory Compounds from Marine Fungi, 2000–2018. **Mar Drugs**, v. 17, p. 636, 2019.

XU, L.; MENG, W.; CAO, C.; WANG, J.; SHAN, W.; WANG, Q. Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. **Mar Drugs**, v. 13, p. 3479-3513, 2015.

XU, X.; VAN STEE, L. L. P.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; ADAHCHOUR, M.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. T. H.; LELIEVELD, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. **Atmos Chem Phys.**, v. 3, p. 665-682, 2003.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, V.; SANGWAN, P.; MISHRA, S.; PANJIAR, N.; GUPTA, V. K.; SAXENA, A. K. Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. In: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Penicillium System Properties and Applications**. Elsevier, cap. 1, p. 3-18, 2018.

YANG, S-C.; SUNG, P-J.; LIN, C-F.; KUO, J.; CHEN, C-Y.; HWANG, T-L. Anti-Inflammatory Effects of Secondary Metabolites of Marine *Pseudomonas* sp. in Human Neutrophils Are through Inhibiting P38 MAPK, JNK, and Calcium Pathways. **PLoS ONE**, v. 9, p. e114761, 2014.

YU, G.; SUN, Z.; PENG, J.; ZHU, M.; CHE, Q.; ZHANG, G.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Secondary metabolites produced by combined culture of *Penicillium crustosum* and a *Xylaria* sp. **J Nat Prod.**, v. 82, p. 2013-2017, 2019.

ZACHER, K. The susceptibility of spores and propagules of Antarctic seaweeds to UV and photosynthetically active radiation - Field versus laboratory experiments. **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 458, p. 57-63, 2014.

ZHANG, D.; YANG, X.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. Circumdatin I, a new ultraviolet-A protecting benzodiazepine alkaloid from a marine isolate of the fungus *Exophiala*. **J Antibiot.**, v. 61, p. 40-42, 2008.

ZHANG, P.; LI, X.; WANG, B. Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity. **Planta Med.**, v. 82, p. 832-842, 2016.

ZHANG, Y.; LI, X. M.; SHANG, Z. *et al.* Meroterpenoid and diphenyl ether derivatives from *Penicillium* sp. MA-37, a fungus isolated from marine mangrove rhizospheric soil. **J Nat Prod.**, v. 75, p. 1888-1895, 2012.

ZHANG, Z-X.; LI, Z-H.; YIN, W-B.; LI, S-M. Biosynthesis of Viridicatol in *Penicillium palitans* Implies a Cytochrome P450-Mediated meta Hydroxylation at a Monoalkylated Benzene Ring. **Org Lett.**, v. 24, p. 262-267, 2022.

ZHAO, M-M., ZENG, K-W. Marine natural products with anti-inflammation effects. **Tradit. Med Res.**, v. 5, p. 252-260, 2020.

ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A., KOZLOVSKY, A. G. Secondary Metabolites of *Penicillium* Fungi Isolated from Permafrost Deposits as Chemotaxonomic Markers. **Mikrobiol.**, v. 78, p. 393-398, 2009.

ZHENG, C. J.; LIAO, H. X.; MEI, R. Q. *et al.* Two new benzophenones and one new natural amide alkaloid isolated from a mangrove-derived Fungus *Penicillium citrinum*. **Nat Prod Res.**, v. 33, p. 1127-1134, 2018.

ZHUKOVA, N. V.; ELISEIKINA, M. G. Symbiotic bacteria in the nudibranch mollusk *Dendrodoris nigra*: Fatty acid composition and ultrastructure analysis. **Mar Biol.**, v. 159, p. 1783-1794, 2012.

ZOU, Y.; GARCIA-BORRAS, M.; TANG, M. C.; HIRAYAMA, Y.; LI, D. H.; LI, L.; WATANABE, K.; HOUK, K. N.; TANG, Y. Enzyme-Catalyzed Cationic Epoxide Rearrangements in Quinolone Alkaloid Biosynthesis. **Nat Chem Biol.**, v, 13, p. 325-332, 2017.

ZOU, Y.; ZHAN, Z.; LI, D.; TANG, M.; CACHO, R. A.; WATANABE, K.; TANG, Y. Tandem prenyltransferases catalyze isoprenoid elongation and complexity generation in biosynthesis of quinolone alkaloids. **J Am Chem Soc.**, v. 137, p. 4980-4983, 2015.

ZUCCARO, A.; MITCHELL, J.I. Fungal communities of seaweeds. The fungal community, **CRC Press**, p. 533-579, 2005.

ZUCCARO, A.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; KOHLMAYER, J.; DRAEGER, S. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, p. 931-941, 2008.

**ANEXOS  
E  
APÊNDICES**

## ANEXO I

Componentes dos meios de cultivo SWBG<sub>11</sub> (CASTENHOLZ, 1988) e ASN III suplementado com vitamina B<sub>12</sub> (RIPPKA et al., 1979).

	Concentração final do meio (g L <sup>-1</sup> )	
	SWBG <sub>11</sub>	ASN III + Vit. B <sub>12</sub>
NaCl	12,5	12,5
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0	1,0
KCl	0,25	0,25
NaNO <sub>3</sub>	1,5	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04	0,02
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	3,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	0,5
Ácido cítrico	0,006	0,003
Citrato de amônio férrico	0,006	0,003
Na <sub>2</sub> EDTA	0,001	0,0005
Carbonato de sódio	0,02	0,02
Solução de micronutrientes <sup>1</sup>	1 mL	1 mL
Vitamina B <sub>12</sub>	-	0,01 mg*

\* Valor absoluto adicionado a cada 1 litro de cultura preparado.

<sup>1</sup> A solução de micronutrientes compreende uma mistura de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,86 g L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,81 g L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,222 g L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,39 g L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,079 g L<sup>-1</sup>), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,049 g L<sup>-1</sup>).

## APÊNDICE A

Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.985.260/CAAE: 96779018.1.0000.5403

(Emenda 1)



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 005/2020  
kms

Ribeirão Preto, 15 de maio de 2020.

À pesquisadora  
**Thaiz Rodrigues Teixeira**  
Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Debonisi  
FCFRP/USP


Prezada Pesquisadora,

Informamos que a Emenda 1 do protocolo de pesquisa intitulado “**Prospecção química e avaliação do potencial biológico de microrganismos associados às algas marinhas provenientes da Antártica: *Adenocystis utricularis* e *Ascoseira mirabilis***” (CAAE: 96779018.1.0000.5403), foi aprovada “ad referendum” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em 22/04/2020, conforme Parecer Consubstanciado nº 3.985.260 e referendado pelo CEP, por unanimidade, em sua 195ª reunião, de 23/04/2020.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

  
**Prof. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo**  
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP



**APÊNDICE B**

Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.046.104/Protocolo CEP/FCFRP nº. 483 -  
CAAE: 96779018.1.0000.5403



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
*Comitê de Ética em Pesquisa*

Of. CEP/FCFRP nº. 021/2018  
kms

Ribeirão Preto, 29 de novembro de 2018.

À pós-graduanda  
**Thaiz Rodrigues Teixeira**  
Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Deboni  
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS ALGAS MARINHAS PROVENIENTES DA ANTÁRTICA: *ADENOCYSTIS UTRICULARIS* E *ASCOSEIRA MIRABILIS*”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 483 - CAAE: 96779018.1.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 182ª reunião ordinária, realizada dia 12 de novembro de 2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.046.104.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.







Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

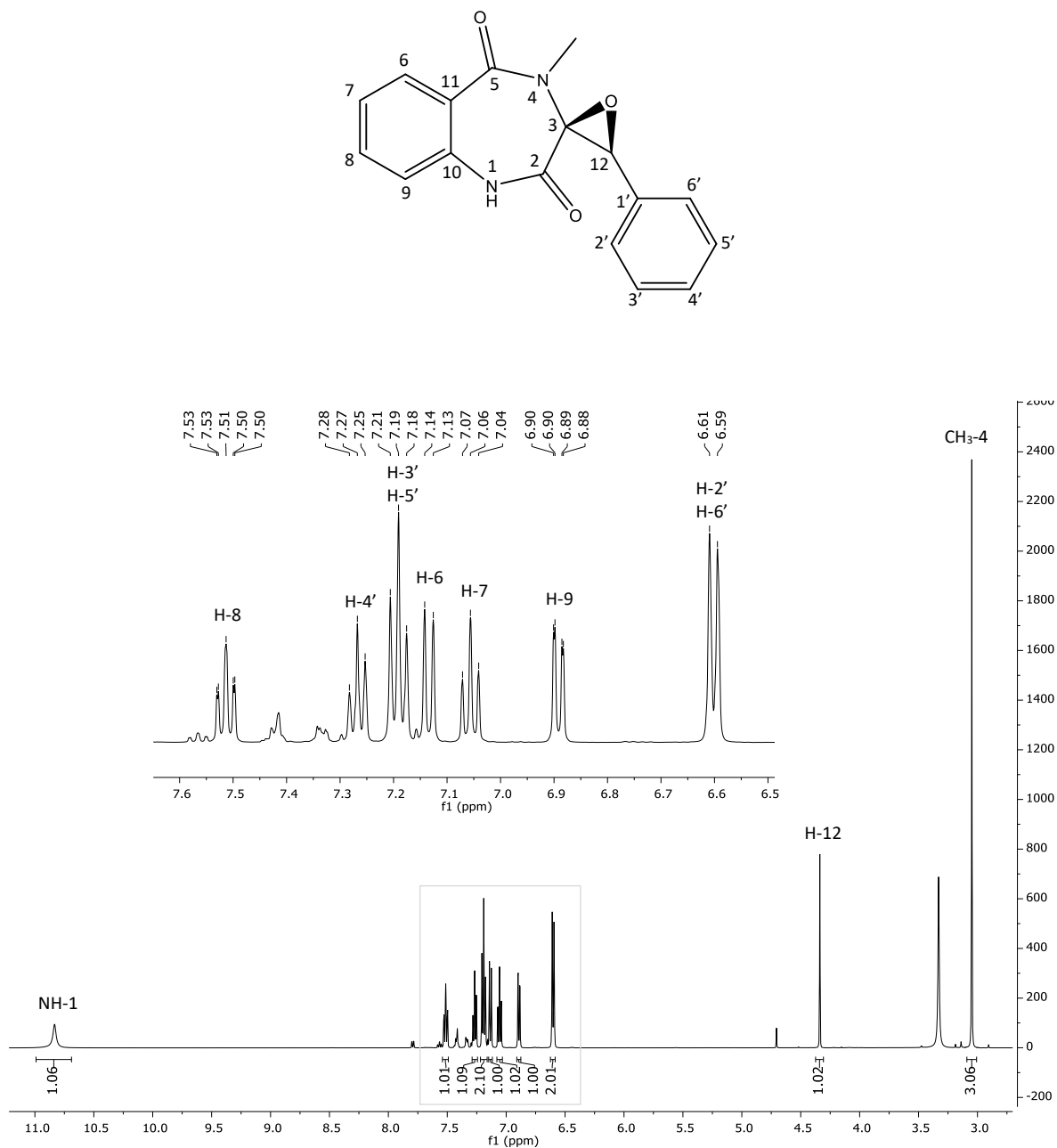
PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
Coordenadora do CEP/FCFRP

**APÊNDICE C**

Fungos associados isolados da macroalga Antártica *Adenocystis utricularis*

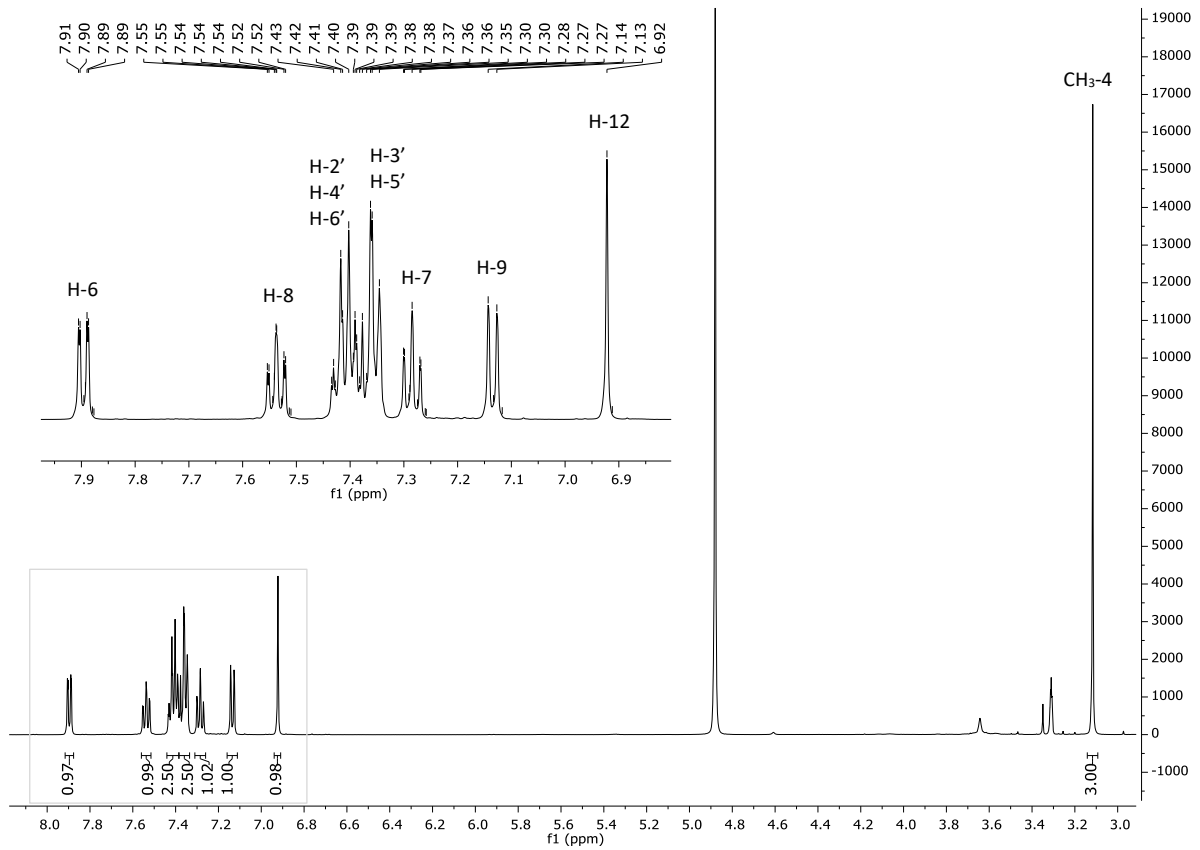
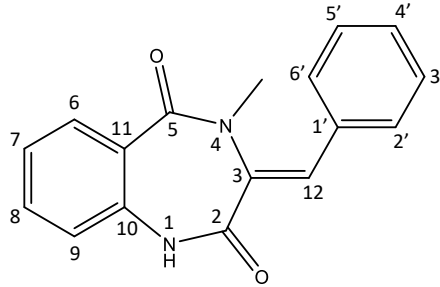
Método de esterilização	Local de coleta	Fungo/Código
MI	Greenwich	<p style="text-align: center;">Au MI<sub>1</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a                      b                      c</p>
MII		<p style="text-align: center;">Au MII<sub>1</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a                      b                      c                      d</p>
MIII		<p style="text-align: center;">Au MIII<sub>1</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a</p>
MI	Hope Bay	<p style="text-align: center;">Au MI<sub>2</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a                      b                      c                      d</p>
MII		<p style="text-align: center;">Au MII<sub>2</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a                      b                      c</p>
MIII		<p style="text-align: center;">Au MIII<sub>2</sub> pdb</p>  <p style="text-align: center;">a                      b</p>

## APÊNDICE D

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da ciclopenina (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

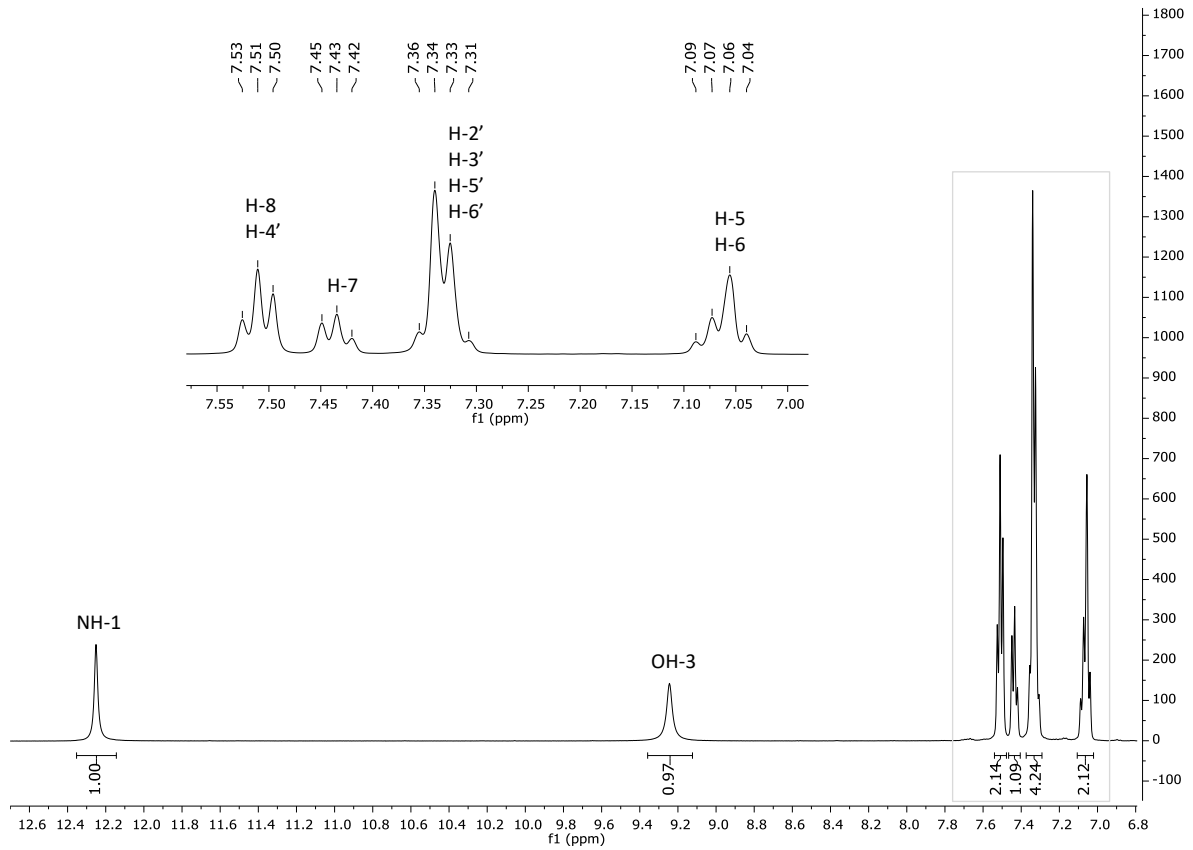
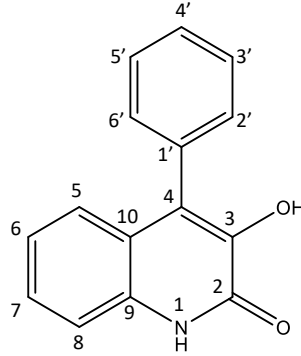
## APÊNDICE E

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da desidrociclopeptina (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



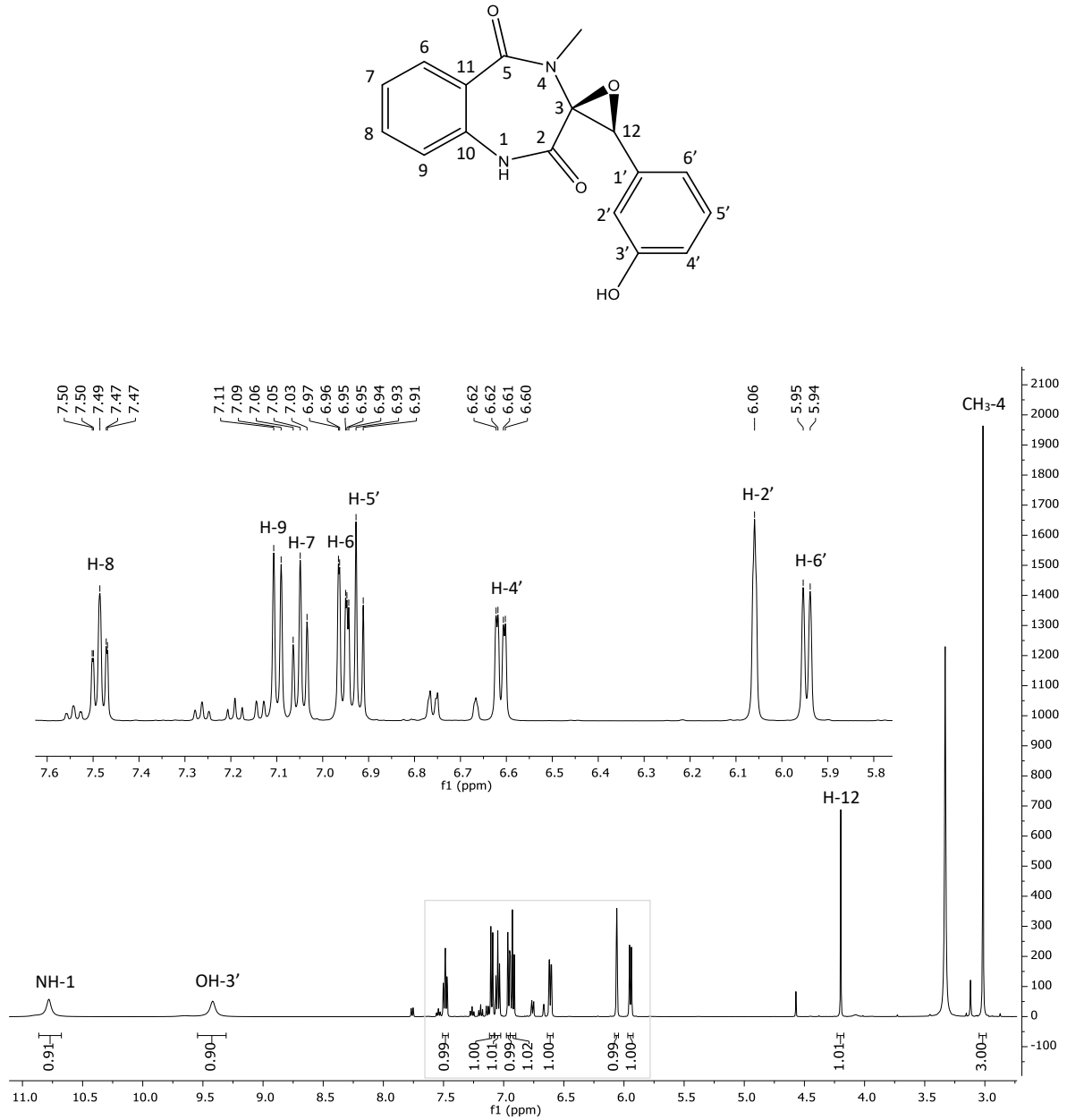
## APÊNDICE F

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da viridicatina (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



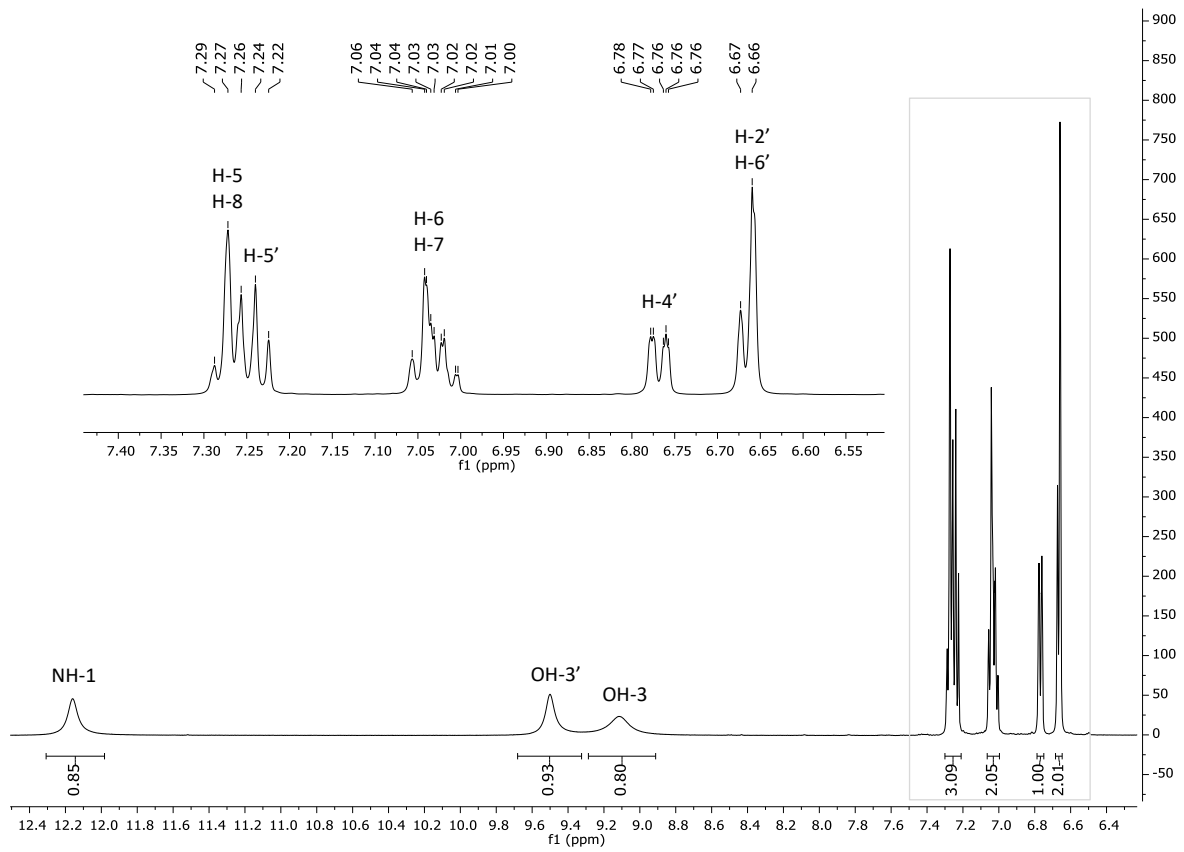
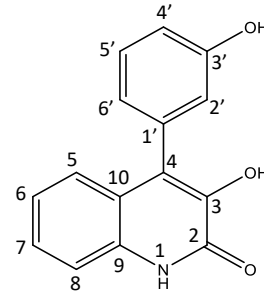
## APÊNDICE G

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ciclopenol (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



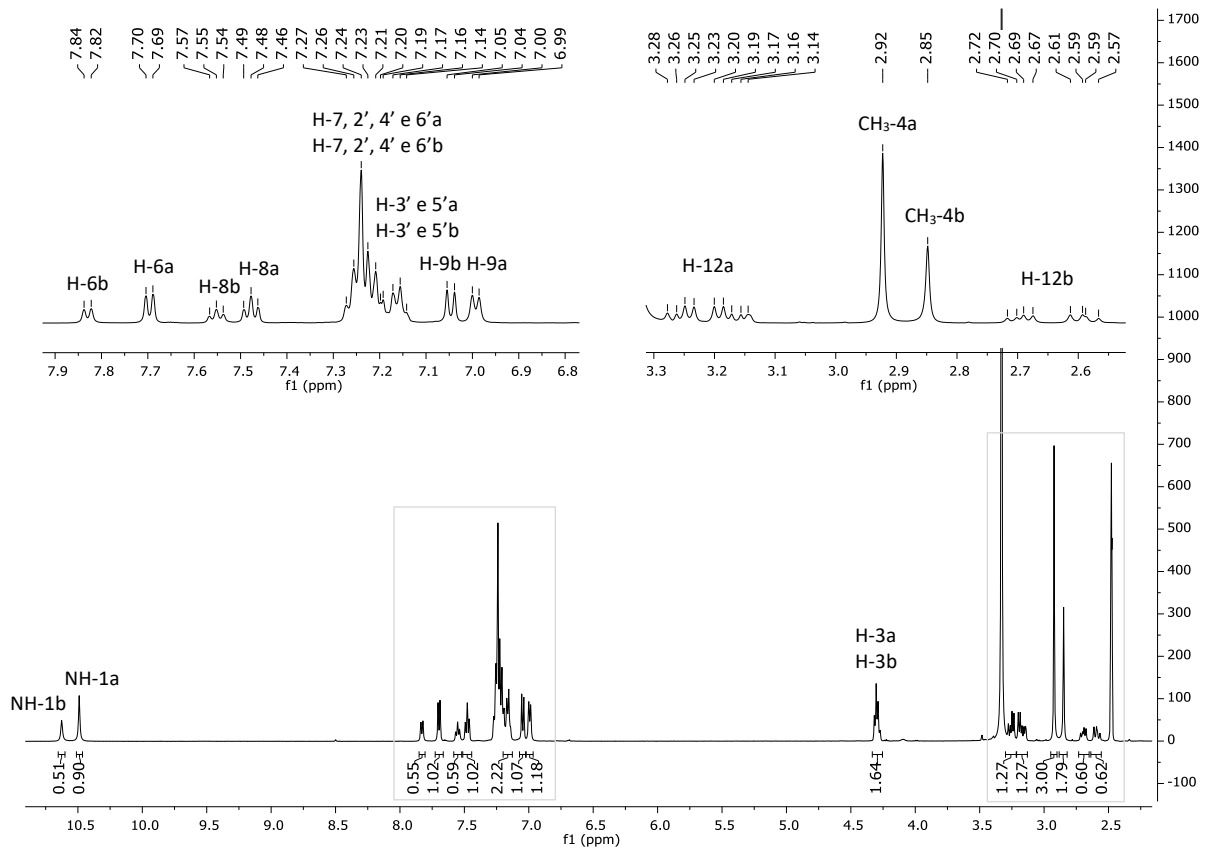
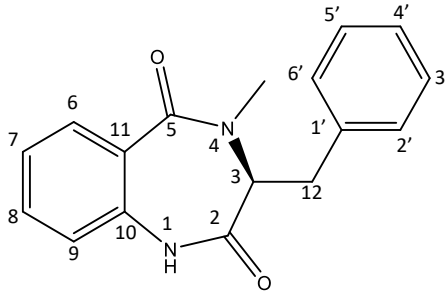
## APÊNDICE H

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do viridicatol (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



## APÊNDICE I

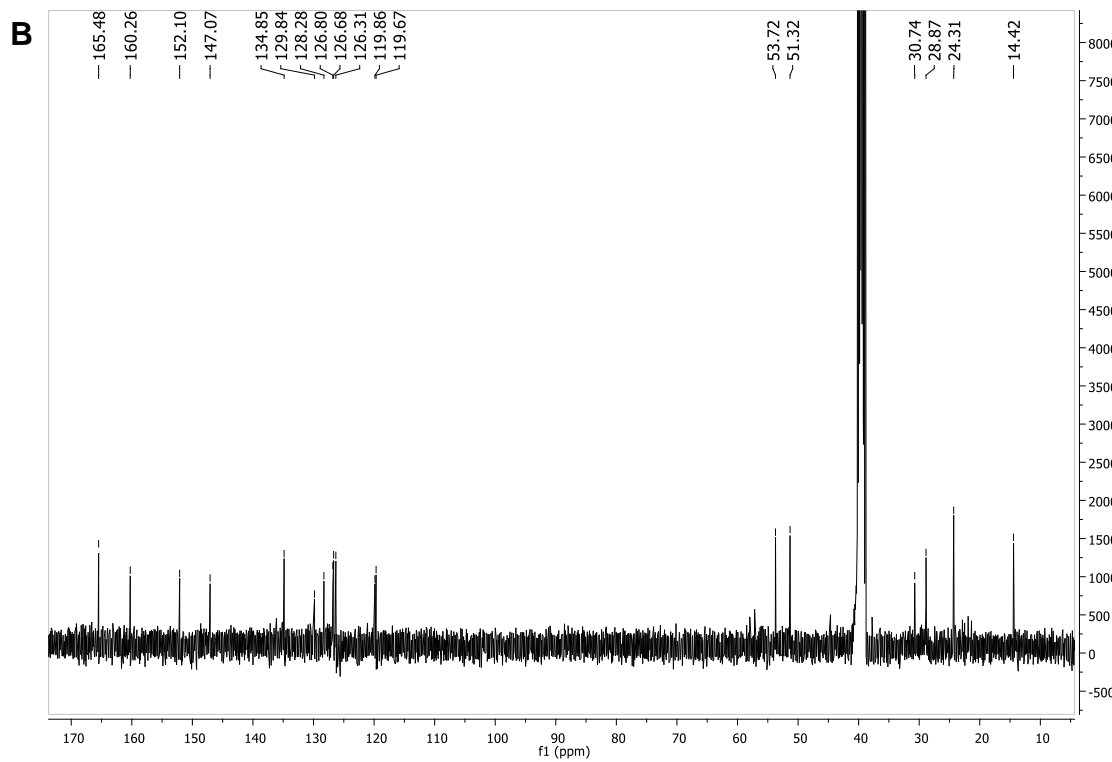
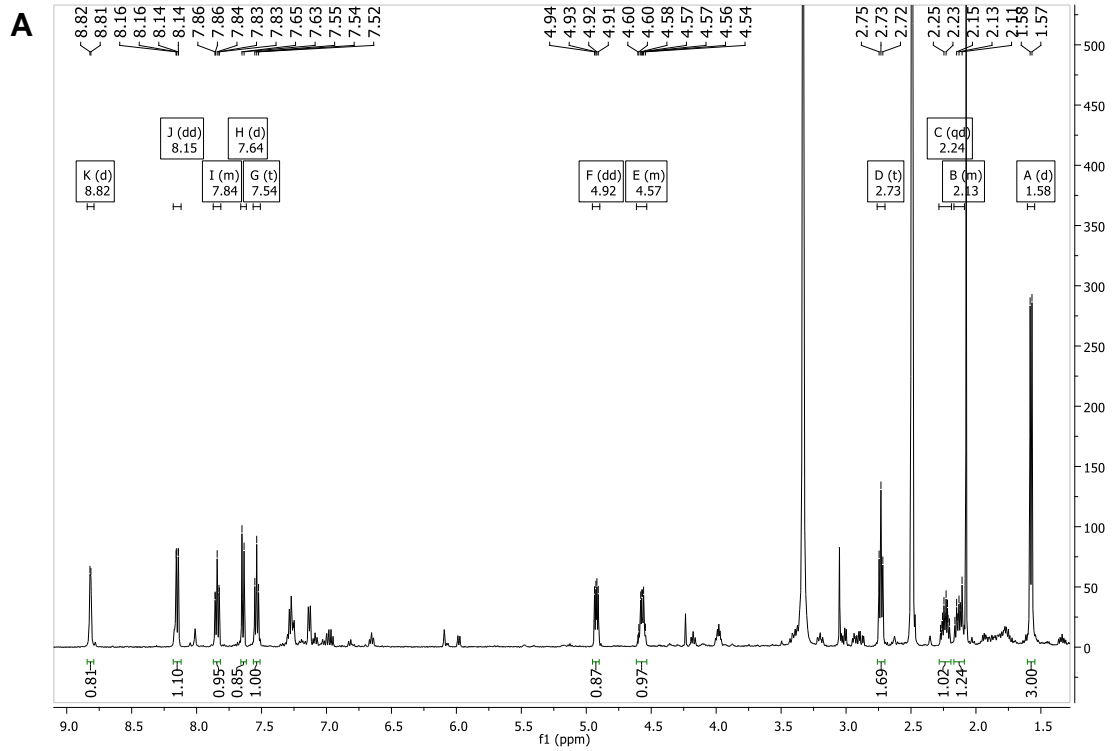
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da ciclopeptina a e b (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )





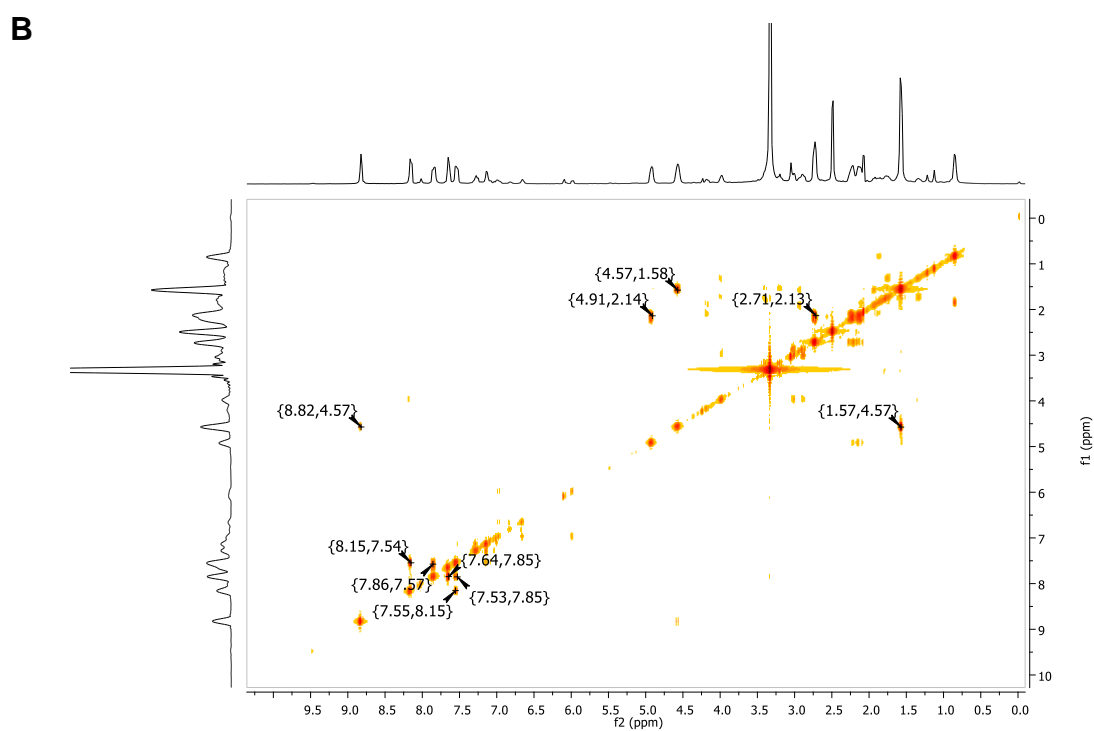
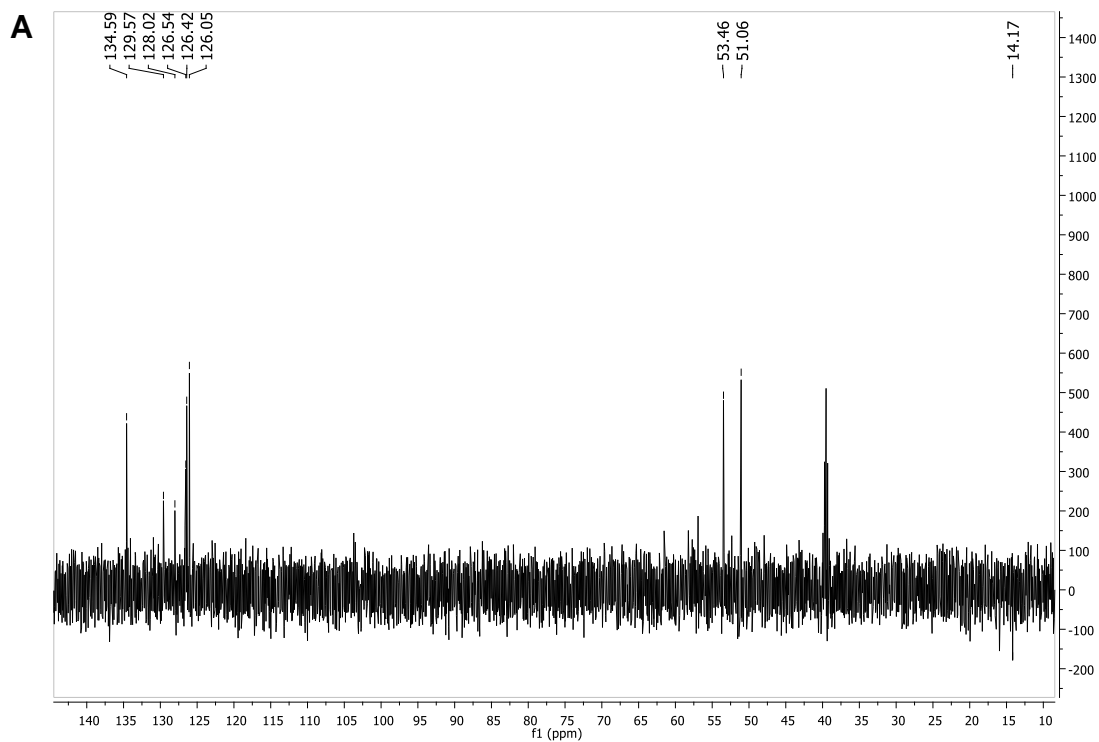
## APÊNDICE J

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e  $^{13}\text{C}$  (B) da substância CLV H p1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



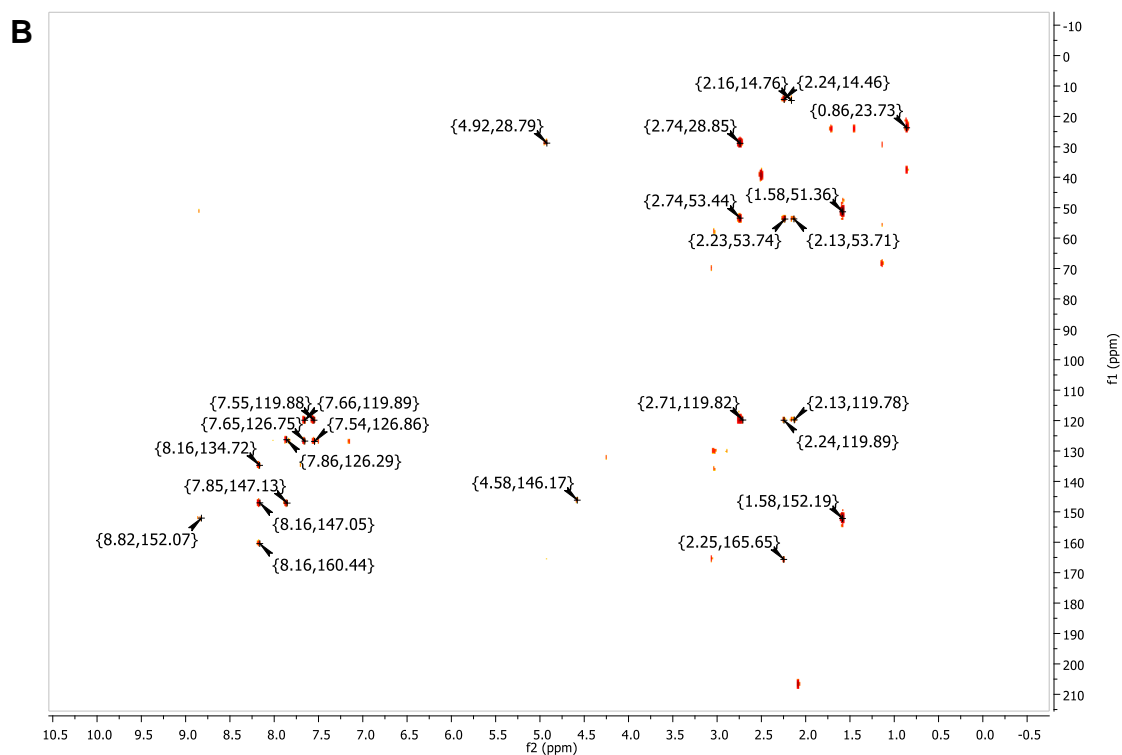
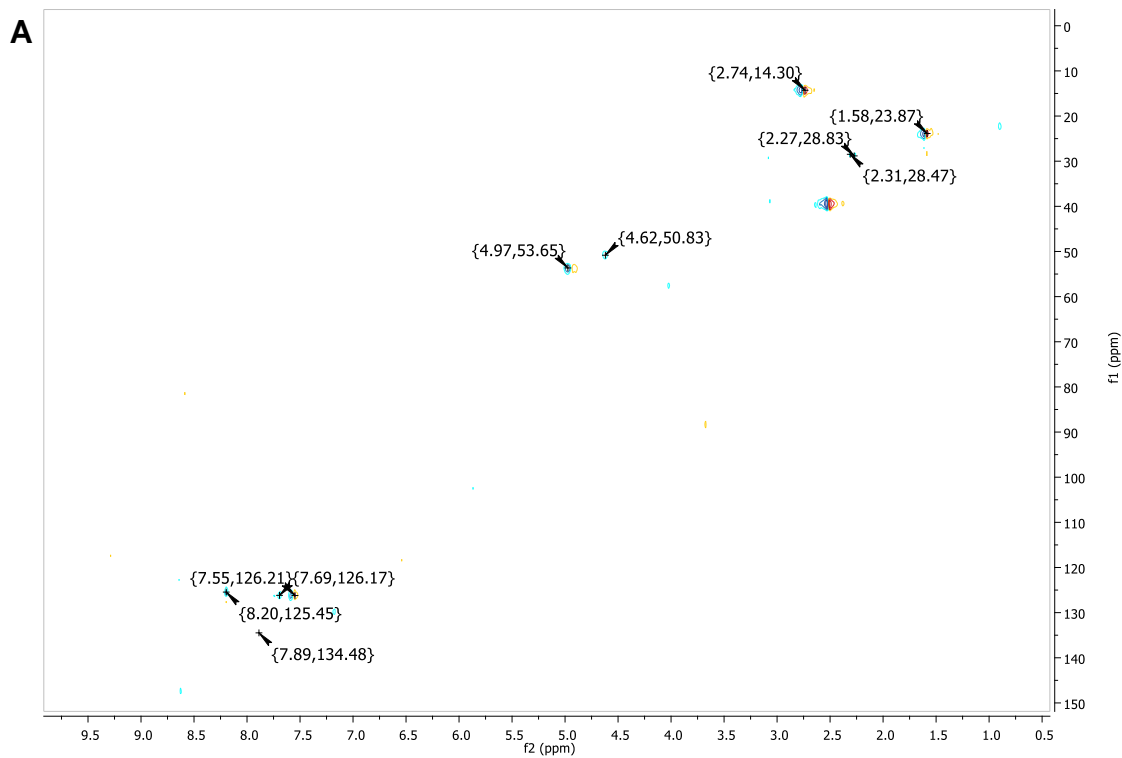
## APÊNDICE K

Espectro de RMN de DEPT 135 (A) e mapa de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (B) da substância CLV H p1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



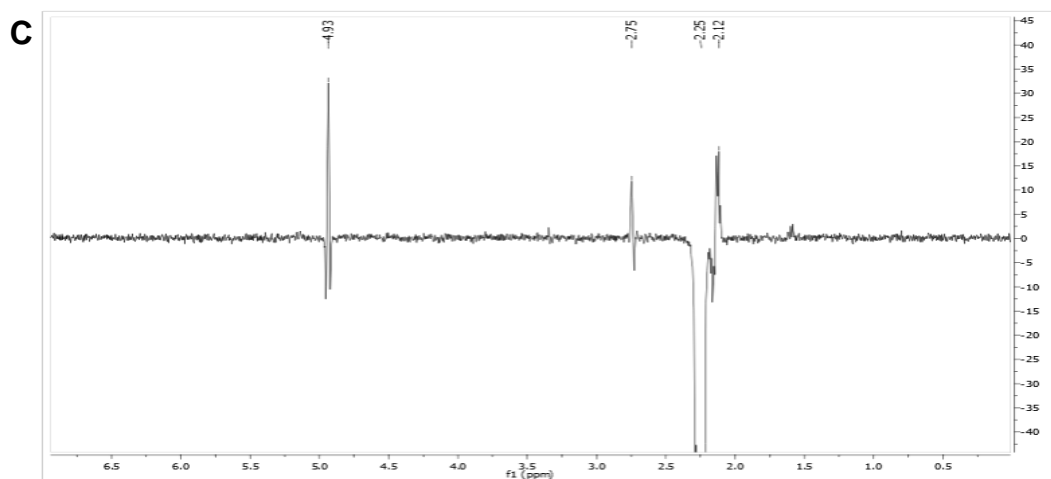
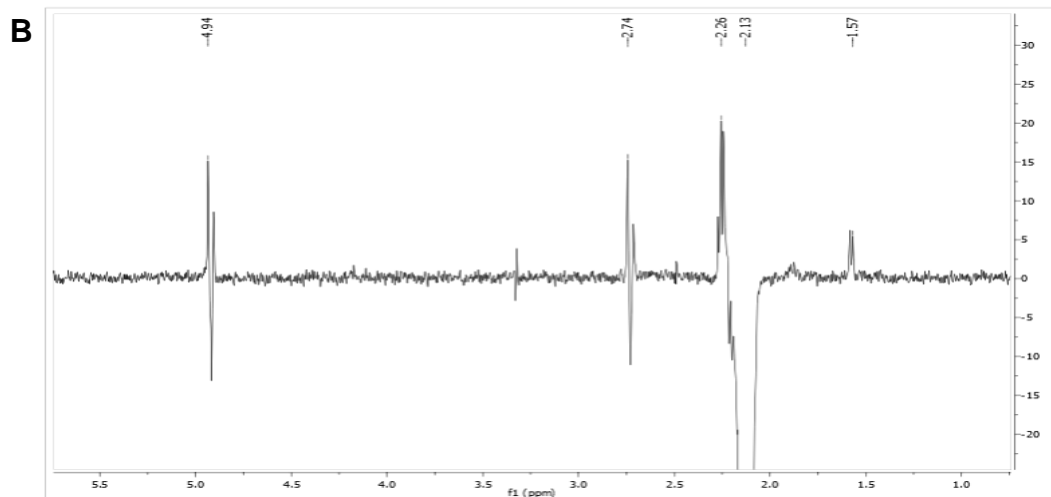
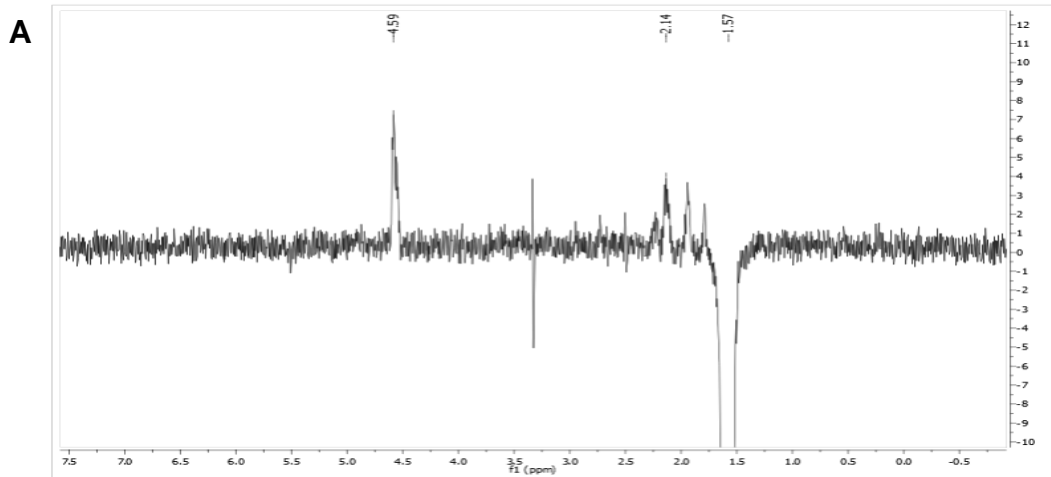
## APÊNDICE L

Mapas de contorno HSQC (A) e HMBC (B) da substância CLV H p1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



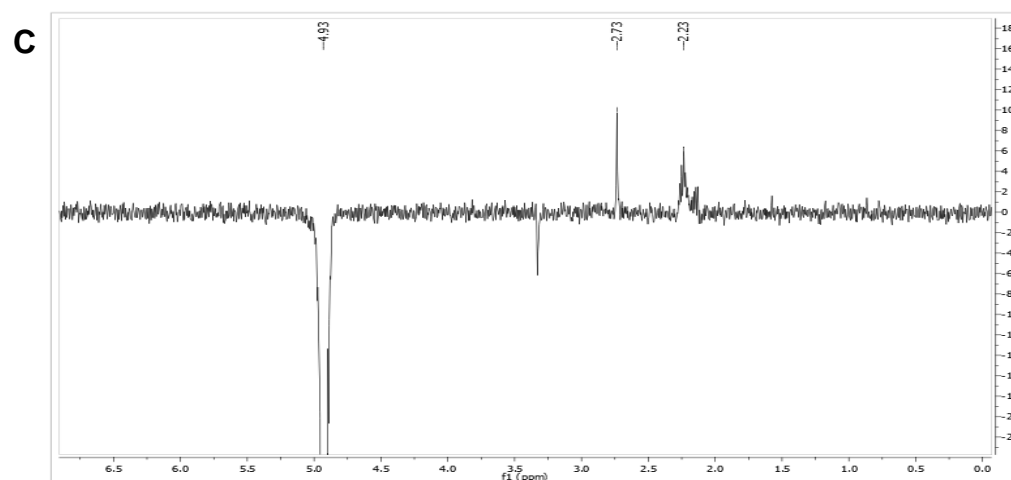
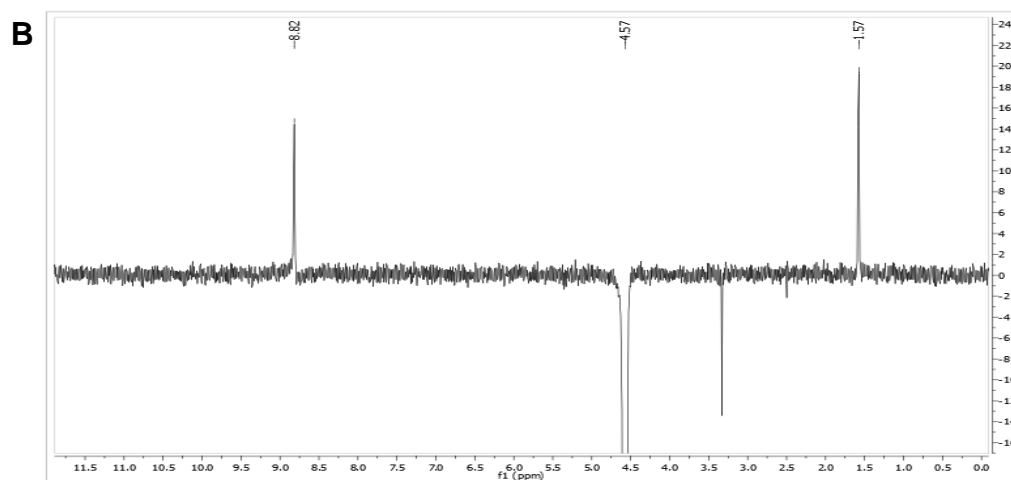
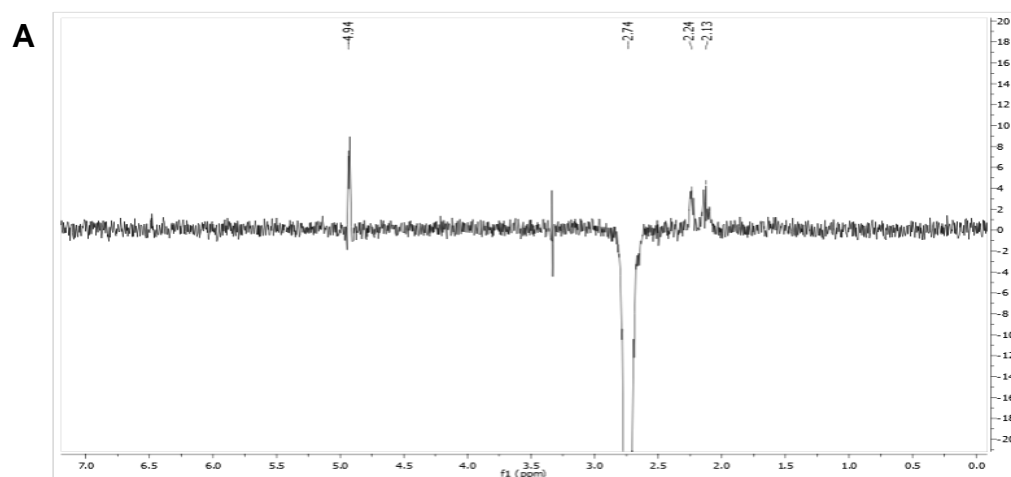
## APÊNDICE M

Espectros de NOE dos prótons com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  1,57 (A), 2,16 (B) e 2,26 ppm da substância CLV H p1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



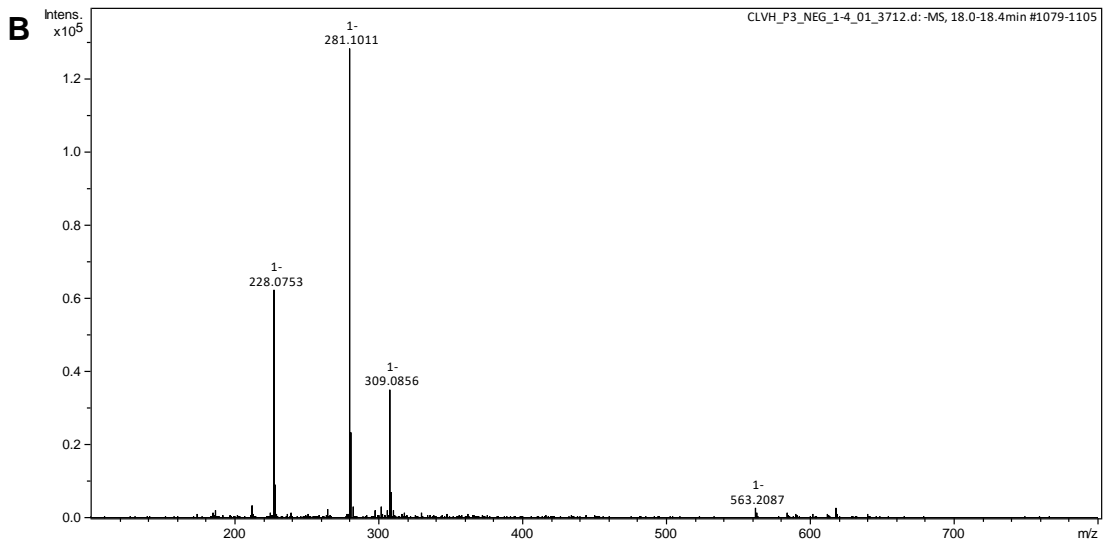
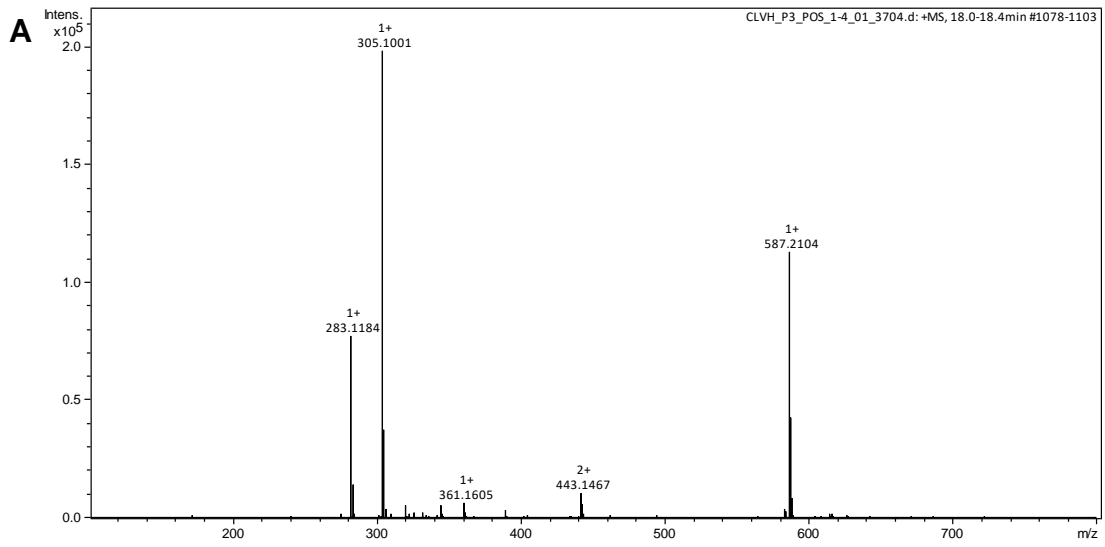
## APÊNDICE N

Espectros de NOE dos prótons com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  2,74 (A), 4,59 (B) e 4,95 ppm da substância CLV H p1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



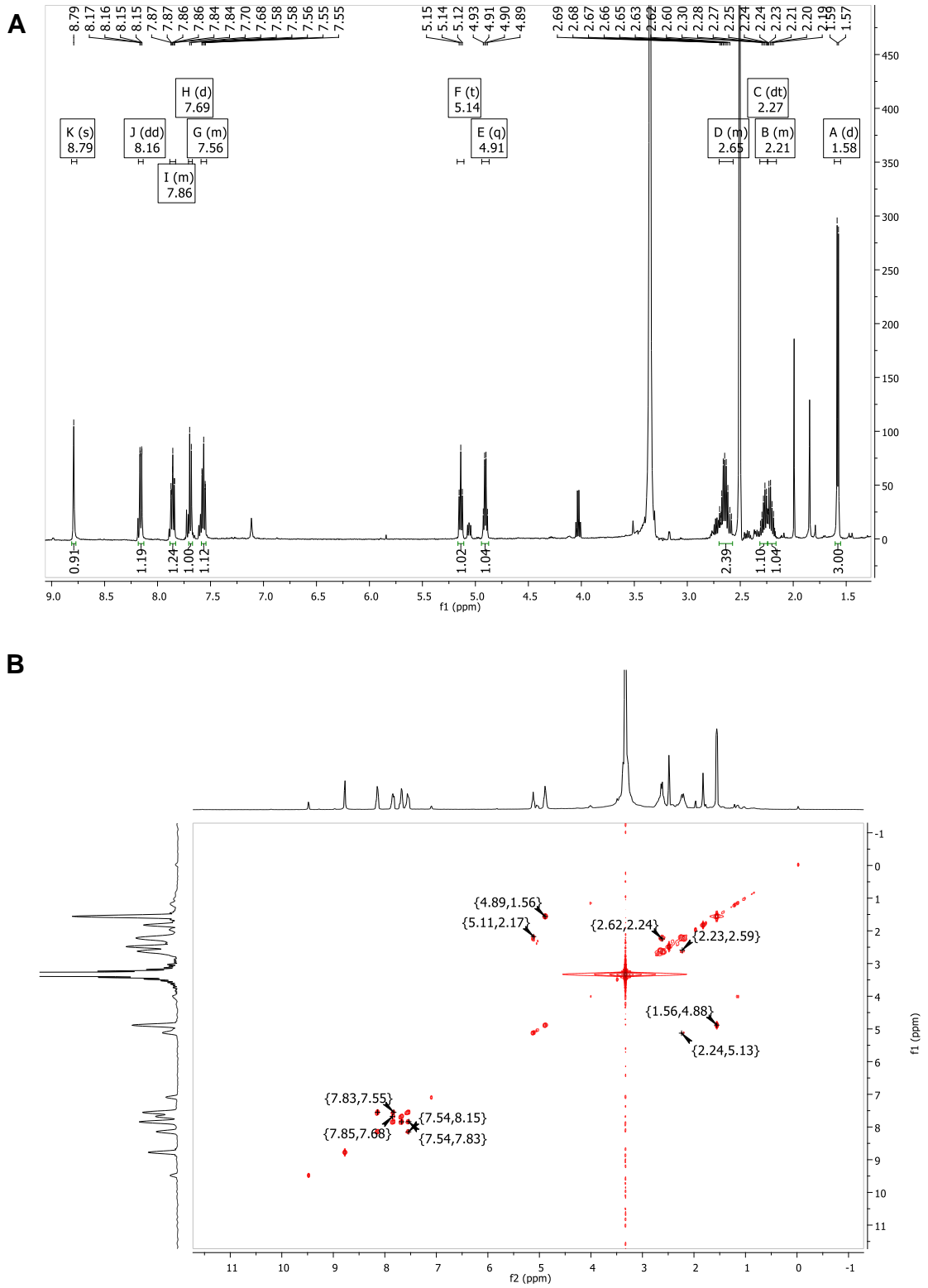
## APÊNDICE O

EM em alta resolução obtido para a substância CLV H p1 em modo positivo (A) e negativo (B)



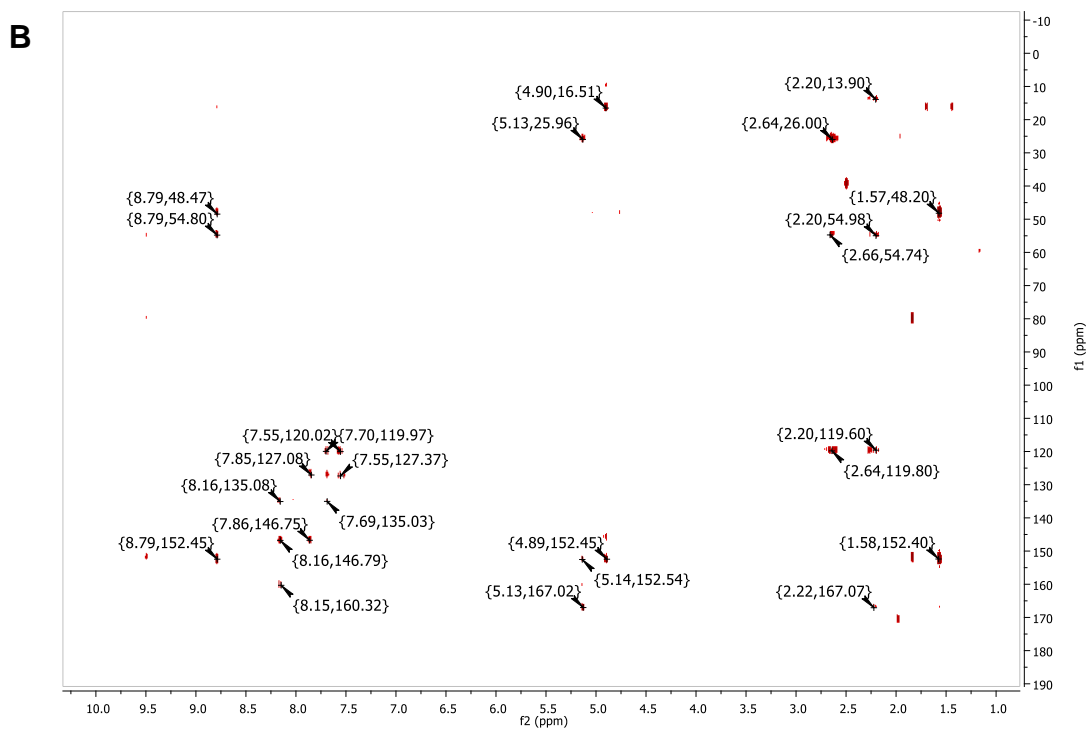
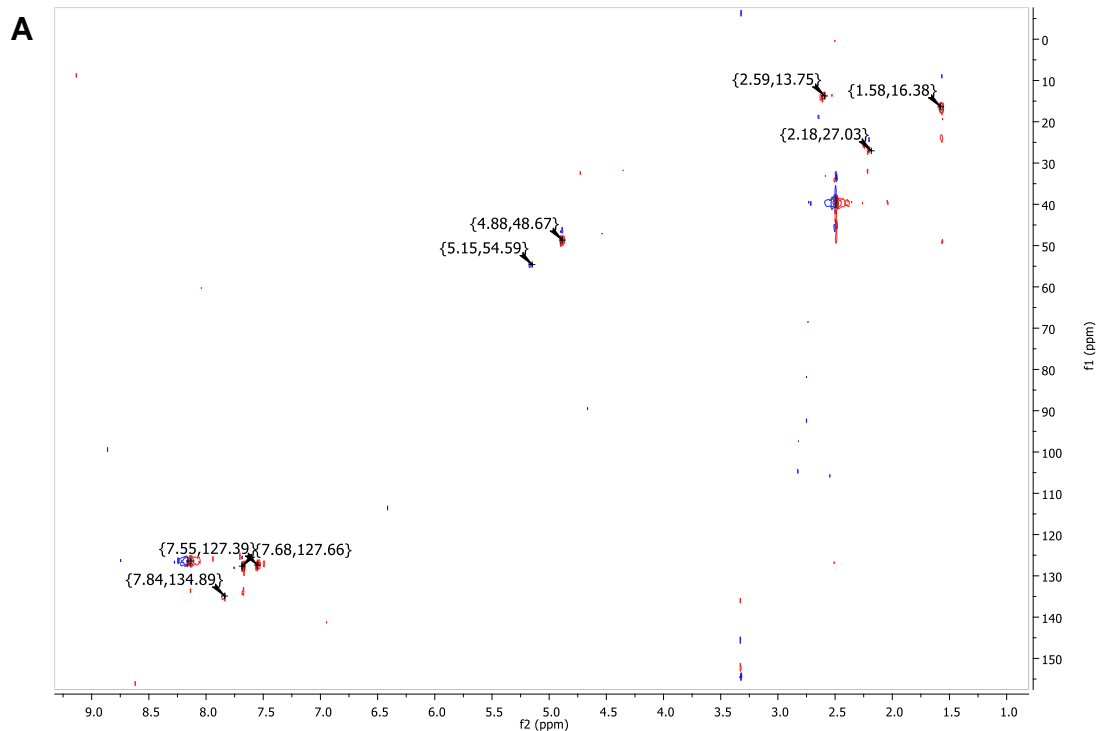
## APÊNDICE P

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e mapa de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (B) da substância CLV H p2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



## APÊNDICE Q

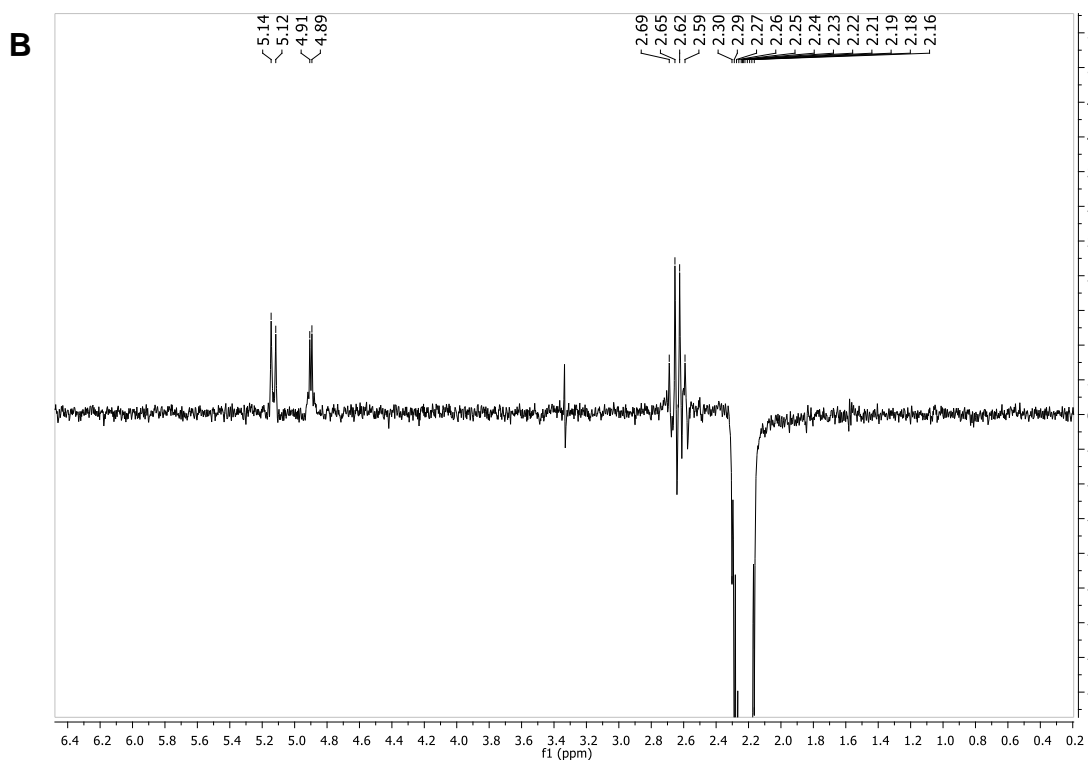
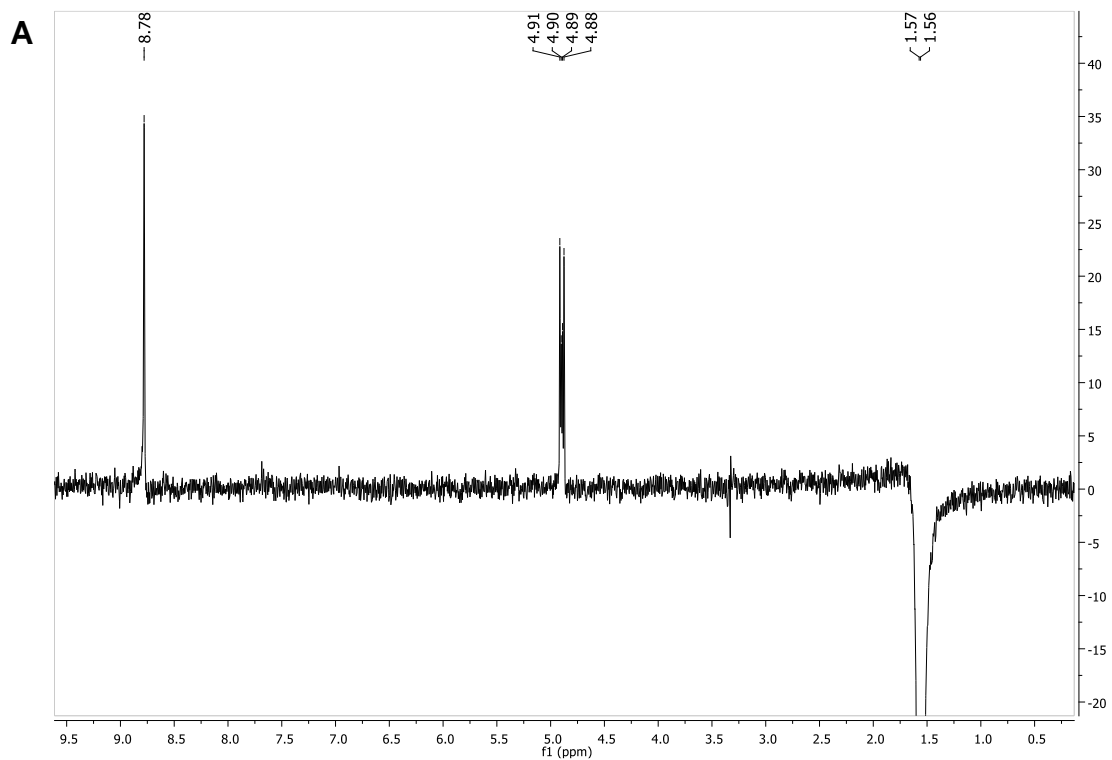
Mapas de contorno HSQC (A) e HMBC (B) da substância CLV H p2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )





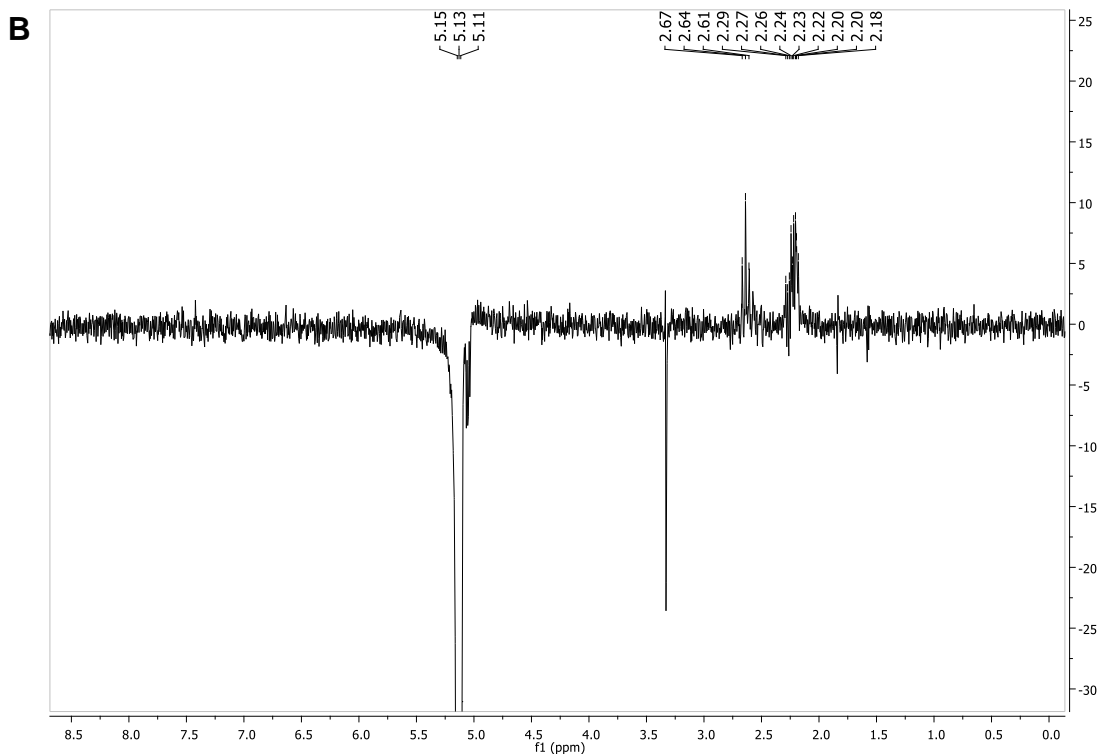
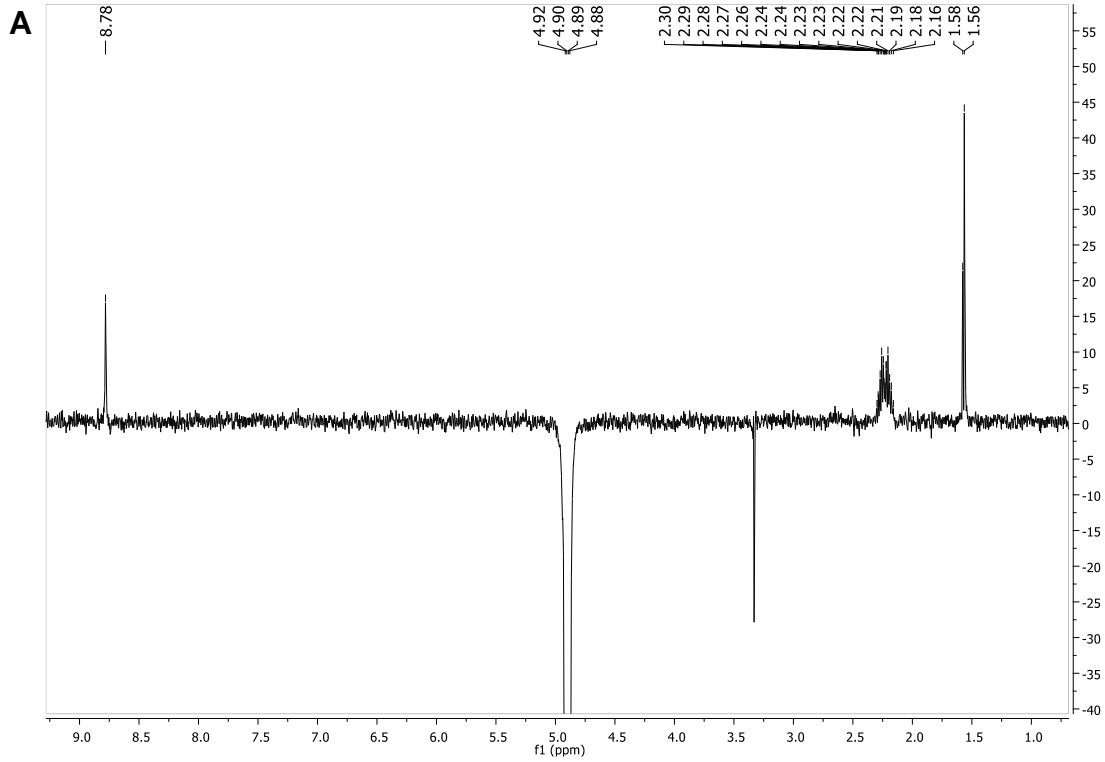
## APÊNDICE R

Espectros de NOE dos prótons com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  1,57 (A) e 2,24 ppm (B) da substância CLV H p2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



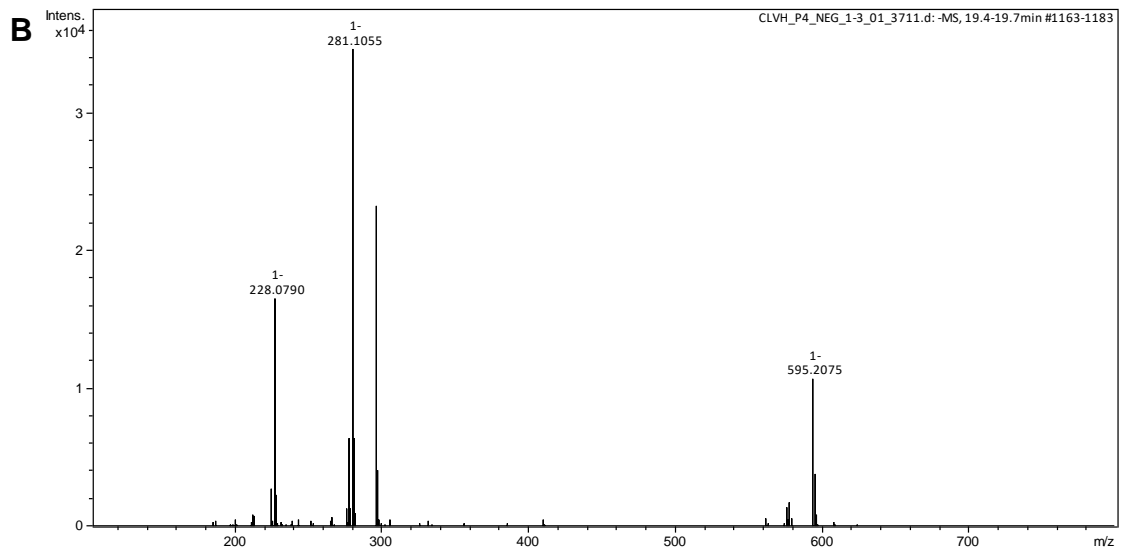
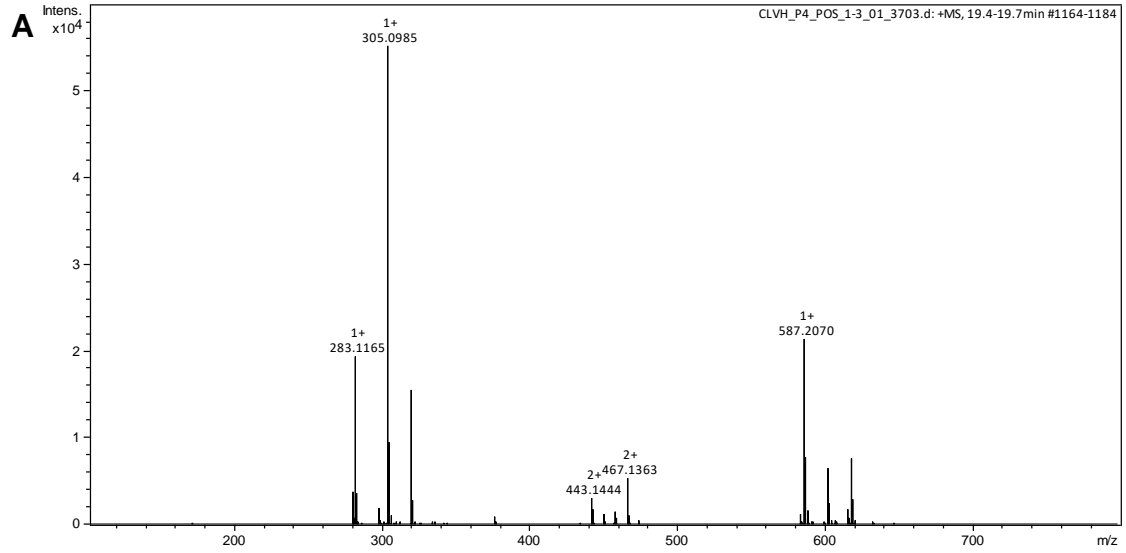
## APÊNDICE S

Espectros de NOE dos prótons com deslocamento em  $\delta_{\text{H}} 4,90$  (**A**) e 5,13 ppm (**B**) da substância CLV H p2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



## APÊNDICE T

EM em alta resolução obtido para a substância CLV H p2 em modo positivo (A) e negativo (B)



**APÊNDICE U**

Espectro de absorção UV obtido via CLAE-DAD para a substância CLV H p1 (**A**) e CLV H p2 (**B**)

