

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ANA CAROLINA JORDÃO

**Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e
imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga
*Phaeurus antarcticus***

Ribeirão Preto
2020

ANA CAROLINA JORDÃO

**Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e
imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga
*Phaeurus antarcticus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hosana Maria
Deboni

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 29/06/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2020

RESUMO

JORDÃO, A.C. **Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga *Phaeurus antarcticus***. 2020. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O ambiente marinho é vasto e apresenta uma enorme biodiversidade, onde organismos se adaptaram de forma excelente à situação extrema do ecossistema. Essa biodiversidade adaptada às condições inóspitas resultou em compostos químicos diferenciados e de grande importância para a medicina humana. Vários fármacos de origem marinha já se encontram no mercado farmacêutico, e muitos candidatos se encontram em testes clínicos e pré-clínicos. O continente Antártico também é um ambiente extremo inóspito. O interesse aos organismos antárticos em particular vem crescendo devido às suas habilidades de sobreviver neste ambiente severo. Em virtude disso, o presente trabalho teve como objeto de estudo o fungo *Arthrinium* sp. endofítico da alga antártica *Phaeurus antarcticus*, com o objetivo de isolar e identificar metabólitos secundários e avaliá-los quanto ao potencial fotoprotetor e de modulação de produção de ERO por neutrófilos. Cinco substâncias foram isoladas, entre elas três xantonas já relatadas como sendo produzidas por espécies de *Arthrinium*: a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona, a 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona e a 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona; e outras duas substâncias com relato inédito nesta espécie de fungo: o álcool 3-hidroxibenzílico e a 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina. As substâncias E.p5 e F.p8 mostraram um efeito de absorção na faixa do UV potencial, assim como o extrato e algumas frações. Com isso, conclui-se que o fungo *Arthrinium* sp. é uma ótima fonte de novos produtos naturais, e estudos mais aprofundados são necessários para descoberta de metabólitos novos e bioativos, não descartando o seu potencial efeito fotoprotetor e de modulação na produção de ERO.

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos, Continente Antártico, Fungos endofíticos, Atividade biológica, *Arthrinium* sp.

ABSTRACT

JORDÃO, A.C. **Chemical prospecting and study of the photoprotective and immunomodulatory potential of the endophytic fungus *Arthrinium* sp. isolated from the seaweed *Phaeurus antarcticus*.** 2020. 113s. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The marine environment is wide and has an enormous biodiversity, where organisms have excellently adapted to the extreme circumstances of the ecosystem. This biodiversity adapted to inhospitable conditions that resulted in distinct chemical compounds and of great importance for human medicine. Several drugs from marine origin are already in the pharmaceutical market, and many candidates are in clinical and pre-clinical tests. The Antarctic continent is also an extreme and inhospitable environment. Interest in Antarctic organisms in particular, has been growing due to their ability to survive in this severe environment. Due to the exposed, the present study had as object the fungus *Arthrinium* sp. endophytic of the Antarctic seaweed *Phaeurus antarcticus*, with the objective of isolating and identifying secondary metabolites and evaluating them for the photoprotective potential and modulation of ROS production by neutrophils. Five substances were isolated, including three xanthenes already reported to be produced by species of *Arthrinium*: 2,3,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone, 2,3,4,6,8-pentahydroxy-1-methylxanthone and 3,6,8-trihydroxy-1-methylxanthone; and two other substances with unprecedented reports in this species of fungus: 3-hydroxybenzyl alcohol and 6,8-dihydroxy-3- (2-hydroxypropyl) isocoumarin. The substances E.p5 and F.p8 showed a potential UV absorption effect, as well as the extract and some fractions. Thus, it is concluded that the fungus *Arthrinium* sp. is a great source of new natural products, and further studies are needed to discover new and bioactive metabolites, not discarding its potential photoprotective and modulation of the production of ROS effects.

Keywords: Marine natural products, Antarctic Continent, Endophytic fungi, Biological activity, *Arthrinium* sp.

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Produtos naturais marinhos

Os mares e oceanos recobrem mais de 70% da superfície terrestre e representam uma fonte de grande biodiversidade (PANGESTUTI et al., 2018). No entanto, menos de 5% dos oceanos foi explorado. Os ecossistemas marinhos proporcionam um ambiente severo, caracterizado por alta pressão, alta salinidade, baixos níveis de nutrientes e condições de alta ou baixa temperatura e alta ou baixa luz natural (LI et al., 2020; NEWMAN e CRAGG, 2016). Para se adaptarem a estas condições, os organismos marinhos deram origem a metabólitos secundários com grande diversidade química, tornando os oceanos uma importante fonte de produtos naturais com bioatividades de grande interesse para a descoberta de novos medicamentos. Uma peculiaridade do ambiente marinho é, também, a presença de organismos sésseis, ou seja, que não possuem mecanismos de locomoção, como algas, esponjas e cnidários, desenvolvendo, portanto, um sistema de defesa químico. Tudo isso, então, culminou em uma diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários de vários tipos de classes, que despertam o interesse de muitos pesquisadores de produtos naturais (LI et al., 2020).

Olhando através de uma perspectiva histórica, o “Púrpura Tíria”, um corante retirado de um molusco mediterrâneo que fora utilizado nos tempos romanos, apresentou uma atividade significativa contra células cancerígenas, sendo assim utilizado para tratamento de leucemia na medicina chinesa tradicional. Além deste, um dos primeiros relatos de metabólitos secundários originados de invertebrados marinhos é a toxina conhecida como nereistoxina provinda do verme marinho *Lumbrineris brevicirra*. Pescadores japoneses já conheciam há anos a propriedade inseticida do verme (NEWMAN e CRAGG, 2016). Em 1934, Nitta isolou este ativo e a estrutura foi proposta por Okaichi e Hashimoto em 1962. Em 1965 foi reportada a síntese total do composto por Hagiwara e colaboradores (HAGIWARA et al., 1965; NEWMAN e CRAGG, 2016). A substância mostrou-se uma antagonista da acetilcolina. Nos anos seguintes sua estrutura foi utilizada como base para o desenvolvimento do análogo Padan®, comercializado pela empresa Takeda (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Deve ser mencionado ainda outro relato importante, que é a identificação feita por Bergmann, em 1950, dos nucleosídeos bioativos contendo arabinose espongotimidina e espongouridina ambos isolados da esponja proveniente do Caribe *Tethya crypta*. Esta identificação é diretamente relacionada ao desenvolvimento do fármaco Ara-C, pois sem o relato da arabinose substituindo a ribose ou a desoxirribose, a substância seria um componente comum dos ácidos nucleicos. O fármaco antiviral Ara-A, sintetizado e comercializado pela

Glaxo SmithKline, também está relacionado com esta descoberta, pois também foi baseado na substituição por arabinose. A substância adenosina arabinose (Ara-A) foi, mais tarde, isolada do coral mediterrâneo *Eunicella cavolini* (NEWMAN e CRAGG, 2016). Através de décadas de estudos em instituições de pesquisa e em indústrias farmacêuticas, vários fármacos derivados de organismos marinhos alcançaram com sucesso o mercado, exemplos são mostrados na figura 1. Entre os exemplos, cinco são utilizados no tratamento do câncer (LIANG et al., 2019).

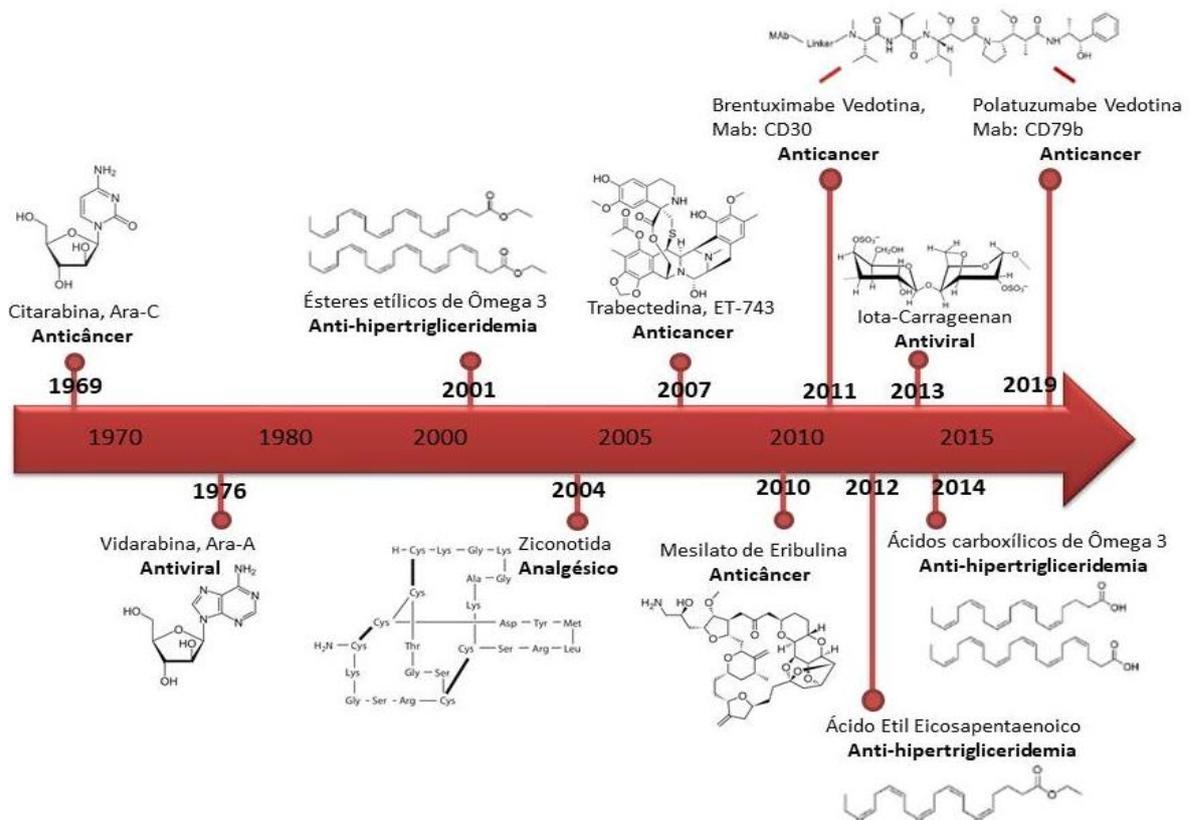
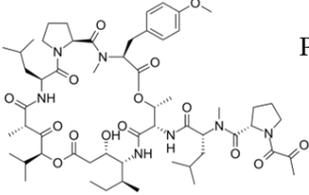
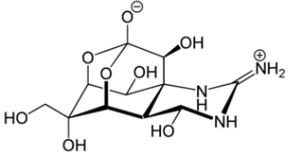
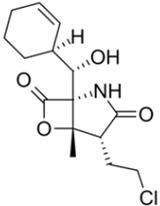


Figura 1: Linha do tempo de fármacos aprovados provindos de organismos marinhos. Adaptado de LIANG et al., 2019.

Mais de vinte Produtos Naturais Marinhos (PNMs) candidatos a se tornarem fármacos aprovados estão sob investigações em diferentes fases de testes clínicos, alguns exemplos se encontram na tabela 1. Além disso, há uma abundância de substâncias em avaliações pré-clínicas com a finalidade de desenvolvimentos para várias aplicações (LIANG et al., 2019).

Tabela 1: Exemplos de substâncias em fase clínica derivadas de organismos marinhos.

Substância	Fase Clínica	Origem	Atividade
 Plitdepsina	Fase III	Tunicado <i>Aplidium albicans</i>	Anticâncer
 Tetrodotoxina	Fase III	Peixes da família Tetraodontidae	Analgésico contra dores relacionadas ao câncer
 Salinosporamida A	Fase II	Bactérias do gênero <i>Salinispora</i>	Anticâncer

Fonte: (LIANG et al., 2019).

1.2. Fungos associados a algas marinhas antárticas

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, através de um fungo do gênero *Penicillium*, é um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX. Essa descoberta abriu o caminho a novos investimentos científicos e, conseqüentemente, à descoberta de novos fármacos, estimulou a investigação de substâncias dessa fonte, os fungos e, acima de tudo, proporcionou a cura de patologias infecciosas para as quais não havia qualquer terapêutica medicamentosa eficaz (PEREIRA, 2005).

A Antártica, figura 2, possui um dos ecossistemas mais primitivos e severos do planeta. Isso se deve às baixas temperaturas, baixos níveis de nutrientes orgânicos, baixa disponibilidade de água, ventos fortes e alta incidência de raios UV. Porém, mesmo sob as condições mencionadas, comunidades de algas e de microrganismos prosperam. As algas marinhas são as principais produtoras primárias do litoral e do infralitoral da Antártica. Elas cobrem aproximadamente 30% da superfície inferior dos mares. Essas comunidades são caracterizadas por um alto grau de endemismo e pela presença de espécies adaptadas ao frio, sendo mais comuns neste ambiente as algas pardas e vermelhas (OGAKI et al., 2019).

Numerosas espécies de fungos foram descritas em associação com as algas marinhas podendo ter relações parasíticas, saprofíticas ou endofíticas. Esses organismos são conhecidos coletivamente como “fungos algícolas” e são relativamente inexplorados, porém com grande potencial metabólico. O interesse aos fungos antárticos em particular vem crescendo devido à capacidade de sobrevivência no ambiente severo da antártica, o que sugere presença de rotas biossintéticas incomuns e promissoras, que poderia conduzir a novos compostos bioativos (OGAKI et al., 2019).

No estudo de Godinho e colaboradores (2013) foram reportadas duas espécies distintas do gênero *Penicillium* isoladas de macroalgas antárticas. De acordo com os autores, os extratos apresentaram uma atividade antifúngica alta e seletiva contra o fungo patógeno de plantas *Cladosporium sphaerospermum* e atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi*, o causador etiológico da doença de Chagas. O espectro de RMN sugeriu presença de compostos aromáticos altamente funcionalizados (GODINHO et al., 2013; OGAKI et al., 2019). O trabalho de Furbino e colaboradores (2014) também relatou fungos algícolas capazes de produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica seletiva contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *C. sphaerospermum*. Além disso, o estudo demonstrou a capacidade do fungo *Penicillium steckii* isolado da alga *Monostroma hariotii* em produzir substâncias antivirais que inibiram a proliferação do vírus causador da febre amarela (FURBINO et al., 2014; OGAKI et al., 2019).

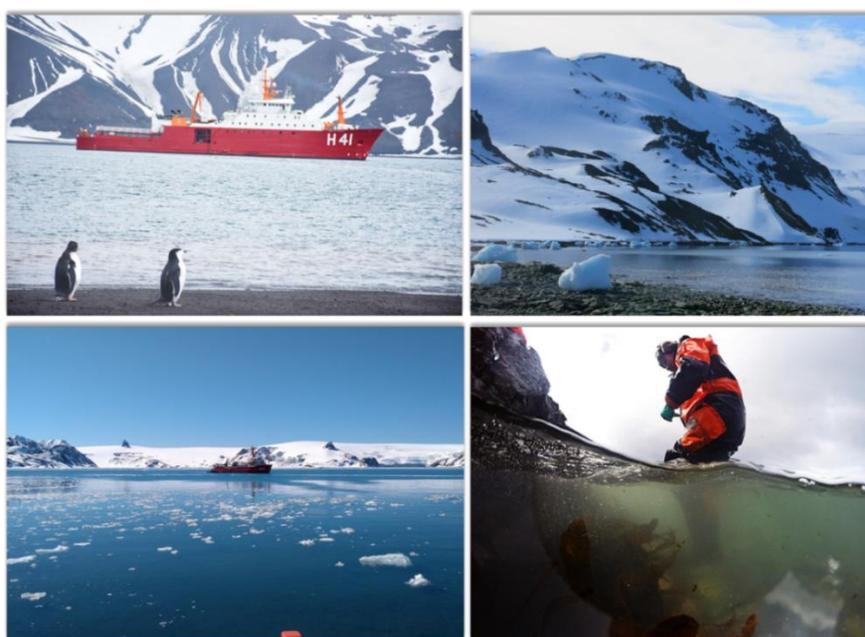


Figura 2: As paisagens do Continente gelado, a Antártica, e a pesquisa desenvolvida durante a OPERANTAR XXXVI, 2017. Fotos por: Gustavo Souza dos Santos.

1.3. O gênero *Arthrinium*

O gênero *Arthrinium* foi reportado como sendo cosmopolita, ocorrendo em vários habitats e em ambos ambientes terrestre e marinho. O fungo *Arthrinium* sp. marinho é mais comumente citado como endofítico de algas marinhas, especialmente algas pardas (HEO et al, 2018). Fungos endofíticos são membros funcionais e essenciais de uma planta ou alga, fazendo parte de sua microbiota e não causando nenhum dano visível ou sintomas de doenças. Esta interação é classificada como uma simbiose. As plantas e algas habitadas por fungos endofíticos apresentam um vigor vegetativo aumentado, melhores defesas contra fungos invasivos e contra vários patógenos. Em troca, os endófitos residentes ganham um nicho ecológico específico, acesso a nutrientes e proteção contra estresses e dessecação (FURTADO et al., 2019)

Atualmente, 98 espécies do gênero *Arthrinium* foram relatados no Mycobank (2020). O gênero já foi reportado como produtor de muitos compostos naturais, como, por exemplo, arthronas, arthrichitinas, terpestacina, norlichexantona, mirocinas, libertellenonas, spiroarthrinols e griseofulvina. Entretanto, um número limitado de substâncias bioativas (tabela 2) foram relatadas, devido a número reduzido de estudos. Com isso, sugere-se que o fungo *Arthrinium* sp. possui grande potencial para produzir vários compostos bioativos, muitos dos quais ainda não foram descritos (HEO et al, 2018).

Tabela 2: Exemplos de substâncias bioativas isoladas de fungos do gênero *Arthrinium*.

METABÓLITO(S)	ESPÉCIE	BIOATIVIDADE(S)	REFERÊNCIA
Arthpironas (F-I) Apiosporamida	<i>Arthrinium</i> sp.	Antibacteriana	BAO et al., 2018
Arthpironas (A-C)	<i>Arthrinium arundinis</i>	Citotóxica Inibição de acetilcolinesterase	WANG et al., 2015
Arthrininas (A-D)	<i>Arthrinium</i> sp.	Antitumoral Antiproliferativa	EBADA et al., 2011
Decarboxiidroxicitrinona Mirocina A Libertellenona C	<i>Arthrinium</i> sp.	Antiangiogênica	BAO et al., 2018

Meleina <i>Cis</i> -(3R,4R)- hidroximeleina	<i>Arthrinium</i> sp.	Esquistossomicida	RAMOS et al., 2013
Arthona C 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1- metilxantona	<i>Arthrinium</i> sp.	Antioxidante (DPPH, ABTS)	BAO et al., 2018

Em virtude das informações citadas anteriormente, o fungo *Arthrinium* sp., isolado da alga marinha *Phaeurus antarcticus*, coletada na ilha Greenwich - Antártica; foi objeto de nossos estudos visando a busca por metabólitos bioativos. Inicialmente, outro fungo foi também estudado juntamente com o fungo *Arthrinium* sp.: o *Epicoccum dendrobii*, também isolado da alga *Phaeurus antarcticus*.

1.4. A radiação UV e fotoproteção

O sol emite um espectro eletromagnético amplo em comprimentos de onda (figura 3), que compreendem entre 10⁻¹² nm (raios- γ) a 10⁴ nm (ondas de rádio) (BENEVENUTO, 2012). Entre todos, a luz ultravioleta é a mais prejudicial para a pele. A radiação ultravioleta (UVR) é dividida em três categorias dependentes dos comprimentos de onda: curtos ou UVC (200-280 nm), médios ou UVB (280-320 nm) e longos ou UVA (320-400 nm) (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).

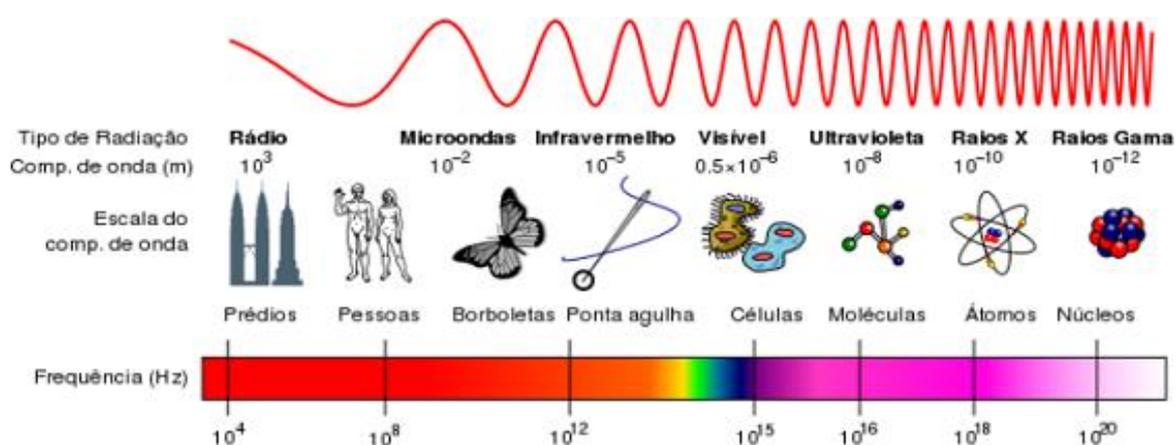


Figura 3: Espectro eletromagnético emitido pelo sol. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/9-ano/materia-e-energia-9-ano/ondas-eletromagneticas/a/o-espectro-eletromagnetico>. Acesso em 17 de fevereiro de 2020.

A radiação UVC é completamente absorvida na atmosfera terrestre pelas moléculas de oxigênio e ozônio. Os raios UVB compreendem apenas a 4-5% da radiação ultravioleta que atinge a terra e, por apresentarem um comprimento de onda menor, possuem maior frequência e maior energia. Isso faz com que os raios UVB sejam capazes de penetrar apenas nas camadas mais superficiais da pele, sendo responsáveis por causar queimaduras solares, câncer de pele e fotoenvelhecimento (BENEVENUTO, 2012). A radiação UVA representa mais de 90% dos raios UV totais a atingir a superfície do planeta, tendo capacidade de penetrar mais profundamente na pele humana, alcançando a epiderme e a derme, além de aumentar a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO). Exposição crônica aos raios UVA pode danificar as estruturas da derme, ocasionando em fotoenvelhecimento prematuro da pele causando flacidez e rugas (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Pode também produzir danos estruturais ao DNA, prejudicar o sistema imunológico e levar ao câncer (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).

A quantidade de radiação ultravioleta (UV) atingindo a superfície da Terra aumentou acentuadamente nos últimos anos (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013). Este fenômeno, adicionalmente ao excesso de exposição à radiação UV da luz solar, vem contribuindo ao aumento constante de distúrbios relacionados à pele humana (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

Para prevenir estes efeitos nocivos que os raios solares podem causar, a Academia Americana de Dermatologia recomenda o uso de chapéus/bonés, camisetas, óculos de sol, barracas, aplicação uniforme de protetores solares e evitar a exposição ao sol por longos períodos, principalmente entre 10-16 horas (MACIEL, 2016). A aplicação tópica de protetores solares é uma forma eficiente de proteção para a pele frente aos efeitos nocivos da radiação UV emitida pelo sol (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

A depleção da camada de ozônio levou à níveis aumentados de radiação ultravioleta a atingir toda a superfície terrestre, porém este fenômeno é mais pronunciado na Antártica principalmente na primavera, onde houve um aumento da radiação UV de 130% desde 1980 (RUHLAND et al., 2005). Os organismos habitantes dessa região, portanto, necessitam de algum tipo de fotoproteção para a sobrevivência (AVILA et al., 2015).

Sendo assim, é promissora e justificada a procura de substâncias fotoprotetoras em organismos de origem Antártica.

1.5. Produtos naturais como fotoprotetores

Os ativos fotoprotetores são classificados em duas categorias amplas baseado em seu mecanismo de ação: inorgânicos e orgânicos. Agentes inorgânicos são partículas inertes que refletem os fótons de ambos raios UVA e UVB da superfície da pele. Porém, essas partículas são comumente visíveis, o que causa um efeito visual cosmeticamente indesejável. São tipicamente presentes em protetores solares inorgânicos o óxido de zinco e o dióxido de titânio. Os ativos orgânicos são comumente compostos aromáticos conjugados com um grupamento carbonílico, o que permite que a molécula absorva os raios UV. Exemplos de fotoprotetores comercializados são oxibenzona, sulisobenzona e octilmetoxicinamato, mostrados na figura 4. Essas moléculas, entretanto, podem ser ativadas pela radiação UV, resultando em produtos fotossensibilizantes que podem causar efeitos adversos na pele como alergias e inflamações (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

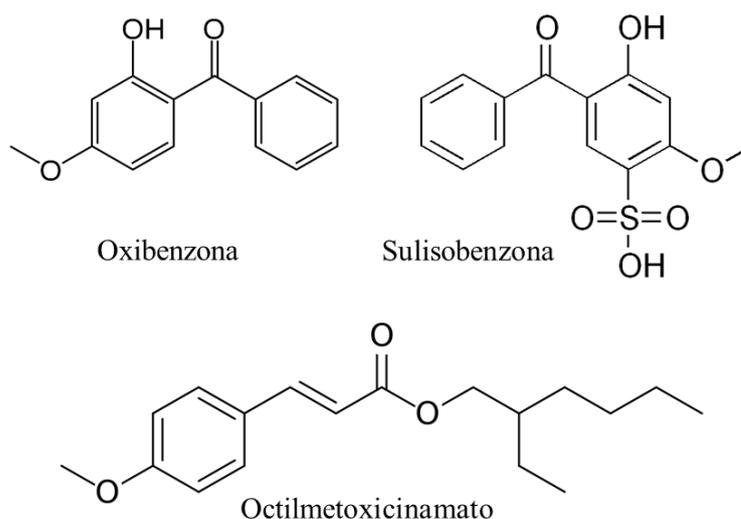


Figura 4: Ativos orgânicos utilizados em formulações fotoprotetoras.

Diversos organismos, especialmente aqueles expostos a radiações UV intensas, desenvolveram vários mecanismos fotoadaptativos incluindo produção de metabólitos antioxidantes e capazes de absorver raios UV (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Essas substâncias naturais receberam uma atenção considerável a fim de seu uso para fotoproteção e redução do dano causado pelos raios solares. Exemplos desses produtos são as scitoneminas, exclusivas de cianobactérias; micosporinas, encontradas em fungos; aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), encontrados em cianobactérias, algas e animais e os fenilpropanóides e

flavonoides, facilmente encontrados em plantas complexas (PALLELA et al., 2010). Alguns ativos fotoprotetores importantes derivados de organismos marinhos são mostrados na figura 5. Um estudo realizado em colaboração com nosso grupo de pesquisa, demonstra a utilização tópica da fucoxantina, um carotenoide comum em algas marinhas, utilizando-se de métodos *in vitro* para avaliar o seu potencial fotoprotetor e sua capacidade fototóxica, mostrando que a substância aumenta a capacidade de absorção da luz UV de protetores solares em 72%, além de diminuir a produção de ERO (TAVARES et al., 2020).

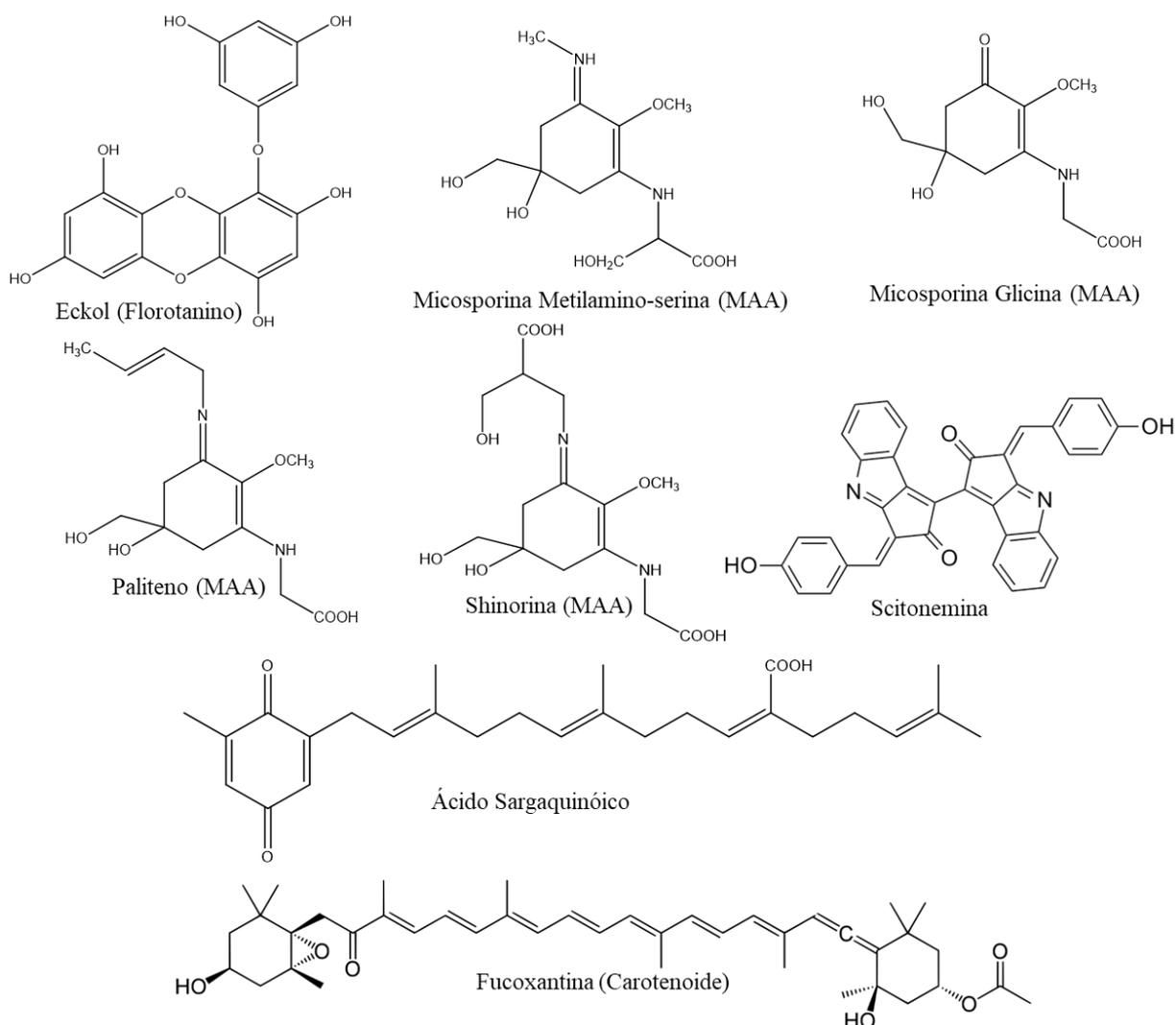


Figura 5: Substâncias fotoprotetoras isoladas de organismos marinhos. Adaptado de PALLELA et al., 2010.

A busca por novas substâncias com capacidade fotoprotetora, principalmente as de origem natural, é importante devido a demonstrações em estudos científicos de alguns problemas ocasionados pelas substâncias utilizadas atualmente em formulações de protetores solares. Preocupações sobre a segurança da oxibenzona, um dos ativos mais utilizados em

produtos fotoprotetores, surgiram após relatos de casos de dermatites de contato causadas por alergia e fotoalergia referente ao composto. A oxibenzona também mostrou ser um contaminante ambiental potente, pois estudos demonstraram que a substância não é totalmente eliminada durante o tratamento de água. O produto e seus metabólitos foram detectados em peixes, que demonstraram efeitos antiandrogênicos e antiestrogênicos (LIM et al., 2017). Além disso, como mostrado no estudo de Danovaro et al. (2008), os fotoprotetores orgânicos estão danificando recifes de corais, causando branqueamentos (figura 6), liberação de zooxantelas e infecções virais. O impacto causado pelos fotoprotetores pode ser crucial no habitat de recifes de corais com baixa renovação de água e alta taxa de visitação de turistas (DANOVARO et al., 2008) e, por isso, os arquipélagos Havaí (EUA) e Palau decretaram recentemente leis proibindo o uso de formulações fotoprotetoras contendo substâncias químicas que podem ser prejudiciais à vida marinha local (RAFFA et al., 2018; G1, 2020).



Figura 6: Imagens mostrando o branqueamento do coral *Acropora divaricata* causado por fotoprotetores após 24 horas de exposição. As imagens correspondem, na ordem da esquerda para a direita, ao controle, ao coral exposto a fotoprotetores incubado a 28° C e ao coral incubado a 30° C, também com exposição às formulações. Fonte: DANOVARO et al., 2008.

1.6. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos

Os neutrófilos são amplamente reconhecidos por desempenhar um papel importante nas respostas inflamatórias agudas, além de demonstrarem um papel na modulação inflamatória crônica e doenças autoimunes (CHEN et al., 2016). São os primeiros leucócitos a serem recrutados para um tecido lesionado ou infectado. Estas células têm um potencial para gerar moléculas com atividades microbicida e oxidante, que são importantes para a eliminação dos patógenos. Adicionalmente, os neutrófilos sintetizam e secretam mediadores inflamatórios,

para amplificar e regular a resposta inflamatória. Estas propriedades fazem dos neutrófilos as principais células do processo inflamatório agudo. A fagocitose, a degranulação, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a liberação de redes formadas por DNA, proteínas e enzimas digestivas (NETs, armadilhas extracelulares dos neutrófilos) são as principais atividades biológicas dos neutrófilos responsáveis pela eliminação dos patógenos (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; DINAUER, 2019).

Em particular, a produção de ERO resulta do metabolismo oxidativo do neutrófilos, que é mediado pelo complexo enzimático NADPH oxidase e pelas enzimas dos grânulos citoplasmáticos. Normalmente o arsenal tóxico produzido pelos neutrófilos é liberado no ambiente intracelular no fagolisossomo sobre o alvo internalizado. A importância do neutrófilo em controlar a infecção na fase inicial é evidente em pacientes com neutropenia (diminuição do número de neutrófilos), que resulta na dificuldade de conter a disseminação do patógeno, podendo desenvolver sepse, bem como em pacientes com deficiência da atividade da NADPH oxidase, os quais são mais suscetíveis às infecções causadas por microrganismos. Ao contrário, em processos inflamatórios crônicos, a ativação exacerbada dos neutrófilos pode resultar em exposição dos tecidos do hospedeiro às moléculas oxidantes e enzimas proteolíticas, levando à lesão tecidual mediada pela resposta imune. Desta forma, a ativação inadequada ou excessiva de neutrófilos resulta em danos ao hospedeiro (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; DINAUER, 2019). Assim, o recrutamento e a ativação dos neutrófilos podem ser alvos terapêuticos para diferentes condições clínicas, nas quais o papel anti-inflamatório dos neutrófilos possa ser controlado de modo a restringir os efeitos deletérios de uma resposta excessiva sem prejudicar sua função para a eficiência da resposta imune.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo inicial o estudo do potencial químico e biológico de dois fungos: *Epicoccum dendrobii* e *Arthrinium* sp., ambos isolados a partir da alga Antártica *Phaeurus antarcticus*. A partir destes dados, o fungo *Arthrinium* sp. foi selecionado para o prosseguimento do projeto de pesquisa. Assim, efetivou-se o isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo e também avaliação do efeito fotoprotetor e de modulação da produção de ERO por neutrófilos do extrato, frações e substâncias isoladas. Foram realizados experimentos preliminares com o objetivo de determinar melhores condições para produção qualitativa de metabólitos secundários do fungo *Arthrinium* sp. Com isso, pôde-se concluir que um melhor potencial fotoprotetor do extrato foi obtido com crescimento do fungo realizado em meio CBD em um período de cultivo de 14 dias.

O fungo *Arthrinium* sp. já havia se mostrado como sendo uma fonte promissora de metabólitos com uma diversidade de atividades biológicas (vide item 1.3). Neste estudo foram isoladas 3 xantonas já relatadas como sendo produzidas por espécies de *Arthrinium* e consideradas bioativas, principalmente como antioxidantes (ABDEL-LATEFF et al., 2002): a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona, a 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona e a 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona. As xantonas apresentaram fraca atividade quanto à fotoproteção, foco deste trabalho.

Além das xantonas, outras duas substâncias foram isoladas do extrato de *Arthrinium* sp., com relato inédito nesta espécie de fungo: o álcool 3-hidroxibenzílico, encontrado em outras espécies de fungo como o *Penicillium novae-zeelandiae* (ALFARO et al., 2003) e o *Aspergillus nidulans* (KUMAR et al., 2017); e a isocumarina 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina, relatada como sendo produzida pelos fungos *Ceratocystis fimbriata coffea* (GREMAUD et al., 1994) e *Drechslera siccans* (HALLOCK et al., 1988). Estas substâncias não apresentaram atividade potencial para fotoproteção.

Embora as substâncias isoladas e identificadas apresentaram uma absorvância fraca na faixa de interesse do UV, o fungo *Arthrinium* sp. não deve ser descartado como um possível produtor de substâncias para a finalidade de fotoproteção, visto que o extrato e frações apresentaram boa atividade e algumas substâncias isoladas também mostraram um potencial efeito fotoprotetor (E.p5 e F.p8), porém estas ainda estão em processo de identificação. As frações também mostraram boa atividade quanto à modulação da produção de ERO por neutrófilos, porém as substâncias isoladas ainda não foram testadas devido à baixa quantidade de amostra obtida.

Com isso, conclui-se que o fungo estudado *Arthrinium* sp. é uma fonte rica de metabólitos secundários e mais estudos são necessários para descoberta de substâncias novas e promissoras para atividades biológicas, tendo o fungo se mostrado um potencial produtor de metabólitos secundários ativos nos ensaios de fotoproteção e de modulação da produção de ERO.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEFF A., et al. Two New Xanthone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Wardomyces anomalus*. **Journal of Natural Products** 2002; 66: 706.

ALFARO C., et al. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. **Mutation Research** 2003; 539: 187.

ALVES C. M. O. S., et al. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta** 2003; 60: 601.

ANDRADE M. Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares. 63p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

AVILA C., NUNEZ P. L. Natural products mediating ecological interactions in Antarctic benthic communities: A Mini-Review of the Known Molecules. **Natural Products Reports** 2015; 32: 1114.

BAO J., et al. Bioactive pyridone alkaloids from a deep-sea-derived fungus *Arthrimum* sp. Ujnmf0008. **Marine Drugs** 2018; 16: 174.

BAO J., et al. New chromones from a marine-derived fungus *Arthrimum* sp., and their biological activity. **Molecules** 2018, 23: 1982.

BENEVENUTO C. G. Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A. 108p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2012.

CHEMSPIDER. Disponível em: www.chemspider.com, acesso em: 01/06/2020.

CHEN C-Y., et al. Marine Natural Product Inhibitors of Neutrophil-Associated Inflammation. **Marine drugs** 2016; 14: 141.

DANOVARO R., et al. Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. **Environmental Health Perspective** 2008; 116: 441.

DE FELÍCIO R. Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados. 207 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

DINAUER M. C. Inflammatory consequences of inherited disorders affecting neutrophil function. **Blood Epub** 2019;133(20): 2130.

EBADA S. S., et al. Arthrinins a–d: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrinium* sp. **Bioorganic Medicinal Chemistry** 2011; 19: 4644.

ERBERT, C., et al. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. **Botanica Marina** 2012; 55: 435.

FURBINO, L., et al. Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biology** 2018; 41: 527.

FURTADO B. U., SZYMAŃSKA S., HRYNKIEWICZ K. A window into fungal endophytism in *Salicornia europaea*: deciphering fungal characteristics as plant growth promoting agentes. **Plant Soil** 2019; 445: 577.

G1, BBC. Por que um país inteiro proibiu protetores solares. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/natureza/noticia/2020/01/01/por-que-um-pais-inteiro-proibiu-protetores-solares.ghtml>. Acesso em: 28/05/2020.

GASPAR L. R., MAIA CAMPOS P. M. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics** 2006; 307(2): 123.

GREMAUD G. e TABACCHI R. Isocoumarins of the Fungus *Ceratocystis fimbriata* coffea. **Natural Product Letters** 1994; 5: 95.

GODINHO V. M., et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME** 2013; 7: 77.

HAGIWARA H., et al. Synthesis of nereistoxin and related compounds. **Chem Pharm Bull** 1965; 13: 253.

HALLOCK Y. F., et al. De-o-methyldiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. **Phytochemistry** 1988; 27(10): 3123.

HEO Y. M., et al. Diversity and Ecology of Marine Algicolous *Arthrinium* Species as a Source of Bioactive Natural Products. **Marine Drugs** 2018; 16(12): 508.

KOLACZKOWSKA E., KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology** 2013; 13(3): 159.

KULLAVANIJAYA P. e LIM H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2005; 52(6): 937.

KUMAR C. G., et al. Biological evaluation of 3-hydroxybenzyl alcohol, an extrolite produced by *Aspergillus nidulans* strain KZR-132. **Journal of Applied Microbiology** 2017; 122(6): 1518.

LI G., DICKSCHAT J. S., GUO Y-W. Diving into the world of marine 2,11-cyclized cembranoids: a summary of new compounds and their biological activities. **Natural Products Reports** 2020; Advance Article.

LIANG X., DANMENG L., HENDRIK L. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research** 2019; 147: 104373.

LIM H. W., et al. Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2017; 76(3, 1): 91.

MACIEL O. M. C. Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium* associado à alga marinha *Bostrychia radicans*. 88p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

MAIA J. G. S., ANDRADE E. H. A., ZOGHBI M. G. B. Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis** 2000; 13(3): 227.

Mycobank Database. <http://www.mycobank.org/>. Acesso em 17/02/2020.

NEWMAN D. J., CRAGG G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". **Planta Medica** 2016; 82(09/10): 775.

NOGUEIRA P. C. de L., et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry** 2001; 56(5): 443.

OGAKI M. B., et al. Marine Fungi Associated with Antarctic Macroalgae. In: Castro-Sowinski S. (eds) *The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment*. **Springer Polar Sciences** 2019; Springer, Cham.

PALLELA R., NA-YOUNG Y., KIM S-K. Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms. **Marine Drugs** 2010; 8: 1189.

PALMEIRA Jr S. F., et al. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal** 2004; 19: 69.

PANGESTUTI R., SIAHAAN E. A., KIM S-K. Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. **Marine Drugs** 2018; 16(11): 399.

PEREIRA A. L., PITA J.R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras, HISTÓRIA** 2005. 6: 129.

RADULOVIC N., BLAGOJEVIC P., PALIC R., Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). **Molecules** 2010; 15(9): 6168.

RAFFA R. B., et al. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** 2019; 44:134.

RAMOS H. P. Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. 117p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2013.

RAMSEY J. D., et al. Gas-liquid chromatographic retention indices of 296 non-drug substances on SE-30 or OV-1 likely to be encountered in toxicological analyses. **Journal of Chromatography** 1980; 184(2): 185.

RUHLAND C. T., et al. The Influence of Ultraviolet-B Radiation on Growth, Hydroxycinnamic Acids and Flavonoids of *Deschampsia antarctica* during Springtime Ozone Depletion in Antarctica. **Photochemistry and Photobiology** 2005; 81: 1086.

SAEWAN N. and JIMTAISONG A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 2013; 3(09): 129.

SAEWAN N. and JIMTAISONG A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology** 2015; 14: 47.

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*. 148p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

TAVARES R. S. N. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by in vitro. **Antioxidants** 2020 9(4): 328.

TEIXEIRA T. R., et al. Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Polar Biology** 2019; 42: 1431.

WANG J., et al. Arthopyrones A–C, Pyridone Alkaloids from a Sponge-Derived Fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3. **Organic Letters** 2015; 17: 656.

ZAIKIN V. G. e BORISOV R. S. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fishcer-Tropsch synthesis products. **Journal of Analytical Chemistry USSR** (English Translation) 2002; 57(6): 544.