



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Ana Claudia Oliveira de Freitas

**ANÁLISE BIOGUIADA ANTILEISHMANIA E ANTICÂNDIDA DE EXTRATOS  
TOTAIS E FRACIONADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS  
DE MANGUE DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Florianópolis, 2023

Ana Claudia Oliveira de Freitas

**ANÁLISE BIOGUIADA ANTILEISHMANIA E ANTICÂNDIDA DE EXTRATOS  
TOTAIS E FRACIONADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS  
DE MANGUE DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis 2023

Oliveira de Freitas, Ana Claudia

ANÁLISE BIOGUIADA ANTILEISHMANIA E ANTICÂNDIDA DE EXTRATOS TOTAIS E FRACIONADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MANGUE DA ILHA DE SANTA CATARINA / Ana Claudia Oliveira de Freitas ; orientador, Mário Steindel, coorientadora, Patricia Hermes Stoco, 2023.

106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Bioprospecção. 3. Produtos Naturais. 4. Leishmaniose. 5. Candidíase . I. Steindel, Mário . II. Hermes Stoco, Patricia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Ana Claudia Oliveira de Freitas

**ANÁLISE BIOGUIADA ANTILEISHMANIA E ANTICÂNDIDA DE EXTRATOS  
TOTAIS E FRACIONADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS  
DE MANGUE DA ILHA DE SANTA CATARINA**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, 29 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Flávio Henrique Reginatto  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Marcelo Maraschin  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Mário Steindel  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Dr. Mário Steindel  
Orientador(a)

Florianópolis, 2023

À Rosana Brandão de Oliveira, a pessoa que me ensinou que o conhecimento é uma  
dádiva e nunca nos pode ser tirado.

## AGRADECIMENTOS

Com profundo apreço, desejo expressar minha sincera gratidão a todas aquelas que compartilharam desta jornada acadêmica comigo. Quero destacar que esta mensagem de agradecimento vai além do reconhecimento das contribuições à minha formação profissional, mas também a influência que tiveram em minha evolução como ser humano.

À minha amada mãe, Rosana, merece um agradecimento imensurável. Sua presença e apoio foram fundamentais para enfrentar os desafios internos que por vezes tentaram minar meu progresso. Minha querida mãezinha, minhas palavras transbordam de gratidão e amor; obrigada por ser meu alicerce, tanto nos momentos bons quanto nos difíceis. Essa conquista é tão sua quanto minha.

À minha irmã e ao meu cunhado, Gabriela e Danilo, por todo o apoio, risada, passeios e acolhimento. Obrigada por fazerem parte da minha jornada

Aos meus orientadores, Mário Steindel e Patrícia Stoco, quero expressar minha profunda gratidão pelo apoio incansável, sabedoria compartilhada e paciência demonstrada ao longo desse período. Mário, não posso deixar de registrar a admiração que tenho por você como indivíduo e pesquisador. Ter sido orientada por você no início da minha jornada científica é uma honra que guardarei para sempre. Patrícia, minha "profe pati", minha admiração por você também é imensa. Obrigada por me acolher, por me mostrar que eu tenho capacidade e por desempenhar um papel crucial em minha evolução como pesquisadora e ser humano. Minha gratidão a você é eterna.

Ao professor Diogo, expressei minha sincera gratidão pelo conhecimento compartilhado, discussões envolventes e lições valiosas que me transmitiu. Sua crença em mim e em meu trabalho foi um ponto crucial que me impulsionou ao longo dessa jornada. Sua contribuição é inestimável.

Aos meus queridos "leishmigos" - Amábilli, Ana Paula, Beatriz, Carolina, Eric, Luiza, Laryssa e Vilmar - meu coração se enche de carinho por todos os momentos de companheirismo, risos, apoio mútuo, debates científicos, aventuras em bares e risadas compartilhadas.

À minha amiga Amanda, um grande obrigada, sua inspiração, apoio e nossas conversas sobre a vida foram um presente inestimável. Sua existência torna minha jornada mais leve e divertida, repleta de memórias, comidas deliciosas e festas. Te amo e te admiro.

À minha amiga Ariane, por sempre lembrar que a vida vale a pena ser vivida com emoção. Agradeço por ser uma ouvinte atenta e por sua ajuda constante. Você sempre será uma parte preciosa dos meus melhores momentos, te amo e te admiro.

À minha amiga Luize, obrigada por todo o apoio, conversas, cuidados e comidinhas.

Aos meus amigos André Felipe, Joana Camila e Isabela Maria com vocês a minha jornada foi mais completa e incrível, agradeço imensamente.

Ao meu amigo Diego por toda ajuda e companheirismo e ao Samuel por todo cuidado e carinho, tenho vocês no meu coração.

Aos professores do Laboratório de Protozoologia - Glauber, Patrícia Quaresma e Edmundo - expresso gratidão por suas conversas edificantes e ensinamentos que moldaram meu crescimento, tanto profissional quanto pessoal.

Aos colegas do laboratório - Helena, Luisa, Marilene, Mauren, Daniela, Dayane, Giovanna, Guilherme, Natalia, Vitória, Willian, Lucy, Mariana, Bibiana e Carime - saibam que suas presenças foram significativas em minha jornada.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial ao Tiago, Gabriella e Professor Sandjo, meu agradecimento pela paciência e pelo tempo dedicado, que foram essenciais na parte mais desafiadora da minha pesquisa.

A todas que, de alguma forma, contribuíram ao longo desta trajetória acadêmica, meu mais sincero reconhecimento.

À Universidade Federal de Santa Catarina, agradeço pela oportunidade e pelo espaço proporcionado para o desenvolvimento da minha pesquisa. Também expresso gratidão às

instituições de fomento CAPES, CNPQ e FAPESC, bem como ao programa de Biotecnologia e Biociências.

Que este registro de agradecimento reflita minha genuína apreciação por cada indivíduo e contribuição que moldaram minha jornada acadêmica.



“É necessário mais coragem para se opor à opinião predominante do que para estar em conformidade com ela.” - Margaret Cavendish

## RESUMO

A demanda por novos agentes antiparasitários e antifúngicos reflete a ausência de um repertório medicamentoso verdadeiramente eficaz. As terapias empregadas no combate às leishmanioses e as candidíases são antigas, apresentam efeitos colaterais e limitada efetividade terapêutica. Diante desse cenário, a bioprospecção emerge como uma abordagem promissora para busca de novas biomoléculas de interesse. O ecossistema de manguezal se destaca pela rica biodiversidade e pelas peculiares condições ambientais, oferecendo um ambiente propício para que seus fungos endofíticos se adaptem e produzam metabólitos bioativos. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antileishmania e antifúngica de extratos e frações obtidos de fungos endofíticos isolados de plantas do mangue da Ilha de Santa Catarina. A metodologia empregada compreendeu o cultivo de 12 espécies fúngicas em arroz, seguido da extração de seus metabólitos por maceração química com metanol e diclorometano. Os extratos totais foram avaliados *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, citotoxicidade para a linhagem THP-1 e atividade antifúngica contra *Candida* spp.. Os extratos totais ativos foram submetidos ao fracionamento líquido-líquido, utilizando os solventes, hexano, acetato de etila, butanol e água e reavaliados quanto a sua atividade biológica. As frações ativas foram submetidas à cromatografia flash Isolera<sup>®</sup>, seguida da análise por UPLC-ESI-QTOF MS para a caracterização química. De um total de 21 extratos, três extratos diclorometano (EDCM231, EDCM022 e EDCM006), provenientes dos fungos *Stemphylium* sp., *Arthrinium* sp. e *Trichoderma* sp., apresentaram atividade biológica frente aos modelos testados. As frações FACOET231, FACOET006 e FACOET022 apresentaram atividade frente *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> 12,75 µg/ml, 43,94 µg/ml e 72,80 µg/ml, respectivamente) e *L. infantum* (IC<sub>50</sub> 14,88 µg/ml; 47,55 µg/ml; 61,14 µg/ml, respectivamente). Para *Candida* spp., as frações FACOET231 e FHEX231 revelaram um MIC de 150 µg/ml para a maioria das cepas. A subfração da fração FACOET006, foi analisada pela técnica de UPLC-ESI-QTOF MS, sendo identificado dois sorbicilinoídeos (Tricobisvertinol D e Bisvertinolona), descritos pela primeira vez para o gênero *Stemphylium* sp. Estes resultados demonstram que fungos endofíticos provenientes de plantas de manguezal apresentam atividades moderadas e baixas frente *Leishmania* sp. e

*Candida* sp., respectivamente. Estudos adicionais se fazem necessários para caracterizar quimicamente as moléculas bioativas presentes nas frações ativas.

**Palavras-chave: Bioprospecção; Produtos naturais; Metabólitos secundários; Leishmaniose; Biotecnologia.**

## ABSTRACT

The demand for new antiparasitic and antifungal agents reflects the lack of a truly effective repertoire of drugs. The therapies used to combat leishmaniasis and candidiasis are old, have side effects and limited therapeutic effectiveness. Given this scenario, bioprospecting has emerged as a promising approach to finding new biomolecules of interest. The mangrove ecosystem stands out for its rich biodiversity and peculiar environmental conditions, offering a favorable environment for its endophytic fungi to adapt and produce bioactive metabolites. The aim of this study was to evaluate the antileishmanial and antifungal activity of extracts and fractions obtained from endophytic fungi isolated from mangrove plants on the island of Santa Catarina. The methodology used involved growing 12 fungal species on rice, followed by extraction of their metabolites by chemical maceration with methanol and dichloromethane. The total extracts were evaluated in vitro against promastigote and amastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*, cytotoxicity for the THP-1 strain and antifungal activity against *Candida* spp. The total active extracts were subjected to liquid-liquid fractionation using the solvents hexane, ethyl acetate, butanol and water and reassessed for their biological activity. The active fractions were subjected to Isolera® flash chromatography, followed by UPLC-ESI-QTOF MS analysis for chemical characterization. Out of a total of 21 extracts, three dichloromethane extracts (EDCM231, EDCM022 and EDCM006) from the fungi *Stemphylium* sp., *Arthrhimium* sp. and *Trichoderma* sp. showed biological activity against the models tested. The FACOET231, FACOET006 and FACOET022 fractions showed activity against *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> 12.75 µg/ml, 43.94 µg/ml and 72.80 µg/ml, respectively) and *L. infantum* (IC<sub>50</sub> 14.88 µg/ml; 47.55 µg/ml; 61.14 µg/ml, respectively). For *Candida* spp., the FACOET231 and FHEX231 fractions showed an MIC of 150 µg/ml for most strains. The subfraction of the FACOET006 fraction was analyzed using the UPLC-ESI-QTOF MS technique, and two sorbicillinoids were identified (Tricobisvertinol D and Bisvertinolone), described for the first time for the genus *Stemphylium* sp. These results show that endophytic fungi from mangrove plants have moderate and low activities against *Leishmania* sp. and *Candida* sp., respectively. Further studies are needed to chemically characterize the bioactive molecules present in the active fractions.

**Keywords: Bioprospecting; Natural products; Secondary metabolites; Leishmaniasis; Biotechnology.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura 1 - Ciclo da <i>Leishmania</i> sp. em uma célula de mamífero.....	34
Figura 2-	Estrutura química do antimoniato de metilglucamina (1) e estibogluconato de sódio (2).....	37
Figura 3-	Estrutura química da anfotericina B.....	37
Figura 4 -	Estrutura química do isetionato de pentamidina.....	38
Figura 5-	Estrutura química da paromomicina.....	39
Figura 6 -	Estrutura química da miltefosina.....	40
Figura 7.....		43
Figura 8 -	Estruturas químicas de azóis utilizados para o tratamento de candidíases.....	45
Figura 9 -	Estrutura química da nistatina.....	46
Figura 10.....		46
Figura 11 -	Estrutura química da flucitosina.....	47
Figura 12 -	Fluxograma referente a análise bioguiada dos extratos obtidos de fungos endofíticos.....	49
Figura 13 -	Taxa de mortalidade de promastigotas das espécies <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> frente aos extratos fúngicos na concentração de 50 µg/ml.....	61
Figura 14 -	Taxas de mortalidade de cinco espécies de <i>Candida</i> spp. utilizando diferentes extratos fúngicos totais na concentração de 90 µg/ml.....	63
Figura 15 -	Análise de cromatografia de camada delgada representativa do perfil químico dos extratos fúngicos obtidos por Diclorometano (DCMARROZ; EDCM231; EDCM006; EDCM022) (A) e Metanol (EMEOHARROZ; EMEOH231; EMEOH006; EMEOH022) (B) revelados em luz ultravioleta.....	66
Figura 16 -	Fluxograma das etapas do fracionamento líquido-líquido dos extratos DCM ativos com uma ordem crescente de polaridade.....	67
Figura 17 -	Taxa de mortalidade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> na concentração de 50 µg/ml da fração acetato de etila dos fungos colocar os nomes EDCM231, EDCM006 e EDCM022.....	68
Figura 18	Taxa de mortalidade determinada pelas frações acetato de etila e hexânica do fungo <i>Arthrimum</i> sp., na concentração de 90 µg/ml.....	70

Figura 19 - Fluxograma da obtenção de frações a partir dos resultados de avaliação da atividade biológica.....	71
Figura 20 - Fluxograma da metodologia utilizada para a caracterização química das frações, utilizando como exemplo a fração FACOET006.....	72
Figura 21- Cromatografia de camada delgada representativa das subfrações da fração FACOET006 originadas após cromatografia Flash®.....	73
Figura 22 - Espectro obtido por UPLC-ESI-QTOF MS da subfração 60:40 Hex:AcoEt da fração FACOET006.....	74
Figura 23 - Propostas estruturais para os picos obtidos por UPLC-ESI-QTOF MS.....	75
Figura 24 - Estrutura referente ao Tricobisvertinol D (1) e a Bisvertinolona (2).....	83
Figura 3- Estrutura química da anfotericina B.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Código e identificação de fungos endofíticos do biobanco utilizados para obtenção de extratos totais e frações.....	42
Tabela 2 - Extratos totais obtidos a partir de 12 espécies de fungos endofíticos isolados dos mangues de Florianópolis/SC.....	53
Tabela 3 - Valores de concentração citotóxica média em células THP-1, concentração inibitória média e índice de seletividade em formas amastigotas intracelulares das espécies <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> utilizando diferentes extratos totais.....	55
Tabela 4 - Valores da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato total diclorometano (EDCM231) obtido do fungo <i>Arthrimum</i> sp. frente as cinco espécies de <i>Candida</i> sp.....	58
Tabela 5 - Frações obtidas após a liofilização do fracionamento dos extratos fúngicos EDCM231; EDCM006 e EDCM022.....	60
Tabela 6 - Valores de concentração citotóxica média em células THP-1 , concentração inibitória média e índice de seletividade em formas amastigotas intracelulares das espécies <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> utilizando diferentes extratos fúngicos fracionados.....	62
Tabela 7 - Valores de MIC das frações FHEX231 e FACOET231 para diferentes espécies de <i>Candida</i> sp.....	64
Tabela 8 - Compostos identificados na fração FACOET006, subfração 60:40 Hex:AcoEt, do fungo endofítico <i>Stemphylium</i> sp.....	68



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo utilizado para a taxa de mortalidade.....	45
Equação 2 - Fórmula para o cálculo de mortalidade.....	47
Equação 3 - Fórmula do percentual de hemólise.....	48

## SÍMBOLOS E ABREVIações

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

SC – Santa Catarina

MIC – Concentração inibitória mínima

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

LC- Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LV- Leishmaniose visceral

MAC- complexo de ataque a membrana

LPG- Lipofosfoglicano

OPC- Candidíase orofaríngea

CVV - candidíase vulvovaginal

CC Candidíase cutânea

CDC – Centro de controle de prevenção de doenças

5F –Flucitosina

5FU – 5-florocil

ERG11- gene que codifica a proteína Lanosterol-14-C-desmetilase

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

Me- Mestre

BDA – Meio batata dextrose

BOD – Estufas com demanda bioquímica de oxigênio

DMSO – dimetilsulfóxido

PBS – tampão fosfato salino

PMA – forbol-miristil-acetato

BrCAST – Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

CFU – Unidades formadoras de colônia

rpm – rotações por minuto

IS – Índice de seletividade

UV – Radiação ultravioleta

AcOet – Acetato de etila

Hex – Hexano

UPLC – UltraPerformance liquid chromatography (Cromatografia líquida de ultra - eficiência)

HPLC – High-performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

PDA- Detector de arranjo de fotodiodos

ESI – Electrospray Ionization (ionização por nebulização)

MET- Metanol

DCM- Diclorometano

CCD- Cromatografia de camada delgada

IC<sub>50</sub> – Concentração para inibir uma função biológica ou bioquímica na metade

CC<sub>50</sub>- Concentração citotóxica média

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral .....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	Revisão bibliográfica.....	26
3.1	Bioprospecção.....	26
3.2	Manguezais.....	28
3.3	Fungos endofíticos e seu potencial biotecnológico.....	30
3.4	Doenças infecciosas e a necessidade de novos fármacos.....	32
3.4.1	Leishmanioses.....	33
3.4.2	Candidíases .....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	Fungos endofíticos.....	50
4.1.1	Isolamento.....	50
4.1.2	Cultivo dos fungos endofíticos.....	51
4.1.3	Obtenção do extrato total com Diclorometano e Metanol.....	51
4.2	Avaliação da atividade biológica.....	52
4.2.1	Cultivo da linhagem celular THP-1.....	52

4.2.2	Cultivo dos Parasitos.....	52
4.2.3	Triagem dos extratos totais e frações frente formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	52
4.2.4	Concentração citotóxica média (CC <sub>50</sub> ) de extratos totais e frações, em células THP-1 .....	53
4.2.5	Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) de extratos e frações, em formas amastigotas <i>Leishmania</i> spp.....	54
4.2.6	Cultivo das leveduras.....	54
4.2.7	Triagem dos extratos totais fúngicos e suas frações em <i>Candida</i> spp.....	55
4.2.8	Atividade hemolítica dos extratos totais ativos.....	56
4.3	Análises estatísticas e cálculos aplicados aos ensaios biológicos.....	57
4.3.1	Fator Z.....	57
4.3.2	Índice de seletividade (IS).....	57
4.4	Caracterização química dos extratos fúngicos totais e suas frações.....	57
4.4.1	Cromatografia por camada delgada (CCD).....	57
4.4.2	Fracionamento líquido-líquido dos extratos totais fúngicos.....	57
4.4.1	Cromatografia flash das frações fúngicas.....	58

4.4.2	Análise UPLC-ESI-QTOF MS das subfrações fúngicas.....	
	58	
5	RESULTADOS.....	60
5.1	Obtenção de extratos totais.....	60
5.2	Atividade biológica dos extratos totais de fungos endofíticos.....	61
5.2.1	Triagem dos extratos fúngicos contra formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i> ....	
	61	
5.2.2	Atividade citotóxica média (CC <sub>50</sub> ) em célula THP-1 e avaliação da concentração inibitória mínima (CI <sub>50</sub> ) dos extratos totais fúngicos contra formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	
	. 62	
5.2.3	Triagem dos extratos fúngicos frente a <i>Candida sp.</i> .....	
	63	
5.2.4	Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos fúngicos frente a <i>Candida sp.</i> .....	64
5.2.5	Atividade hemolítica dos extratos totais fúngicos.....	65
5.3	Caracterização química do extrato total obtido dos fungos endofíticos.....	65
5.4	Avaliação das atividades biológicas dos extratos fúngicos fracionados.....	67
5.4.1	Triagem das frações contra formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i> .....	
	68	
5.4.2	Atividade citotóxica média (CC <sub>50</sub> ) na linhagem celular THP-1 e avaliação da concentração inibitória mínima (CI <sub>50</sub> ) contra formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	
	69	
5.4.3	Triagem dos extratos fúngicos fracionados frente <i>Candida sp.</i> .....	
	69	

5.4.4	Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos fúngicos fracionados frente a <i>Candida sp</i> .....	70
5.5	Caracterização química dos extratos fúngicos fracionados.....	71
5.5.1	Cromatografia flash dos extratos fúngicos fracionados.....	.72
5.5.2	Análise por UPLC-ESI-QTOF MS das subfrações dos extratos fúngicos	73
6	DISCUSSÃO.....	76
7	Resumo de resultados.....	86
8	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS.....	105

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade do desenvolvimento de novos antimicrobianos é uma realidade incontestável, impulsionada por uma complexidade de fatores, como: surgimento contínuo

de novas cepas microbianas, necessidade de um arsenal medicamentoso novo e seletivo, obtenção de tratamentos para doenças emergentes, como também a inovação terapêutica (AMINOV, 2017). Em cenários clínicos, doenças infecciosas como as leishmanioses e a candidíase apresentam um arsenal terapêutico limitado, notoriamente caracterizado pela manifestação de efeitos colaterais graves associados aos medicamentos disponíveis (CHAMORRO-PETRONACCI et al., 2019; PRADHAN et al., 2022). Além disso, a taxa de descoberta de novas drogas tem se mostrado aquém das necessidades, e ainda, o uso indiscriminado de antimicrobianos exerce uma pressão seletiva nas cepas, amplificando a urgência da identificação de novas moléculas capazes de preencher essa lacuna terapêutica (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018).

Nesse contexto, os produtos naturais emergem como alvos promissores na busca por novas moléculas potencialmente terapêuticas, em virtude da vasta gama de características vantajosas conferidas por processos evolutivos e de seleção natural contínuos (ATANASOV et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2020) Esses metabólitos naturais frequentemente demonstram afinidade por alvos biológicos relevantes e apresentam propriedades físico-químicas que os tornam ideais para atividades biológicas desejáveis (WRIGHT, 2019). Além disso, a diversidade de classes químicas encontradas nos produtos naturais pode ser aproveitada tanto diretamente como fármaco quanto como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas e semissintéticas, com aprimoramentos na farmacocinética e na janela terapêutica (BEATTIE; KRYSAN, 2020; DAVISON; BRIMBLE, 2019).

Vale ressaltar que o perfil químico de um organismo é fortemente influenciado pelo ambiente em que ele habita, e os ecossistemas de manguezais representam verdadeiros *hotspots* de biodiversidade propícios à bioprospecção de novos compostos bioativos com aplicação potencial na indústria farmacêutica (ZHOU et al., 2014). Embora os fungos endofíticos de manguezais sejam ainda pouco explorados, é conhecido que sua comunidade endofítica frequentemente exhibe perfis químicos únicos, resultado de adaptações a um ambiente hostil, característico do mangue (DESHMUKH et al., 2020).

Assim, a pesquisa centrada na identificação de produtos naturais derivados de fungos endofíticos de manguezais se apresenta como uma promissora linha de investigação,



com o potencial de abrir novas perspectivas e oportunidades no contexto da descoberta de compostos bioativos capazes de contribuir significativamente para a busca por novos antimicrobianos. Dessa forma a hipótese do trabalho foi que os extratos totais e frações obtidos a partir de fungos endofíticos, isolados de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina, apresentam ação antileishmania e antifúngica.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade de extratos totais e frações obtidas de fungos endofíticos isolados de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina.

## **2.2 Objetivos específicos**

- I) Obter os extratos totais e frações de 12 isolados de fungos endofíticos;
- II) Avaliar a citotoxicidade dos extratos totais e frações na linhagem celular THP-1
- III) Avaliar a atividade hemolítica dos extratos totais;
- IV) Estimar a atividade dos extratos totais e frações frente as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp.;
- V) Estimar a atividade dos extratos totais e frações frente a *Candida* spp.;
- VI) Caracterizar quimicamente os extratos e identificar os metabólitos presentes.

## **3 Revisão bibliográfica**

### 3.1 Bioprospecção

Desde tempos remotos, a humanidade tem se valido dos recursos naturais para atender a diversas necessidades, especialmente nas áreas da medicina, alimentação, suplementação nutricional, cosméticos e defensivos agrícolas. O conhecimento e a habilidade de manipular organismos vivos, seja por meio do cultivo ou domesticação de espécies selvagens, assim como sua exploração para diversos propósitos, sempre desempenharam um papel significativo no estabelecimento de relações de poder (BALICK; COX, 2021). O conhecimento tradicional é um legado empírico compartilhado ao longo de gerações dentro de uma comunidade que vive em íntima conexão com a natureza. Esse conhecimento abrange a compreensão da natureza e o uso da biodiversidade em prol dessa comunidade. As comunidades indígenas se destacam como um exemplo notável de uma rica fonte de saberes tradicionais, uma vez que há séculos esses grupos têm selecionado e gerenciado recursos genéticos de plantas com propriedades medicinais, proporcionando benefícios advindos dessa bioprospecção para o mundo inteiro (GOMES; BERLINCK, 2012).

O termo "bioprospecção" recebeu sua definição formal apenas em 1993, descrevendo-a como "a exploração da biodiversidade para a descoberta de recursos genéticos e substâncias bioquímicas de utilidade comercial" (REID et al., 1994). No entanto, essa definição associa a ideia de exploração exclusivamente aos recursos genéticos e bioquímicos considerados comercialmente úteis, negligenciando um conjunto mais amplo e complexo de atividades de bioprospecção. Essas atividades incluem, por exemplo, a descoberta de novas espécies de organismos com potencial aplicação em processos biotecnológicos, bem como a investigação das interações moleculares entre esses organismos por meio de mediadores químicos (GEORGE et al., 2018). Atualmente, a bioprospecção é definida de forma mais abrangente como "a busca de genes, moléculas naturais e organismos por métodos biológicos, biofísicos, bioquímicos e genéticos para o desenvolvimento de produtos de interesse comercial, nos setores agropecuários, ambientais, cosméticos, alimentícios e farmacêuticos" (MATEO; NADER; TAMAYO, 2001).

Por meio do progresso científico, ocorreram avanços significativos nas técnicas de bioprospecção, permitindo o isolamento e caracterização dos princípios ativos presentes nos extratos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). A triagem de potenciais moléculas de

origem natural abrange um conjunto de técnicas biológicas que podem ser aplicadas a diversas amostras, como: plantas, animais, algas, bactérias e fungos. Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a obtenção de moléculas de origem natural. Uma delas é a triagem bioguiada, na qual é produzido um extrato total e, em seguida, os compostos são avaliados por meio de bioensaios pré-estabelecidos para descobrir novas atividades biológicas. Os compostos que demonstram atividade podem ser isolados e testados novamente. Outra abordagem amplamente utilizada é a técnica de triagem química, que atende à demanda por triagem de alto rendimento (*High-throughput screening*) para muitos compostos purificados. Nessa técnica, a atividade biológica inicial dos extratos não é conhecida, e estes são primeiramente fracionados em compostos puros antes de avaliar suas atividades biológicas (ATANASOV et al., 2021; DA SILVA et al., 2021; KOPARDE; DOIJAD; SAHA et al., 2019; MAGDUM, 2003).

Esses avanços possibilitaram não apenas o desenvolvimento de formulações utilizando os ativos isolados, mas também o aprimoramento desses compostos por meio de refinamento químico, resultando na obtenção de produtos semissintéticos (LI et al., 2019). Isso ocorre, pois os produtos naturais podem servir como *scaffolds* para o desenvolvimento de fármacos sintéticos ou semissintéticos com melhor farmacocinética, menor toxicidade e maior seletividade (DAVISON; BRIMBLE, 2019). Um exemplo é a morfina, inicialmente isolada da flor da papoula (*Papaver somniferum*), amplamente utilizada como analgésico, porém devido aos seus efeitos colaterais, foi desenvolvida a diamorfina, um semissintético derivado da morfina que possui melhor farmacocinética e menores efeitos colaterais (SANDILANDS; BATEMAN, 2016).

Dentre os organismos utilizados na bioprospecção, os fungos são considerados candidatos promissores, sendo um dos grupos mais explorados por metabólitos de interesse clínico (SURYANARAYANAN et al., 2009). Esse fato se dá pela capacidade dos fungos produzirem uma vasta gama de metabólitos secundários com grande variabilidade estrutural que são consequência de sua forma de nutrição e de adaptação ao ambiente (CHRISTIAN; WHITAKER; CLAY, 2017). Um exemplo de medicação de origem fúngica é o paclitaxel (Taxol), um antineoplásico descoberto durante um programa de triagem desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer, a partir das cascas da árvore de teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*) (WANI et al., 1971). A obtenção do Taxol em escala industrial é um grande

desafio, pois a obtenção da biomolécula possui baixo rendimento da extração a partir da casca da árvore do teixo do pacífico, podendo levar a extinção da espécie. Consequentemente metodologias alternativas passaram a ser alvos de estudos, variando desde a síntese química e produção da biomolécula por meio do cultivo das células vegetais, até a busca de microrganismos que produzam Taxol. Nessa busca, foi identificado a produção de Taxol pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da própria *Taxus brevifolia*, fornecendo mais uma alternativa de escalonamento para a produção industrial da biomolécula (KUMARAN; MUTHUMARY; HUR, 2008; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Outro exemplo é a Lovastatina utilizada para tratamento casos de hipercolesterolemia primária e seu análogo sintético, sinvastatina que são derivados do fungo *Aspergillus terrestres* (HENWOOD; HEEL, 2012). Outro exemplo é a ciclosporina, isolada do fungo *Trichoderma polysporum*, que é um potente imunossupressor e imunomodulador utilizado atualmente em transplante de órgãos e tratamento de dermatites (BOREL et al., 1994; RÜEGGER et al., 1976).

As biomoléculas de interesse biotecnológico são produtos derivados da biodiversidade e das interações que diversos organismos têm com o ambiente. Uma das consequências dessas interações é produção de compostos químicos naturais complexos que aumentam a sobrevivência e competitividade do organismo ao meio que ele está inserido (WATERMAN, 1992). O Brasil é um país que possui uma riqueza de ecossistemas extremamente diversos e que podem ser estudados quanto ao potencial de bioprospecção. Nesse sentido, os manguezais desempenham uma função essencial para a sustentabilidade humana, sendo caracterizados como um dos ambientes mais complexos da terra (DINIZ et al., 2019).

### **3.2 Manguezais**

Os manguezais são caracterizados em zonas entre marés em regiões costeiras e, na maioria das vezes, abrigados por rios. A maior ocorrência desse ecossistema é localizada nas regiões tropicais, porém, podem ocorrer em climas temperados em menores proporções (MORRISEY et al., 2010). O manguezal é constantemente invadido pelas águas marinhas que contribuem com o fluxo de matéria orgânica que está presente em grande quantidade nos solos lamacentos dos mangues (LUGO, 1974). Seu solo é caracterizado pela alta

salinidade, pouco oxigênio e é rico em sulfeto de hidrogênio que causa um odor forte de putrefação. Essas características inóspitas fazem com que a fauna, flora e microbioma local possuam características morfológicas e fisiológicas únicas que os tornam aptos a sobreviverem nesse nicho (SOUZA et al., 2018; SPALDING, 2010).

Devido à quantidade de matéria orgânica presente em seu solo, há um micro-habitat rico que serve como base de uma extensa cadeia alimentar, além disso, esse ambiente é essencial para a proteção da costa, repouso e berçário de diversas espécies, sequestro de carbono e biorremediação de resíduos (ALONGI, 2008). A flora abrigada é de caráter lenhoso e possui uma fitofisionomia pouco diversa e é capaz de suportar altas temperaturas tendo um papel fundamental na remediação dos gases do efeito estufa, principalmente o CO<sub>2</sub>, devido à capacidade única de fixação, maior quando comparada aos fitoplânctons (KARTHI et al., 2020; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; ONG JIN-EONG; GONG WOOI KHOON; CLOUGH, 1995).

No caso específico da Ilha de Santa Catarina, a maioria dos manguezais encontra-se na porção insular oeste do município. A vegetação encontrada nos mangues da Ilha Santa Catarina possui grande similaridade com os demais manguezais do Brasil, possuindo uma flora homogênea composta predominantemente pelas espécies arbóreas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* (GOULART ELLER; DOS SANTOS; NASCIMENTO DA SILVA, 2013; SOVERNIGO, 2009).

O microbioma endofítico dos manguezais desempenha um papel fundamental na saúde e produtividade das plantas, participando na degradação da serrapilheira e ciclo do carbono no ambiente (YAO et al., 2019). Dentre os microrganismos que realizam a interação com a flora desse ambiente estão os fungos endofíticos, produtores de uma gama de metabólitos secundários de possível prospecção de novos compostos farmacológicos (DEVI et al., 2020). Na literatura há relatos que os extratos provindos de plantas de mangue apresentam atividade comprovada contra patógenos humanos, animais e vegetais (ACHARYA et al., 2020; WANG et al., 2021; KHAIRANAH KADRIAH, 2020; ALIZADEH BEHBAHANI et al., 2018; MULIANI; NURBAYA). E a atividade desses extratos podem ser desempenhadas não só pela planta em si, mas pela comunidade endofítica que nela habita (VERMA et al., 2007).

### 3.3 Fungos endofíticos e seu potencial biotecnológico

O termo endófito é descrito como microrganismos que colonizam os tecidos internos, como os caules, folhas e raízes, sem causar prejuízos imediatos ao hospedeiro (BACON; WHITE, 2000). Os fungos endofíticos são um grupo diversificado e podem ser encontrados em diferentes ambientes, como: os manguezais, Antártica, desertos, florestas tropicais, rios e mares (SOPALUN et al., 2021; DU et al., 2020; EL-GENDY et al., 2018; MAULANA et al., 2018; GONZÁLEZ-TEUBER; VILO; BASCUÑÁN-GODOY, 2017; ROSA et al., 2009).

Cada planta possui uma determinada comunidade endofítica e, sabe-se que o estabelecimento dessa comunidade é moldado por meio de fatores ambientais, sendo diretamente influenciado pelo tipo de solo, espécie da planta e o microbioma do ecossistema. Sendo assim, plantas de diferentes biomas apresentam uma grande plasticidade das comunidades endofíticas que as coloniza (BONITO et al., 2014; GUNDEL et al., 2009; RUHE et al., 2016). A relação entre endófito e planta é baseada em uma troca constante, assim, os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos tem uma ação direta nas funções fisiológicas e ecológicas das plantas, favorecendo o seu crescimento, prevenindo estresses como: alta salinidade, temperaturas extremas, toxicidade por metais pesados, estresse oxidativo e fitopatógenos (CARLA et al., 2021; RABIEY et al., 2019). A diferença deles para os metabólitos primários está atrelada as funções que eles desempenham, pois os primários são considerados imprescindíveis para funções básicas como divisão e crescimento (clorofila, proteínas e ácidos graxos), enquanto que os secundários estão atrelados a sobrevivência e adaptação ao ambiente (etanol e toxinas) (SAURABH et al., 2015).

Os metabólitos secundários possuem uma grande variação química, podendo ser caracterizados como: alcaloides, benzopiranos, quinonas, peptídeos, fenóis, quinonas, flavonoides, esteroides, terpenoides, tetralonas, xantonas, estirilpironas. Essas moléculas possuem um grande interesse para a indústria farmacêutica, pois possuem um enorme potencial de serem utilizadas, direta e indiretamente, como agentes terapêuticos para diversas doenças (SUBBAN; CHELLIAH, 2021; TYAGI et al., 2021; DEVI et al., 2020; SAHOO; WIYAKRUTTA et al., 2004).

Estudos atuais evidenciam que as plantas presentes em ecossistemas de extrema adversidade, como os manguezais, abrigam uma rica comunidade endofítica capaz de produzir metabólitos secundários singulares (RAMIREZ; NOTARTE; DELA CRUZ, 2020; WEN et al., 2022). Diversas são as aplicações que extratos e compostos isolados de fungos endofíticos do mangue podem apresentar, portanto, a pesquisa acerca dos fungos endofíticos dos manguezais tem ganhado notável destaque. Estudos já mostraram que biomoléculas isoladas de fungos endofíticos dos manguezais podem apresentar atividades antitumoral, tal como os *scaffolds* de indol-diterpenos rizovarinas, produzidos pelo fungo *Mucor irregulares* isolado da planta de mangue *Rhizophora stylosa*. Neste trabalho demonstrou-se atividade contra linhagens celulares de câncer humano HL-60 e A-549 com valores de IC<sub>50</sub> variando de 5 a 15 µM (GAO et al., 2016; SADAN et al., 2011).

No contexto de doenças infecciosas, recentemente foi constatado que o extrato total do fungo endofítico *Diaporthe* sp., isolado de *Avicennia nitida* em áreas de manguezal em do estado de São Paulo, possui propriedade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Essa ação foi observada em uma concentração de 6.000 µg/ml, resultando em uma taxa de mortalidade de 90%. Além disso, o mesmo extrato foi testado em diferentes bactérias, apresentando importantes resultados antibacterianos (*Escherichia coli* MIC<sub>90</sub> = 7.820 µg/ml; *Salmonella enteritidis* MIC<sub>90</sub> = 3.980 µg/ml e *Staphylococcus aureus* MIC<sub>90</sub> = 3.940 µg/ml) (MOREIRA et al., 2020). No ano de 2023, Newaz e colaboradores descobriram um novo peniprenilfenol A, produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum* ZZ1151 isolado do mangue da Indonésia, que possui atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* patogênico resistente à meticilina (MRSA), *E. coli* e *Candida albicans* com valores MIC de 6, 13 e 13 µg/ml, respectivamente (NEWAZ et al., 2022).

No contexto dos fungos marinhos, os fungos endofíticos encontrados nos manguezais representam o segundo maior agrupamento de isolados (WANG et al., 2014). No entanto, a maioria das informações disponíveis sobre fungos endofíticos deriva de espécies isoladas em manguezais asiáticos. Quando comparamos esses estudos com outras localidades, é evidente a escassez de pesquisas e informações sobre esses microrganismos, especialmente em países como o Brasil, que abriga o sistema de manguezais mais extenso do mundo (CARDENAS et al., 2022; LIU; WU; XU, 2007).



No Brasil há uma grande escassez de acerca da diversidade de fungos endofíticos presentes em seus manguezais. Em 2013, Sebastianes e colaboradores, analisaram a diversidade fúngica em dois manguezais do estado de São Paulo, e identificaram 34 gêneros de fungos endofíticos, com destaque para os gêneros de maior frequência: *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria* (DE SOUZA SEBASTIANES et al., 2013). Apesar do vasto potencial biotecnológico dos manguezais, o conhecimento sobre a biodiversidade e o microbioma presentes nesse ecossistema ainda é escasso. O presente trabalho é derivado de um projeto maior, onde o grupo de pesquisa é responsável pelo estabelecimento do primeiro biobanco de fungos endofíticos isolados de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina/SC.

No contexto da bioprospecção de metabólitos de fungos endofíticos, uma das contribuições mais relevantes é a descoberta de biomoléculas com potencial farmacêutico. Em face dos desafios enfrentados no cenário das doenças infecciosas, tais como a carência de terapias seletivas e eficazes, bem como a emergência da resistência medicamentosa, a necessidade da pesquisa de novas terapias é fundamental.

### **3.4 Doenças infecciosas e a necessidade de novos fármacos**

As doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos, como vírus, bactérias, parasitas ou fungos, e podem ser transmitidas diretamente ou indiretamente de uma pessoa para outra (OMS, 2023). Elas representam um grande desafio para a saúde pública global, pois o surgimento de novos casos é influenciado por uma complexa rede de fatores, incluindo mudanças climáticas, educação, agricultura, saneamento básico, abastecimento de água, habitação (DE COCK et al., 2013). Isto posto, o combate das doenças infecciosas necessita de ações em diferentes vertentes, desde saneamento básico até disponibilidade de um diagnóstico rápido, tratamentos eficazes e imunização (KHABBAZ et al., 2014).

A problemática das doenças tropicais negligenciadas e das infecções fúngicas resistentes reside na limitação do arsenal terapêutico, que frequentemente não consegue promover a cura da doença e ainda apresenta casos de falha (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018; WHITE et al., 2002). Nesse cenário, a descoberta de novos fármacos emerge como uma necessidade prioritária, tanto para a saúde pública

quanto para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos afetados por essas enfermidades.

Contudo, apesar da urgência dessa questão, observa-se um declínio no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Tal fenômeno pode ser atribuído a diversos fatores econômicos que tornam a descoberta de novos agentes antimicrobianos desfavorável, especialmente quando se trata de doenças que afetam predominantemente países em desenvolvimento (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Neste trabalho, voltaremos nossa atenção para duas doenças infecciosas específicas - uma de origem parasitária e outra fúngica - que apresentam desafios significativos em termos de controle e tratamento. À medida que avançamos na discussão desses tópicos, esperamos elucidar as complexidades envolvidas e apresentar as medicações atualmente disponíveis.

### **3.4.1 Leishmanioses**

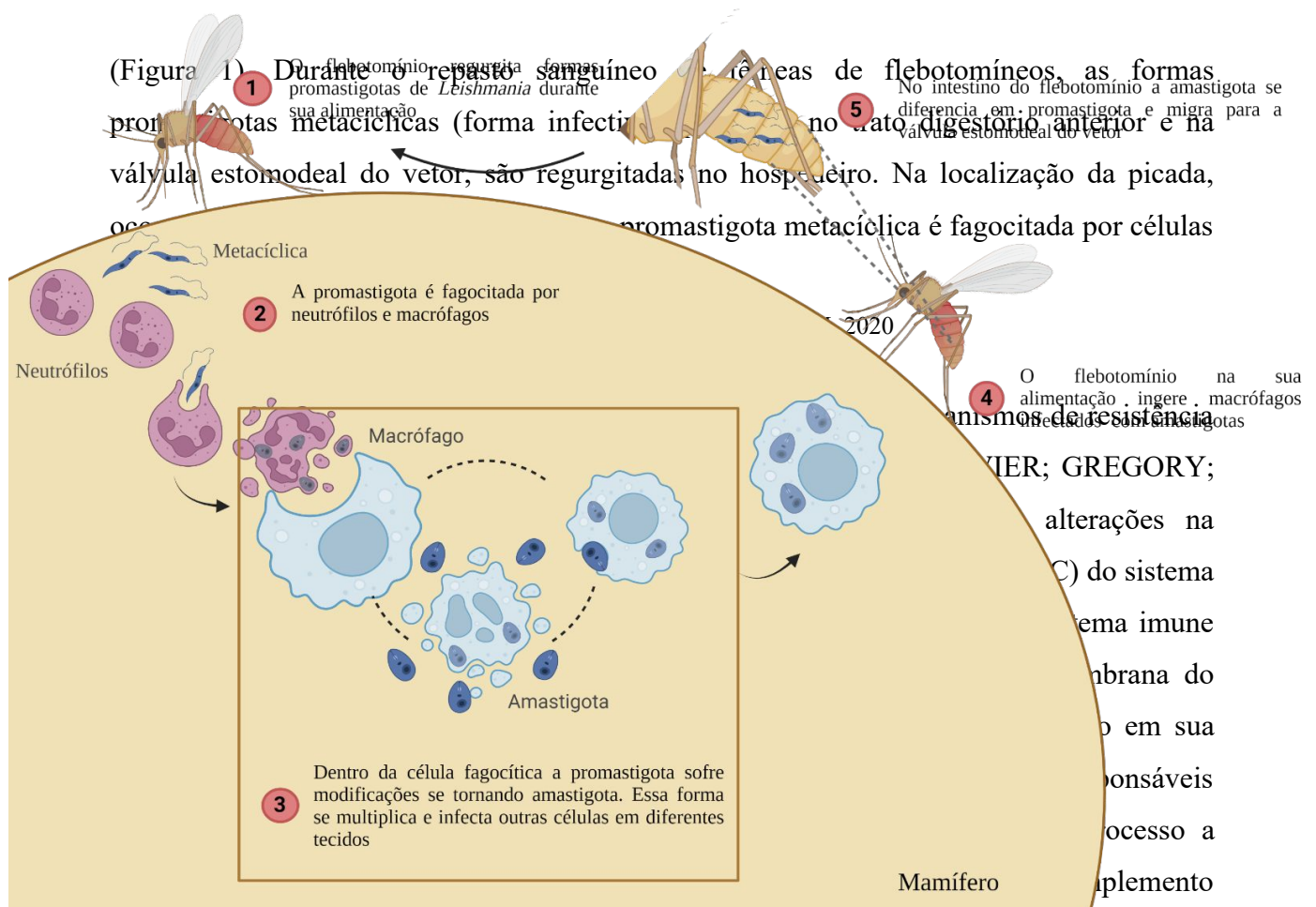
O primeiro relato de observação de uma *Leishmania* ocorreu em 1900 pelo patologista escocês William Boog Leishman (1865-1926) na cidade de Calcutá, na Índia. A amostra utilizada foi extraída do baço de um soldado britânico, sendo possível visualizar, com o auxílio de um microscópio, pequenos corpos com cromatina que se diferiam de células sanguíneas. Após alguns anos, Leishman encontrou os mesmos corpos em amostras provenientes de ratos (LEISHMAN, 1903). Em 1903, o médico britânico Charles Donovan (1863-1951) também observou em suas amostras as mesmas estruturas encontradas pelo colega William anteriormente, porém foi Ronald Ross (1857-1932), que investigou a doença do calazar na Índia e identificou o parasito causador como *Leishmania donovani* (DONOVAN, 1903; ROSS, 1903). A partir desse marco, diversas outras espécies do gênero *Leishmania* começaram a ser descritas na literatura tendo atualmente em torno de 53 espécies registradas, sendo que 20 delas são conhecidas por causarem leishmaniose em humanos (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

Atualmente, as leishmanioses são conhecidas como um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Um amplo espectro de manifestações clínicas é conhecido, compreendendo lesões cutâneas únicas ou múltiplas, com ou sem comprometimento mucocutâneo, até manifestações clínicas fatais observadas na forma

visceral (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). De forma geral, três formas clínicas principais das leishmanioses comumente descritas são: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), (SAVOIA, 2015). A LC é a forma mais frequente da doença caracterizada por lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente indolores, presentes em áreas descobertas do corpo e causada por 16 espécies do parasito pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* variando de acordo com a região geográfica (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). A LMC é uma manifestação que acomete as mucosas da boca e nariz e é causada pelas espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* nas Américas (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Já LV é causada pelas espécies *L. infantum* no novo mundo e *L. donovani* no velho mundo, sendo considerada uma doença grave na qual órgãos como fígado, baço e a medula óssea são acometidos. A LV possui caráter crônico e sua letalidade pode atingir 90% em pacientes não tratados, principalmente em crianças desnutridas e pessoas imunossuprimidas (GONTIJO; MELO, 2004).

Em uma escala mundial, as leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países e estima-se que 1 bilhão de pessoas estejam em áreas de risco de transmissão (WHO, 2022). Na América Latina, a LV é endêmica em 13 países, com uma média anual de 3.400 novos casos. O Brasil, mesmo apresentando uma redução no número de casos no ano de 2020, no mesmo período apresentou cerca de 97% de todos os casos de LV notificados na América Latina. Em um cenário mundial o Brasil também está entre os países com maiores número de casos tanto de LC quanto de LV, acompanhado de outros países subdesenvolvidos como: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia (DNDi América Latina, 2022). Apesar deste cenário mundial preocupante, as leishmanioses ainda estão incluídas dentre as doenças tropicais negligenciadas e possuindo uma rede complexa que inclui diferentes fatores ecoepidemiológicos associados ao surgimento de casos. Entre esses, os que são considerados críticos para o surgimento de novas ocorrências e agravamento da doença são: condição socioeconômica, movimentos migratórios, mudanças climáticas, impactos ambientais e a desnutrição (GALVIS OVALLOS, 2020).

Os parasitos do gênero *Leishmania* sp. são protozoários flagelados do filo Euglenozoa e possuem um ciclo biológico complexo que envolve duas diferentes formas biológicas: a forma promastigota no vetor e a forma amastigota nas células de mamíferos



inativando os mecanismos microbicidas dos fagócitos, favorecendo a entrada do parasito na célula alvo (BRITTINGHAM et al., 1999).

Após a fagocitose, dentro do vacúolo parasitóforo, o parasito assume a forma amastigota e se multiplica por divisão binária simples (Figura 1), sendo essa forma a responsável pelas manifestações clínicas da doença em mamíferos (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). A forma amastigota tem a capacidade de manipular a produção de óxido nítrico pelo macrófago e inibir a produção de citocinas por essas células que são necessárias para a produção de uma resposta imune eficiente. Estas habilidades permitem que o parasito se desenvolva no vacúolo parasitóforo, dentro do fagolisossomo (YOUNG; KIMA, 2019).

Os fatores de interação parasito-hospedeiros são essenciais para o entendimento da infecção e a detecção de possíveis alvos para o desenvolvimento de terapias para o tratamento da doença (DE MORAIS et al., 2015). O tratamento das leishmanioses conta com um pequeno arsenal medicamentoso que será melhor detalhado nos próximos tópicos.

### **3.4.1.1 Fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses**

Existem basicamente duas opções de tratamento para as leishmanioses na maioria dos países: os medicamentos de primeira escolha que incluem os antimoniais pentavalentes e os medicamentos de segunda escolha como anfotericina B e pentamidina (VALLE et al., 2019). A duração do tratamento pode variar de acordo com a manifestação clínica, podendo ainda, ocorrer associações medicamentosas para o tratamento (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; MONGE-MAIHO; LOPEZ-VELEZ, 2016). Todos os medicamentos empregados apresentam sérios efeitos colaterais como: cefaleia, congestão, dispneia com alguma incidência de efeitos secundários como taquicardia, hipotensão e hipoglicemia. Os tratamentos de segunda escolha são administrados somente em casos de resistência/contraindicação ao antimoniato ou quando há manifestação de efeitos colaterais graves como toxicidade hepática e cardíaca ocasionado pelo tratamento de primeira escolha (PRADHAN et al., 2022).

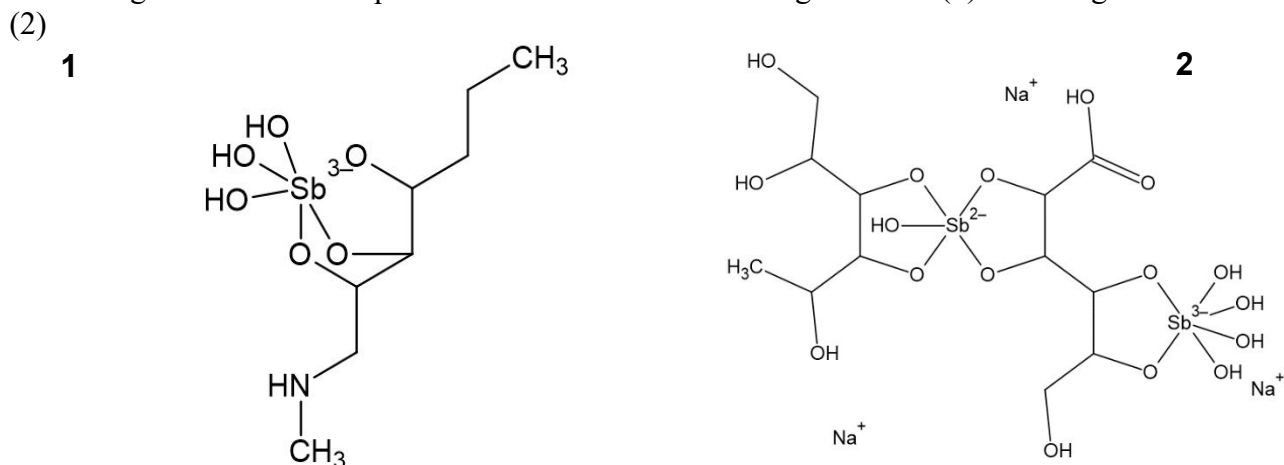
Mesmo com sérios efeitos colaterais essas terapias ainda são amplamente utilizadas devido à falta de novos fármacos no mercado. Na seção seguinte serão abordados os principais medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, trazendo informações sobre os mecanismos de ação, os principais efeitos colaterais e algumas limitadas vantagens de cada droga.

#### **3.4.1.1.1 Antimoniais pentavalentes**

A utilização dessa medicação para leishmaniose iniciou com Gaspar Viana em 1912, um pesquisador brasileiro do Instituto Oswaldo Cruz, que realizou uma diluição do até então chamado “tártaro emético”, e iniciou sua aplicação em casos humanos de leishmaniose. Essa descoberta foi um marco, no tratamento e prognóstico da leishmaniose (VIANNA, 1914). Por mais de seis décadas os antimoniais vêm sendo peça-chave no tratamento da leishmaniose e ainda são recomendados como medicamentos de primeira escolha pela OMS para o tratamento de todos os tipos de leishmaniose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2010). Atualmente medicação apresenta duas formulações sendo uma composta pelo estibogluconato de sódio e outra pelo antimoniato de metilglucamina (Figura 2).

Ambos os medicamentos são considerados pró-fármacos, pois o antimônio pentavalente é reduzido em antimônio trivalente e só assim apresenta a atividade leishmanicida (SHAKED-MISHANT et al., 2001). No Brasil, a formulação utilizada é o antimoniato de metilglucamina que é um composto sintético (RATH et al., 2003). Mesmo sendo o medicamento de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, existem diversos efeitos colaterais (anorexia, mal-estar, náuseas, mialgia, artralgia, gosto metálico e letargia, hepato e cardiotoxicidade) e a necessidade de administração da medicação em ambiente hospitalar (WHO, 2010; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

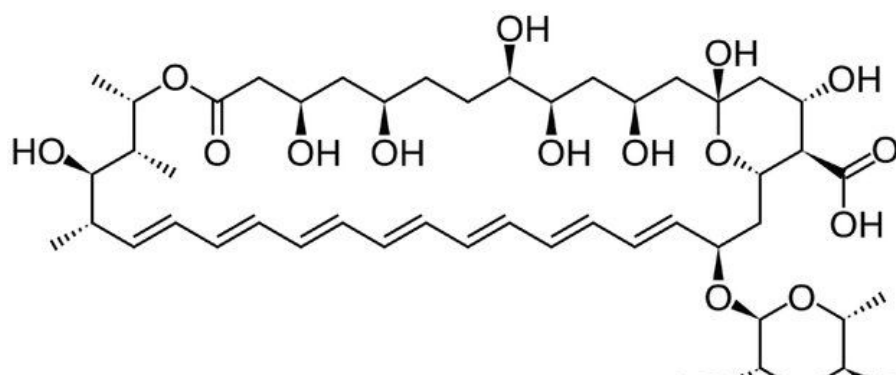
Figura 2- Estrutura química do antimoniato de metilglucamina (1) e estibogluconato de sódio



### 3.4.1.1.2 Anfotericina B

A anfotericina (Figura 3) foi obtida por meio de bioprospecção da bactéria *Streptomyces nodusus* isolado de solo pluvial do Orinoco na Venezuela. Inicialmente o composto foi desenvolvido para infecções fúngicas sistêmicas e posteriormente passou a

Figura 3- Estrutura química da anfotericina B



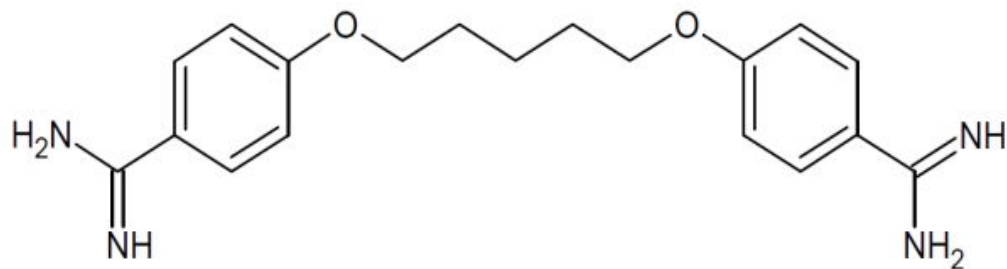
ser utilizado para o tratamento da leishmaniose (YANG et al., 2013; MATSUMORI et al., 2009).

Devido à estrutura da anfotericina B apresentar caráter anfifílico, a medicação possui baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, dessa forma a sua administração é endovenosa e possui diversos efeitos colaterais que variam de vômitos, diarreia, dores musculares e articulares até nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Atualmente a anfotericina B lipossomal é considerada o medicamento contra a leishmaniose mais seguro e mais eficaz, porém já existem relatos de resistência (LANZA et al., 2019).

#### 3.4.1.1.3 Isetionato de pentamidina

O isetionato de pentamidina (Figura 4) foi sintetizado por volta de 1940 e utilizada atualmente como medicamento de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses e tripanosomíase africana (VALLE et al., 2019). O tempo de tratamento com a pentamidina é relativamente mais curto em comparação aos antimoniais, porém essa medicação apresenta variação na eficiência em diferentes continentes e ainda, efeitos colaterais graves como hipotensão, hipoglicemia grave, miocardite, cardiotoxicidade e toxicidade renal (PRADHAN et al., 2022).

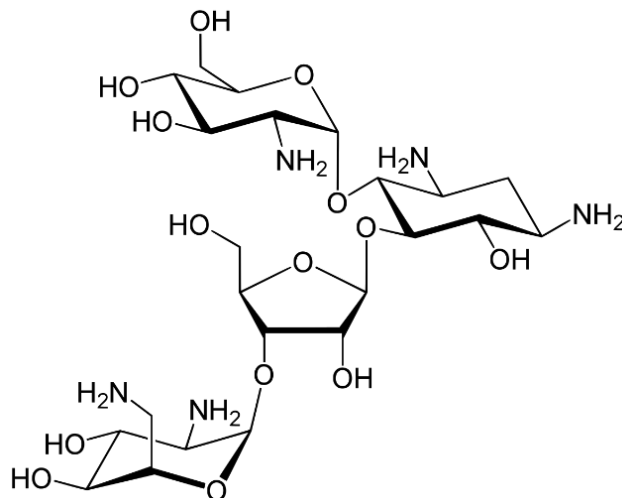
Figura 4 - Estrutura química do isetionato de pentamidina



#### 3.4.1.1.4 Paromomicina

A paromomicina (Figura 5) é considerada um antibiótico aminoglicosídico utilizado como um medicamento de segunda escolha para o tratamento de leishmaniose. Mesmo se mostrando eficaz no tratamento da leishmaniose, apresentam efeitos colaterais graves como hepatotoxicidade, dor no local de administração, diarreia, náusea e já há relatos de casos de resistência (BHANDARI et al., 2014; JHINGRAN et al., 2009).

Figura 5- Estrutura química da paromomicina

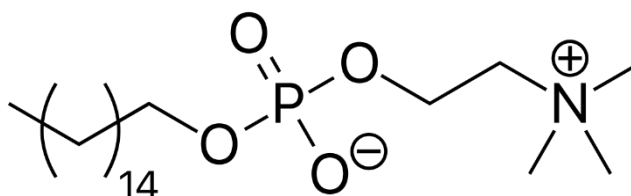


#### 3.4.1.1.5 Miltefosina

A miltefosina, também é conhecida como hexadecilfosfocolina, teve inicialmente seu uso era destinado ao tratamento de câncer de mama metastático (Figura 6). É uma das medicações mais recentes utilizadas para o tratamento da leishmaniose e a sua principal vantagem é a administração oral (LEITÃO et al., 2019). Apesar de possuir a vantagem da via de administração, o que facilita a adesão ao tratamento para o paciente, a miltefosina já enfrenta casos de resistência e apresenta efeitos indesejáveis como toxicidade renal e hepática (PRADHAN et al., 2022).



Figura 6 - Estrutura química da miltefosina



#### 3.4.1.1.6 Terapias combinadas

As combinações de diferentes tratamentos é uma estratégia bem utilizada para o tratamento de diversas doenças parasitárias (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Essa técnica é muito utilizada em coinfeções entre a leishmanioses e doenças como HIV e tuberculose (LINDOSO et al., 2016). Existem diversas razões para a utilização dessa metodologia, mas as principais estão atreladas ao aumento da eficácia, redução o tempo de tratamento que, assim, diminui hipóteses para o surgimento de resistência aos medicamentos antileishmania (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018). Diversos estudos avaliam a ação da terapia combinada de medicações com diferentes mecanismos de ação, ambas, em concentrações menores. Um estudo realizado na Índia utilizando a combinação entre a anfotericina, miltefosina e paramomicina mostrou que a associação apresentou diminuição no tempo de tratamento e maior eficácia contra a leishmaniose (SUNDAR et al., 2011). No Brasil a associação medicamentosa entre anfotericina e antimoniato foi utilizada para o tratamento de casos randomizados de LV e demonstrou em comparação ao tratamento de primeira linha redução dos efeitos colaterais e eficácia aceitável (ROMERO et al., 2017). Mesmo com dados demonstrando que a combinação de terapias pode surtir um efeito positivo no tratamento e aumentar a vida útil do medicamento, ainda existem lacunas a serem preenchidas (PINHO et al., 2022; HENDRICKX et al., 2021; CARNIELLI et al., 2019; ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007).

É nítida a necessidade de novas medicações para o tratamento das leishmanioses. Para contornar a situação, diversas pesquisas vêm sendo realizadas ao longo das últimas

décadas visando a identificação de novas moléculas candidatas para desenvolvimento de novas opções terapêuticas menos tóxicas e mais eficientes.

### 3.4.2 Candidíases

As doenças fúngicas invasivas tem um grande impacto na morbidade e mortalidade humana. As taxas de infecções fúngicas vêm aumentando e o pequeno arsenal de terapias existentes enfrentam graves casos de resistência. As infecções fúngicas invasivas são responsáveis por cerca de 1 milhão e meio de mortes a cada ano, e as principais espécies responsáveis por esse dado pertencem aos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Candida* (BAJPAI et al., 2019).

O gênero *Candida* é responsável por causar as candidíases, e existem mais de 200 espécies relatadas na literatura, sendo que apenas 10% delas são conhecidas por causarem infecções oportunistas em humanos (GRAY; ROBERTS, 1988). A espécie *Candida albicans* é responsável pela maioria dos casos de candidíase humana, embora seja uma espécie comensal em um humano saudável, sendo encontrada em diversos locais como: mucosas da cavidade oral, trato gastrointestinal, urogenital e vagina (TALAPKO et al., 2021a). A participação dessa levedura na microbiota do hospedeiro controla o crescimento de bactérias e fungos oportunistas e promove o funcionamento do sistema imune (ROMO; KUMAMOTO, 2020).

Por se tratar de uma infecção oportunista, a patogenicidade das espécies de *Candida* sp. está relacionada principalmente ao estado imunológico dos indivíduos. Dessa forma, se tornam propensos a infecção por este fungo pacientes imunossuprimidos, em tratamento com antibióticos de amplo espectro, pós cirúrgicos com utilização de cateteres, transplantados, recém-nascidos, idosos e pacientes em tratamento hormonais e esteroidais (ROCHA et al., 2021). Para que as leveduras consigam colonizar o hospedeiro e iniciar a infecção, as espécies de *Candida* sp. desenvolveram diversos mecanismos de virulência. Esses fatores incluem desde diferentes morfologias celulares durante o ciclo até secreção de enzimas, expressão de adesinas e invasinas, tigmotropismo, bombas de efluxo e formação de biofilme (TALAPKO et al., 2021a).

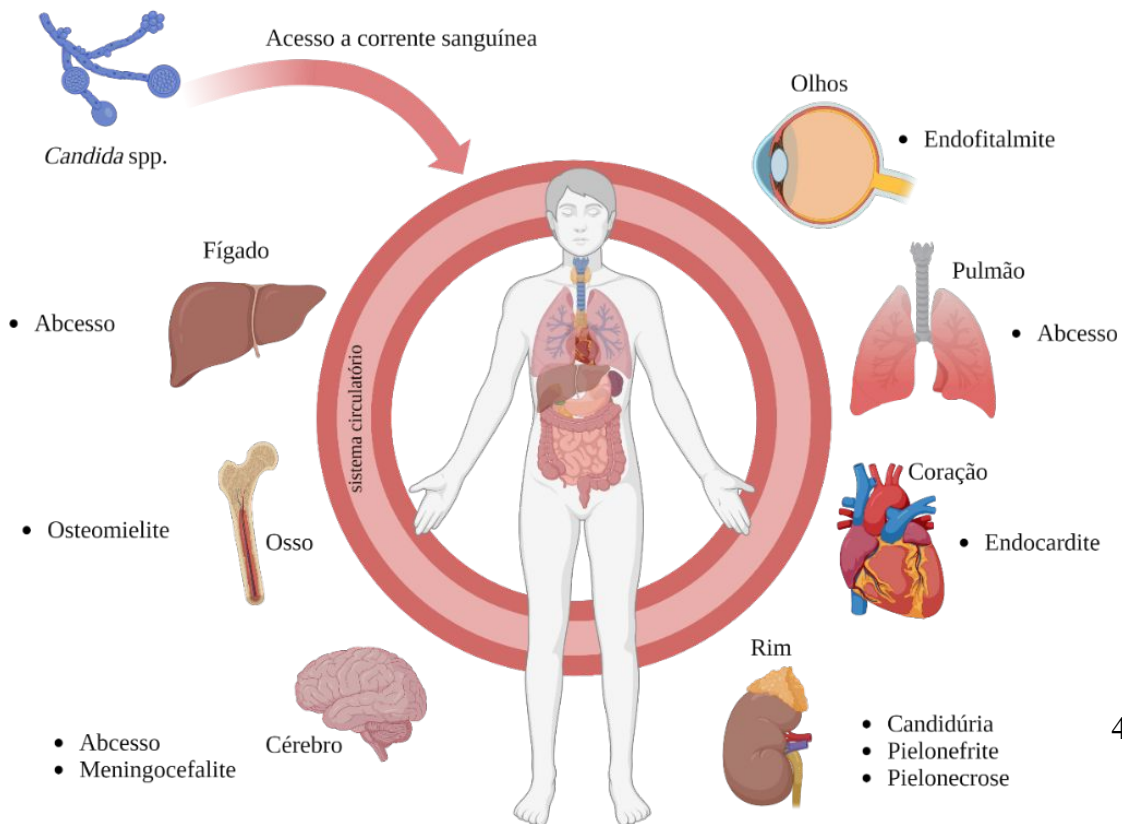
Um dos principais fatores de virulência é sua característica de polimorfismo, pois é responsável pela transição da forma comensal para a forma patogênica (TALAPKO et al.,

2021). Essa transição se dá pela forma de levedura, que está presente no organismo comensalmente, em pseudohifas que é a morfologia patogênica. Além disso, existem também proteínas como adesinas e invasinas (Als3 e Hwp1) que são cruciais para a etapa de infecção, pois danificam a célula hospedeira criando poros na membrana epitelial que facilitam a entrada do patógeno (CALDERONE; FONZI, 2001).

Além dos fatores citados, as cândidas ainda possuem a capacidade de formar biofilmes no hospedeiro e em superfícies abióticas. A formação de biofilmes é um grande agravador da doença, pois ele cria um ambiente estável para o patógeno e o faz tolerar altas doses de antimicrobianos, diminuindo a resposta do paciente ao tratamento (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

A infecções podem ocorrer nas mucosas ou pele, podendo ser chamadas de candidíase orofaríngea (OPC), candidíase vulvovaginal (CVV), candidíase cutânea (CC) e balanite. A *C. albicans* é responsável por cerca de 90% dos casos de OPC e *C. glabrata* pelos outros 10%. Além de doença nas mucosas e pele, a *Candida* pode ultrapassar a barreira epitelial e adentrar a corrente sanguínea causando cândida sistêmica conhecida como candidemia. Assim, uma vez na corrente sanguínea ela pode infectar diferentes órgãos, causando uma série de doenças graves (Figura 7).

Figura 7 - Complicações que podem ser geradas pela candidíase invasiva



De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, estima-se que ocorram 25.000 casos de candidíase invasiva todo ano, apresentando uma incidência estável desde o ano de 2013 de 9 casos a cada 100.000 habitantes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION/CDC, 2023). No Brasil não há uma vigilância específica para candidíases, nem mesmo a invasiva, pois não são doenças de notificação compulsória. Isto posto, há uma grande dificuldade de dados epidemiológicos atualizados. Atualmente, estima-se que no Brasil, que a taxa de incidência chegue a 2,49 casos a cada 1.000 habitantes, taxas altas quando comparadas a países da Europa e o Estados Unidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Nos últimos anos, em uma escala mundial, ocorreu um aumento no número de casos de candidíases sistêmicas em pacientes nosocomiais, imunossuprimidos e saudáveis (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Além da *C. albicans*, outras espécies também são responsáveis pela candidíase sistêmica como: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei* e *C. famata*. Mesmo com tratamento a taxa de mortalidade de infecções fúngicas sistêmicas em adultos varia de 14,5% a 49% (MARTINS et al., 2014). Existem duas grandes principais classes de antifúngicos: os azóis e os polienos, e ambas as classes enfrentam casos graves de resistência (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002).

### **3.4.2.1 Tratamentos atuais contra candidíases**

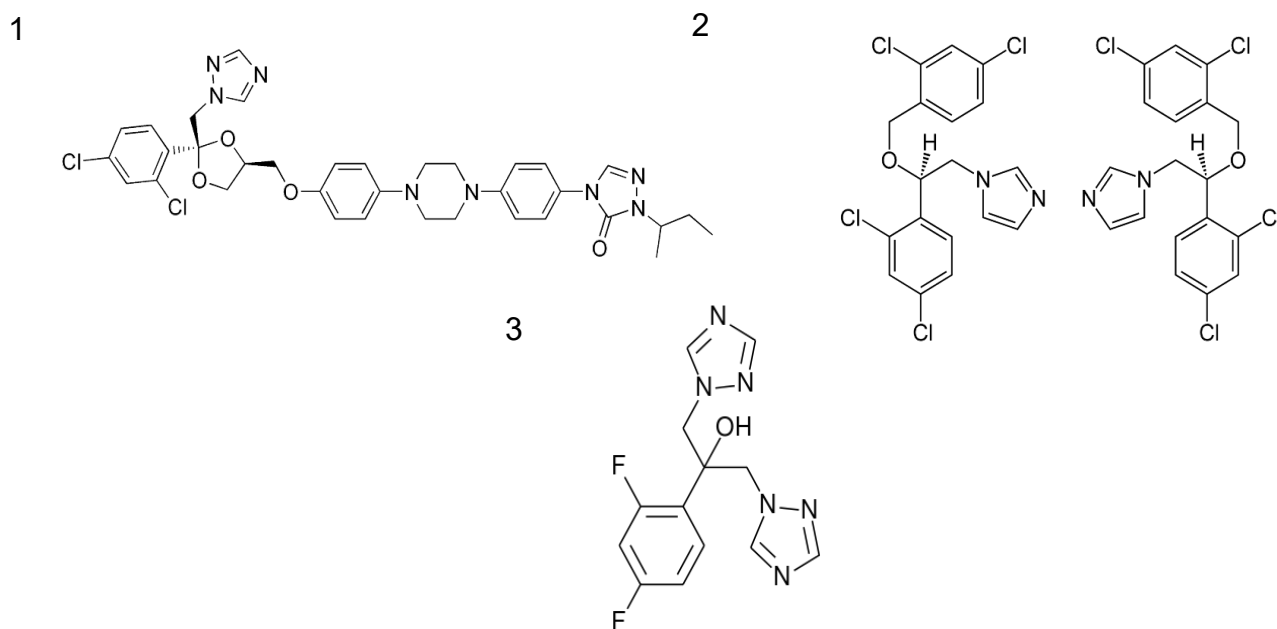
#### **3.4.2.1.1 Azóis**

A atividade antifúngica dos azóis (Figura 8) foi descrita pela primeira vez por Woolley em 1944, quando descobriu a capacidade antimicótica do benzimidazol (WOOLLEY, 1944). Existem três gerações de medicamentos utilizando a molécula de azol como base já em comercialização, essas gerações foram surgindo levando em consideração a melhoria da farmacocinética, espectro de ação e segurança (CANUTO; RODERO, 2002). A primeira geração é representada por medicamentos descobertos até meados da década de 70, como o clotrimazol, miconazol e econazol. A segunda geração dos azóis é marcada por três mudanças estruturais principais que melhoraram a farmacocinética, espectro de ação e

segurança das medicações, exemplos medicações que se encaixam nessa classe são o cetoconazol e fluconazol. A terceira geração é marcada pelo melhoramento das moléculas de segunda geração, aprimorando as propriedades de farmacocinética, segurança e melhorar a atividade frente a espécies resistentes, dois exemplos de medicamentos dessa geração são fluconazol e itraconazol (SHAFIEI et al., 2020).

O mecanismo de ação dos azóis está relacionado a inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -sterol demetilase responsável pela biossíntese do ergosterol que é um componente essencial da parede celular fúngica. A inibição da enzima gera a inibição do crescimento da célula fúngica devido às alterações estruturais na membrana celular (AHMED et al., 2021).

Figura 8 - Estruturas químicas de azóis utilizados para o tratamento de candidíases



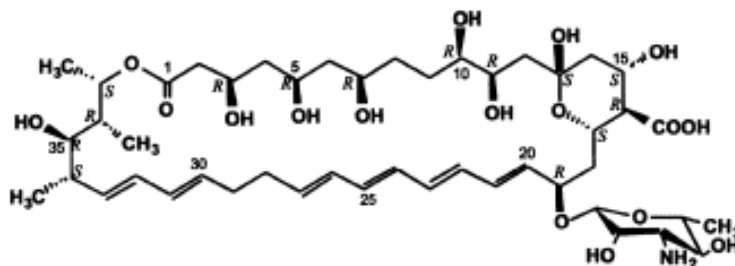
1-Itraconazol 2-Miconazol 3-Fluconazol

### 3.4.2.1.2 Polienos

Essa classe de antifúngico são de origem natural, isolados do metabolismo de fungos do gênero *Streptomyces*. A nistatina (Figura 9) é um antifúngico dessa classe, e foi um dos primeiros medicamentos utilizados com sucesso para o tratamento de candidíase e micoses, porém seu uso é limitado ao uso tópico. Outro medicamento representante dessa

classe é a Anfotericina B, que é o principal medicamento para o tratamento de infecções fúngicas sérias e candidemia (CANUTO; RODERO, 2002).

Figura 9 - Estrutura química da nistatina

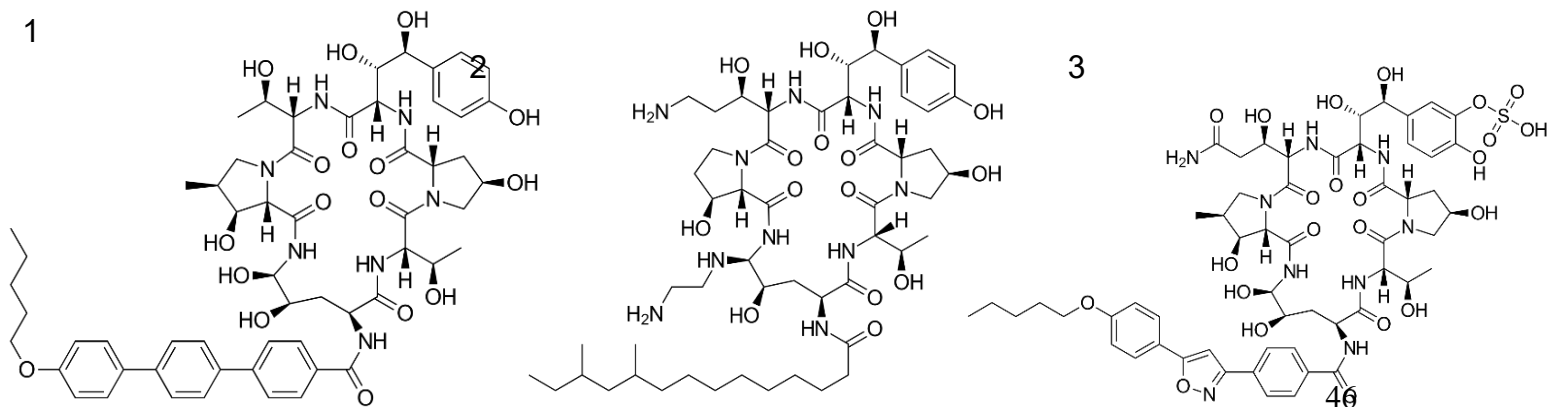


### 3.4.2.1.3

#### 3.4.2.1.4 Equinocandinas

Na década de 70 foi descoberto o primeiro antifúngico do tipo equinocandina (equinocandina B) (Figura 10), sua descoberta se deu por meio de uma triagem sistemática de microrganismos para descoberta de novos antimicóticos (VAN DAELE et al., 2019). Essas moléculas são lipo-hexapeptídeos produzidos diferentes fungos ascomicetos. Atualmente existem três equinocandinas aprovadas pelo FDA anidulafungina, caspofungina e micafungina, todos são amplamente utilizados para o tratamento de candidíase invasiva (EMRI et al., 2013). Esses medicamentos apresentam baixa solubilidade, porém se mostraram promissores devido serem fortemente ativos frente a espécies de cândidas resistentes aos azóis, terem pouca interação com outros medicamentos e serem bem tolerados pelos pacientes. Porém, com o uso crescente dessas medicações nos últimos dez anos, cepas resistentes já foram relatadas (FEKKAR et al., 2014).

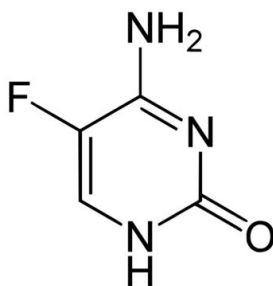
Figura 10 - Estrutura química das equinocandinas



### 3.4.2.1.5 Flucitosina

A flucitosina (Figura 11) um análogo fluorado da citosina, sua síntese foi feita pela primeira vez 1957. A flucitosina (5F) por si só não possui atividade fungicida, porém quando ela é captada por células fúngicas suscetíveis é convertida em 5-fluouracil (5FU) que é metabolizado a outros metabólitos que inibem a síntese de DNA e RNA (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). Essa medicação geralmente não é aplicada como uma monoterapia, porém em casos de candidemia é associado a Anfotericina B pelo sinergismo entre as medicações. A administração desse medicamento depende muito da capacidade renal do paciente, pois como a droga não é metabolizada pelo corpo humano cerca de 85-95% são excretadas pelos rins. Os principais efeitos colaterais são gastrointestinais, podendo também causar em casos mais graves hepatite aguda e nefrotoxicidade (PADDA; PARMAR, 2023).

Figura 11 - Estrutura química da flucitosina



### 3.4.2.1.6 Fatores de risco associados a resistência medicamentosa à antifúngicos

A resistência ocorre quando há a falha terapêutica a um fármaco administrado em uma dose considerada padrão (SHOR; PERLIN, 2015). Diversos fatores podem estar associados a falha terapêutica, tanto intrínsecos ao paciente, como por exemplo sistema imunológico comprometido, hospitalizados utilizando cateteres que favorecem infecções e a formação de biofilmes que impedem a ação correta do fármaco. Além disso, o uso de

antifúngicos para profilaxia ou fins terapêuticos cria uma pressão seletiva e favorece o crescimento de microrganismos resistentes (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Também, a exposição a fungicidas de uso agrícola que possuem formulações baseada em azóis, promove a existência de reservatórios ambientais de organismos resistentes (FARIA-RAMOS et al., 2014).

Esses fatores impulsionam o surgimento de alterações bioquímicas e genômicas que tornam as cepas fúngicas mais resistentes aos medicamentos (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021). Um dos principais mecanismos de resistência aos azóis é o mecanismo de bombas de efluxo de drogas na parede da célula fúngica, que diminui a ação do medicamento (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Outro mecanismo que pode levar a resistência é por meio da alteração ou regulação positiva do gene (ERG11) que codifica a enzima alvo de ação dos azóis (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

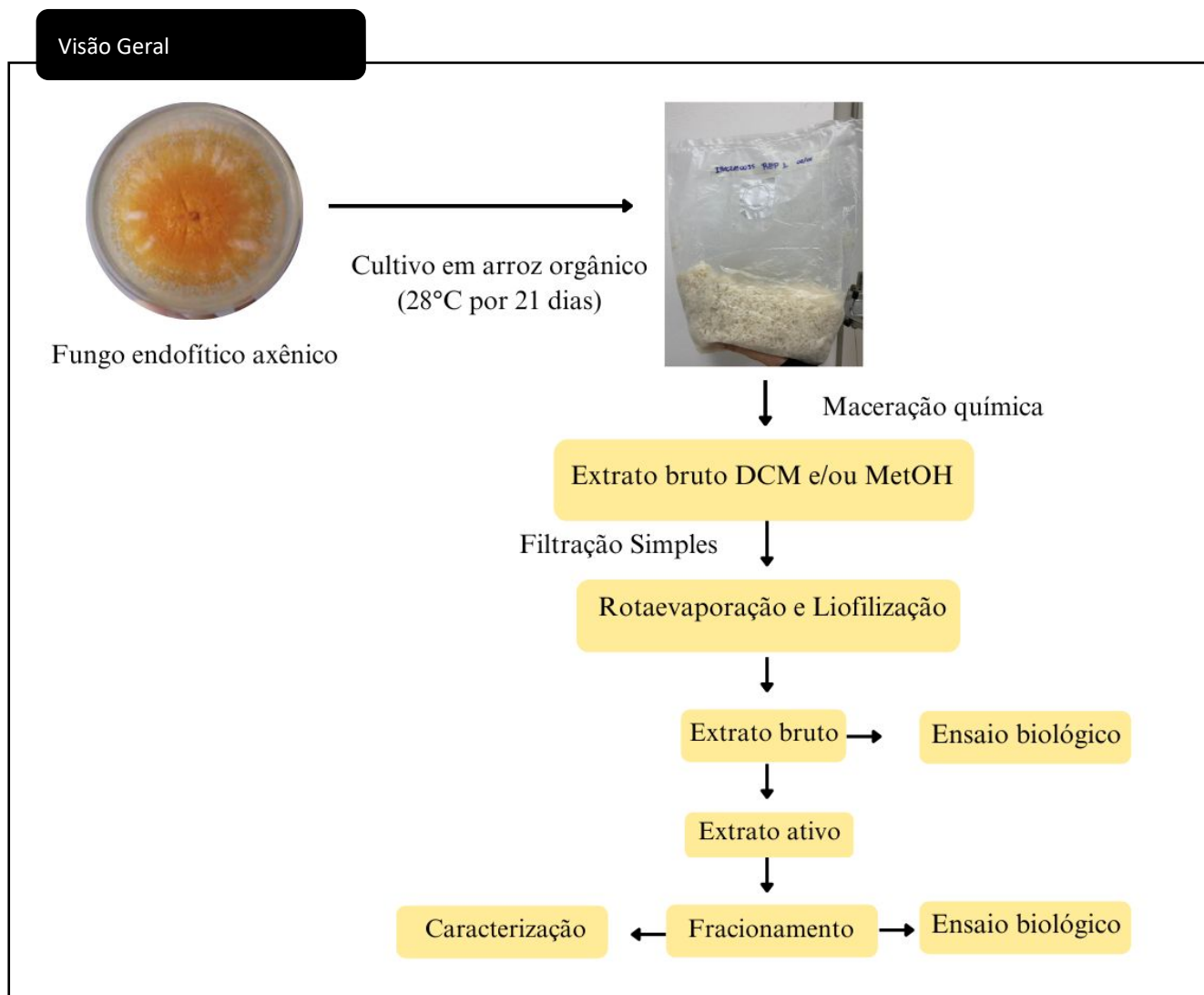
Como demonstrado ao longo desse tópico, o arsenal para o tratamento da candidíase é baseado em quatro classes de fármacos que são amplamente utilizados para outras infecções fúngicas e já enfrentam inúmeros casos de resistência. Fica evidente a necessidade de explorar o potencial terapêutico de produtos naturais derivados de fungos.



#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de facilitar o entendimento das metodologias utilizadas no projeto, um fluxograma foi criado para elucidação das principais etapas durante a execução dos experimentos (Figura 12). Todas as análises foram realizadas de forma bioguiada e os fungos endofíticos selecionados para o estudo foram previamente isolados e identificados pela Me. Isabela Maria Agustini da Silveira Bastos (BASTOS, 2022).

Figura 12 - Fluxograma referente a análise bioguiada dos extratos obtidos de fungos endofíticos



## 4.1 Fungos endofíticos

### 4.1.1 Isolamento

Os 12 fungos endofíticos investigados no presente estudo foram previamente isolados de três espécies vegetais (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*) encontradas nos manguezais do Itacorubi e de Ratoles no município de Florianópolis/SC e fazem parte do biobanco de fungos endofíticos Mário Steindel (MIP/CCB/USFC). Os fungos utilizados foram previamente identificados pelo sequenciamento da região ITS1 e pertencem a diferentes famílias, gêneros e espécies (Tabela 1).

Tabela 1 - Código e identificação de fungos endofíticos do biobanco utilizados para obtenção de extratos totais e frações

Código do fungo	Espécie Vegetal	Manguezal de isolamento	Identificação (gênero/espécie)
ILRR1A20047	<i>Laguncularia racemosa</i>	Itacorubi	<i>Curvularia</i> sp.
IRMC2A10035	<i>Rhizophora mangle</i>	Itacorubi	<i>Phyllosticta</i> sp.
IASF1A10001	<i>Avicennia schaueriana</i>	Itacorubi	<i>Neofusicoccum parvum</i>
RASC1B20231	<i>Avicennia schaueriana</i>	Ratoles	<i>Arthrimum</i> sp.
IASF2A10006	<i>Avicennia schaueriana</i>	Itacorubi	<i>Stemphylium</i> sp.
ILRF2A10022	<i>Laguncularia racemosa</i>	Itacorubi	<i>Trichoderma</i> Section Longibrachiatum
IASCM10015	<i>Avicennia schaueriana</i>	Itacorubi	<i>Bjerkandera</i> sp.
RASCM10119	<i>Avicennia schaueriana</i>	Ratoles	<i>Bjerkandera</i> sp.
ILRF1A10021	<i>Laguncularia racemosa</i>	Itacorubi	<i>Penicillium</i> Glabra series
RASFM10100	<i>Avicennia schaueriana</i>	Ratoles	<i>Phlebia</i> sp.
ILRF2A10023	<i>Laguncularia racemosa</i>	Itacorubi	<i>Buergerula spartinae</i>
IASFM30068	<i>Avicennia schaueriana</i>	Itacorubi	<i>Dothideomicetos/Muyocopron</i> sp.

Na criação do código para identificação de fungos endofíticos, foram consideradas diversas informações relevantes. Esse código é composto por dez caracteres que descrevem as características do ambiente de origem, da espécie vegetal hospedeira, o tecido de isolamento, do meio de cultivo, a localização geográfica da coleta e o número de

identificação do isolado. O primeiro caractere do código corresponde ao manguezal de isolamento do fungo endofítico, com "I" representando o Manguezal do Itacorubi e "R" o Manguezal do Ratonés. Os caracteres dois e três identificam a espécie vegetal hospedeira do fungo, com "AS" para *Avicennia schaueriana*, "LC" para *Laguncularia racemosa* e "RM" para *Rhizophora mangle*. O quarto caractere informa o tipo de tecido vegetal em que o fungo foi isolado, sendo "C" para caule, "F" para folha e "R" para raiz. O quinto caractere é um número que indica o meio de cultivo utilizado no isolamento do fungo, com "1" representando BDA (Agar Batata-Dextrose) e "2" correspondendo ao ágar Sabouraud. O sexto caractere, acompanhado de um número, descreve a localização geográfica específica da coleta, oferecendo informações adicionais sobre o local de isolamento. E por fim, os três últimos caracteres são referentes ao número total de isolados presentes no biobanco.

#### **4.1.2 Cultivo dos fungos endofíticos**

Cada isolado foi retirado do biobanco, armazenado em nitrogênio líquido, e cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose) por 14 dias à 28 °C em BOD.

#### **4.1.3 Obtenção do extrato total com Diclorometano e Metanol**

Inicialmente, para coletar o micélio das placas de Petri previamente cultivadas, adicionou-se 7 ml de uma solução de Tween 80 (0,01% v/v) em cada placa e procedeu-se à raspagem utilizando uma alça de Drigalski, resultando em uma suspensão micelial. Nessa etapa, foram utilizadas um total de nove placas de Petri contendo o isolado fúngico. Posteriormente, a suspensão micelial de três placas foi transferida para um único tubo de centrífuga de 50 ml, sendo repetido esse procedimento para as demais placas, resultando, ao final, em três tubos, cada um contendo a suspensão micelial proveniente de três placas de Petri.

Concomitante a esse processo, foram preparadas três bolsas de polipropileno (200 x 415 mm) contendo filtro de 0,22 µm, cada uma contendo 600 g de arroz orgânico e 600 ml de água destilada. Essas bolsas foram esterilizadas (121 °C por 15 min) e, após o resfriamento completo, foram inoculadas com as suspensões miceliais. Em seguida, as bolsas foram incubadas em uma câmara de crescimento (BOD) à 28 °C por 21 dias. Uma bolsa contendo arroz sem o fungo, cultivada nas mesmas condições foi utilizada para preparação de extrato total DCM e MeOH para servir de controle do experimento.

Para a preparação dos extratos contendo metabólitos secundários, os fungos previamente cultivados nas bolsas foram submetidos à maceração química. A extração, em um primeiro momento, foi realizada utilizando uma mistura dos solventes metanol e diclorometano (1:1). No entanto, com o objetivo de otimizar o processo e obter frações com perfis químicos diferentes, a maceração passou a ser realizada utilizando os solventes separadamente. Dessa forma, foi utilizado primeiramente o solvente diclorometano, no volume de 332 ml, deixando o cultivo em arroz incubado por 4 dias em temperatura ambiente e, logo após o período, o mesmo cultivo foi submetido a maceração com metanol, também no volume de 332 ml com o mesmo tempo de incubação.

Ao término desse processo dois extratos foram gerados e logo em seguida filtrados utilizando filtro de café Mellita<sup>®</sup> e, em seguida, submetidos à rotaevaporação sob pressão reduzida em banho-maria à 55 °C. Em seguida, todas as amostras foram secas em capelas de exaustão para garantir a completa evaporação do solvente orgânico. Após esse processo, os extratos foram congelados e liofilizados utilizando o equipamento LJ Up (JJ científica). Ao final do processo, os extratos liofilizados foram aliquotados e armazenados em um ultra freezer (-80 °C).

## **4.2 Avaliação da atividade biológica**

### **4.2.1 Cultivo da linhagem celular THP-1**

A linhagem celular THP-1 (ATCC<sup>®</sup> TIB202) foi cultivada em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100 µl/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (RPMI completo) e mantida à 37 °C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> (SERENO et al., 2001). A cultura foi repicada a cada quatro dias em uma concentração de 5.10<sup>5</sup> células/ml e utilizadas até a 15<sup>o</sup> passagem.

### **4.2.2 Cultivo dos parasitos**

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* da cepa MHOM/BR/74/PP75 e *Leishmania (L.) amazonensis* cepa MHOM/BR/77/LTB0016 ambas expressando o gene da β-galactosidase (Costa, 2015), foram cultivados à 26 °C em meio M199 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) suplementado com 10% de SFB e 2% de urina humana e repicadas em intervalo de quatro dias.

### 4.2.3 Triagem dos extratos totais e frações frente formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Para iniciar o teste foi adicionado 180 µl de parasitos *L. infantum* e *L. amazonensis*, na concentração de  $0,54 \times 10^6$  parasitos/ml, em microplacas de 96 poços. Em seguida, utilizando tréplicas, aos parasitos foram adicionados os extratos fúngicos para uma concentração final de 50 µg/ml diluídos em meio M199 com 1% de DMSO. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B (2 µM para *L. amazonensis* e 8 µM para *L. infantum*) (Sigma-Aldrich®) e controle negativo apenas M199 acrescido de 1% de DMSO. As placas foram incubadas por 70 horas em estufa à 26,5 °C. A seguir, foi adicionado 20 µl de uma solução contendo 250 µg/ml de resazurina, solubilizada em tampão PBS (pH 7,4), por 2 h à 37 °C. A fluorescência foi medida no equipamento Tecan® Modelo Infinite M200 com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. A mortalidade das células foi expressa como taxa de mortalidade que consiste na diminuição entre o branco da amostra e a triplicata experimental, dividido pela média do controle negativo menos um (Equação 1).

Equação 1 - Cálculo utilizado para a taxa de mortalidade

$$\frac{1(Ba - Ma)}{Mcn}$$

\*Ba: Branco da amostra (Poço que contém apenas o meio utilizado no teste e o composto)

\*Ma: Média da absorbância da amostra (Poço que contém parasito, meio e o composto)

\*Mcn: Média do controle negativo (Poço que contém apenas meio e parasito)

### 4.2.4 Concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) de extratos totais e frações, em células THP-1

Inicialmente, as células THP-1 ( $4 \times 10^4$ ) foram cultivadas em microplacas de 96 poços, com um volume de 180 µl do meio RPMI-1640 completo. Em seguida, as células foram diferenciadas em macrófagos utilizando 100 ng de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato). Após 72 horas de incubação à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultivo foi substituído por 180 µl de RPMI-1640 completo. Os extratos fúngicos solubilizados em dimetilsulfóxido (Merck) e ajustados para uma concentração de 50 mg/ml. Em seguida, foi

realizada uma diluição seriada utilizando RPMI-1640 contendo 1% de DMSO, resultando em diferentes concentrações de extratos fúngicos (500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 15,6 µg/ml). Para a montagem do experimento, adicionou-se 20 µl de cada diluição aos 180 µl de células THP-1 diferenciadas. Os testes foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas, sendo as placas incubadas à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

Ao final do período de incubação, as células foram incubadas com 20 µl (250 µg/ml) do corante resazurina por 24 horas em uma estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A fluorescência foi medida após esse período utilizando um leitor de microplacas Tecan® Modelo Infinite M200, com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. Os valores de CC<sub>50</sub> foram calculados por meio de curvas concentração-resposta, utilizando um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 8.0.1. Como controle negativo, foi utilizado meio RPMI-1640 contendo 1% de DMSO, enquanto o controle positivo consistiu em DMSO a 50%.

#### **4.2.5 Concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de extratos e frações, em formas amastigotas *Leishmania* spp.**

A metodologia foi aplicada apenas para extratos com atividade em formas promastigotas. Para tanto, 4x10<sup>4</sup> células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos e infectadas com promastigotas metacíclicos obtidos no 4º dia de cultivo das espécies *L. infantum* ou *L. amazonensis*, na razão parasito/célula de 40:1 por 4 h à 34°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período, os parasitos que não aderiram as células foram removidos por uma lavagem com PBS (pH 7,4) e as células infectadas foram incubadas com 180 µl de meio RPMI-1640 suplementado com 5% de SFB por mais 24 horas para permitir a transformação de promastigotas em amastigotas intracelulares. A seguir diferentes concentrações de 180 até 2,8 µg/ml de cada extrato diluído em meio RPMI-1640 contendo 1% DMSO foi adicionado às monocamadas e as microplacas incubadas por 72 h à 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle negativo foi utilizado o meio M199 contendo 1% de DMSO e como controle positivo Anfotericina B (Sigma-Aldrich®) na concentração de 1,8 µg/ml para *L. amazonensis* e 7,3 µg/ml para *L. infantum*. Para a avaliação da atividade leishmanicida foi utilizado 200 µl CPRG (Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) (100 µM), incubado por 4 h à 37°C e a seguir, realizada a leitura de absorbância no equipamento Tecan® Modelo Infinite M200 à 570 nm com referência em 630 nm. A CI<sub>50</sub> foi calculada plotando-

se curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03.

#### 4.2.6 Cultivo das leveduras

Seguindo a metodologia descrita pelo Brcast 2023 as espécies *C. albicans* (ATCC® 10231), *C. tropicalis*, *C. glabrata* (ATCC® 723), *C. kruzei* (ATCC® 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC® 22019) foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Saboroud dextrose à 28 °C por 18-48 h.

#### 4.2.7 Triagem dos extratos totais fúngicos e suas frações em *Candida* spp.

Após o período, o inóculo foi preparado utilizando 5 colônias distintas (>1mm de diâmetro) em 9 ml de água destilada estéril e a densidade celular foi ajustada para uma escala 0,5 McFarland medindo a absorbância a 530 nm em espectrofotômetro, resultando em uma concentração de  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml. Em seguida, o inóculo foi diluído em meio RPMI-1640 obtendo uma concentração final de  $0,5-2,5 \times 10^5$  CFU/ml. Noventa µl da suspensão foi inoculada por poço em microplacas de 96 poços e adicionado 10 µl dos extratos totais na concentração de 90 µg/ml diluídos em meio RPMI- 1640 com 1% de DMSO. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (Sigma-Aldrich®), 8 µM e como controle negativo RPMI-1640 acrescido de 1% de DMSO. As placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C e a seguir lidas em leitor de microplaca Tecan® Modelo Infinite M200 na absorbância de 530 nm. Para o cálculo da taxa de mortalidade foi utilizado a diminuição entre o branco da amostra e a triplicata experimental, dividido pela média do controle negativo menos um (Equação 1).

Equação 2 - Fórmula para o cálculo de mortalidade

$$1 - \frac{(B - A)}{M e CN}$$

B: Branco A: amostra MeCN: Média do controle negativo

##### 4.2.7.1 Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos totais fúngicos e suas frações em *Candida* spp.

Para determinação da concentração mínima inibitória, as espécies de *Candida* spp. foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Saboraud e após o período de 24

h, cinco colônias foram suspendidas em 3 ml de água destilada estéril e homogeneizadas com auxílio de agitador. Para obter a concentração na escala de 0,5 McFarland, o que equivale a de  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 530 nm e concentração de células na placa final foi ajustada para  $0,5-2,5 \times 10^5$  UFC/ml, adicionando-se 3 ml de meio RPMI-1640. Os extratos fúngicos foram diluídos serialmente utilizando meio RPMI-1640 com 10% DMSO, e as concentrações variaram de 200 a 5,6 µg/ml. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B e como controle negativo meio RPMI-1640 com 1% DMSO. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para sua validação. Para o cálculo definiu-se MIC como a menor concentração que inibiu 90% do crescimento das leveduras (BrCAST 2023).

#### **4.2.8 Atividade hemolítica dos extratos totais ativos**

Para a análise da presença de atividade hemolítica dos extratos fúngicos foi utilizado 2 ml de sangue humano total, coletado por punção intravenosa em um tubo contendo EDTA. O sangue foi homogeneizado, diluído em 18 ml de solução salina (NaCl 0,85% e CaCl<sub>2</sub> 10 nM) e centrifugado à  $2500 \times g$  por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido três vezes. Após as centrifugações, um volume de 400 µl de hemácias foi diluído em 19.600 µl de solução salina. A exceção dos poços controle (branco), nos quais foram adicionados apenas 180 µl de salina, a cada poço da placa foi dispensado 180 µl de solução de hemácia à 2%. Os extratos fúngicos foram solubilizados em DMSO na concentração de 50 mg/ml e adicionados aos poços em concentrações variando de 50 até 0,75 µg/ml. Como controle negativo da técnica foi utilizado DMSO 1% e o controle positivo foi 1% Triton x-100 (Sigma-Aldrich®). A placa foi incubada por 3 horas à 37 °C sob constante agitação (180 rpm), centrifugada à  $3500 \times g$  por 4 min à 4 °C, o sobrenadante transferido para uma nova placa de 96 poços e efetuada a leitura no Tecan® Modelo Infinite M200 à 540nm com referência em 630 nm. O percentual da hemólise foi calculado de acordo com a equação 2.

Equação 3 - Fórmula do percentual de hemólise

$$\%Hemólise = \frac{ABScn - ABSa}{ABScp - ABScn} \times 100$$



\*ABScn: absorbância controle negativo

ABSa: absorbância amostra

ABScp: absorbância controle positivo

### **4.3 Análises estatísticas e cálculos aplicados aos ensaios biológicos**

#### **4.3.1 Fator Z**

Para a validação dos resultados todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e a análise de qualidade medida pelo fator Z. O fator Z é uma medida que avalia a confiabilidade e qualidade do teste, isso ocorre por meio da análise entre as médias e os desvios padrões dos controles positivos e negativos estabelecidos para cada teste. Para o ensaio ser validado foi adotado que o valor de  $Z > 0,5$  (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999).

#### **4.3.2 Índice de seletividade (IS)**

O índice de seletividade (IS) é a relação entre citotoxicidade do composto para células de mamíferos e sua atividade antileishmania. Esse índice foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para macrófagos ( $CC_{50}$ ) e a atividade contra amastigotas ( $CI_{50}$ ).

### **4.4 Caracterização química dos extratos fúngicos totais e suas frações**

A análise qualitativa dos metabólitos foi realizada pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo.

#### **4.4.1 Cromatografia por camada delgada (CCD)**

Para a análise inicial do perfil metabólico dos extratos totais foi realizada a cromatografia em camada delgada. Como controle, foram utilizadas duas extrações realizadas apenas com arroz, uma utilizando metanol e outra diclorometano. As amostras foram aplicadas em placas cromatográficas de sílica gel (Sigma-Aldrich®), na concentração de 50 µg/ml obedecendo um espaçamento de 0,5 cm. A solução diclorometano + 5% de metanol (v/v) foi utilizada como fase móvel para eluição das amostras. Após eluição, a

cromatoplaça foi exposta em câmara de UV, 365 nm e 254 nm e, em seguida, revelada com uma solução de vanilina sulfúrica acompanhada de com soprador térmico até 110 °C.

#### **4.4.2 Fracionamento líquido-líquido dos extratos totais fúngicos**

Após a obtenção do extrato total produzido de acordo com o tópico 4.1.2, os extratos que apresentaram atividade foram submetidos ao particionamento do extrato total por meio da técnica de extração líquido-líquido com solventes distintos, todos em ordem crescente de polaridade. Para tanto, foi utilizado o funil de separação com a amostra dissolvida em água destilada e submetidas a partição na seguinte ordem: hexano (FHEX), acetato de etila (FACOET) e butanol (FBUT). A fração restante foi classificada como fração aquosa (FH<sub>2</sub>O). Após o particionamento, as frações foram rotaevaporadas em temperatura controlada de 40°C e pressão reduzida e liofilizadas utilizando o equipamento LJ Up (JJ científica). Ao final do processo as amostras obtidas foram armazenadas em ultra freezer (-80 °C).

##### **4.4.1 Cromatografia flash das frações fúngicas**

A frações que demonstraram atividade seguiram para o fracionamento no equipamento de cromatografia flash Isolera™ One (Biotage®) equipado com coluna Biotage® Sfär Silica (Biotage®). A amostra foi solubilizada em AcOEt aplicada em pastilha preparativa Samplet® (Biotage®) e deixada secar anteriormente à análise. O sistema de eluição foi composto de um sistema isocrático de hexano (A) e acetato de etila (B), com um fluxo contínuo de 20 ml/min, nas seguintes condições: 70% (A), 30% (B) por 18 CVs; 60% (A), 40% (B) por 18 CVs; 50% (A), 50% (B) por 18 CVs; 40% (A), 60% (B) por 18 CVs, 30% (A), 70% (B) por 18 CVs e as frações foram reunidas por similaridade de polaridade. Para realizar a retirada do restante da amostra retida na pastilha e coluna, o sistema de eluição foi alterado para um sistema isocrático de metanol 100% por 18 CVs em fluxo de 40 ml e coletada em uma única fração.

##### **4.4.2 Análise UPLC-ESI-QTOF MS das subfrações fúngicas**

Foram pesados 1,6 mg das frações fúngicas e diluídos em 2 ml de DMSO grau HPLC para gerar uma solução com concentração de 800 µg/ml, que foi filtrada em vial utilizando um filtro de 0,22 µm. Um sistema UPLC (Waters) equipado com um detector de fotodiodos (PDA), gerenciador de amostras e um gerenciador de solvente quaternário, bem como uma coluna fase reversa (BEH, C18 de 5x1 cm e 1,7 µm de partículas) foi usado para

a separação. A coluna e a bandeja de amostras foram mantidas a temperaturas de 40 °C e 20 °C, respectivamente. Um volume de amostra de 2 µl foi submetido a uma condição de gradiente da fase móvel contendo água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) a uma taxa de fluxo constante de 0,3 ml.min<sup>-1</sup>: 0-1 min, 90% de A; 1–12 min, 10% de A; 12–14 min, 10% de A; 14-15 min 90% de A; 15-20 min, 90% de A.

Um espectrômetro de massa da Xevo G2-S QToF (Waters) com uma sonda de ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos de ionização positivo e negativo foi acoplado ao sistema UPLC e usado para detectar os componentes químicos de cada fração. A amostra de referência foi leucina encefalina com massas de referência em m/z 554,2615 (ESI<sup>-</sup>) e 556,2771 (ESI<sup>+</sup>). Os dados foram adquiridos em um intervalo de 100-1500 Da, em um tempo de varredura de 1,0s durante 20 min.

As fórmulas moleculares foram determinadas utilizando a ferramenta de composição elementar do MassLynx V4.1, com erro de até 5 ppm. A busca pelas substâncias foi feita na base de dados SciFinder e a identificação suportada pelo perfil de fragmentação.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtenção de extratos totais

Foram obtidos 21 extratos totais, sendo nove extratos diclorometano (EDCM), nove extratos metanólicos (EMEIOH) e três extratos utilizando os dois solventes (EDCM/MEIOH) (Tabela 2).

Tabela 2 - Extratos totais obtidos de 12 isolados de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina

Código	Identificação molecular	Solventes	Extratos finais	Rendimento extrato total
ILRR1A20047	<i>Curvularia</i> sp.	DM	EDCM/MEIOH0047	7,16g
IRMC2A10035	<i>Phyllosticta</i> sp.	D-M	EDCM035 e EMEIOH035	Metanol- 23g DCM-257mg
IASF1A10001	<i>Neofusicoccum parvum</i>	D-M	EDCM001 e EMEIOH001	Metanol- 7,39g DCM- 40mg
RASC1B20231	<i>Arthrimum</i> sp.	D-M	EDCM231 e EMEIOH231	Metanol – 21g DCM- 300mg
IASF2A10006	<i>Stemphylium</i> sp.	D-M	EDCM006 e EMEIOH006	Metanol- 8g DCM- 322mg
ILRF2A10022	<i>Trichoderma</i> Section longibrachiatum	D-M	EDCM022 e EMEIOH022	Metanol – 8g DCM- 400mg
IASCM10015	<i>Bjerkandera</i> sp.	D-M	EDCM015 e EMEIOH015	Metanol- 320g DCM-470mg
RASCM10119	<i>Bjerkandera</i> sp.	DM	EDCM/MEIOH119	15,02g
ILRF1A10021	<i>Penicillium</i> Glabra series	DM	EDCM/MEIOH021	13g
RASFM10100	<i>Phlebia</i> sp.	D-M	EDCM100 e EMEIOH100	Metanol- 4,78g

ILRF2A10023	<i>Buergerula spartinae</i>	D-M	EDCM023 e EMEOH023	DCM- 290mg Metanol – 2,91g DCM- 280mg
IASFM30068	<i>Dothideomicetos/Muyocopron sp.</i>	D-M	EDCM068 e EMEOH068	Metanol-22g DCM-576mg

\*M- metanol

\*D- diclorometano

\*D-M – obtenção dos extratos totais por meio da maceração química utilizando primeiramente diclorometano e em seguida o metanol.

\*EDCM/MEOH – extrato gerado com a junção de ambos os solventes;

\*EDCM – extrato gerado apenas com diclorometano;

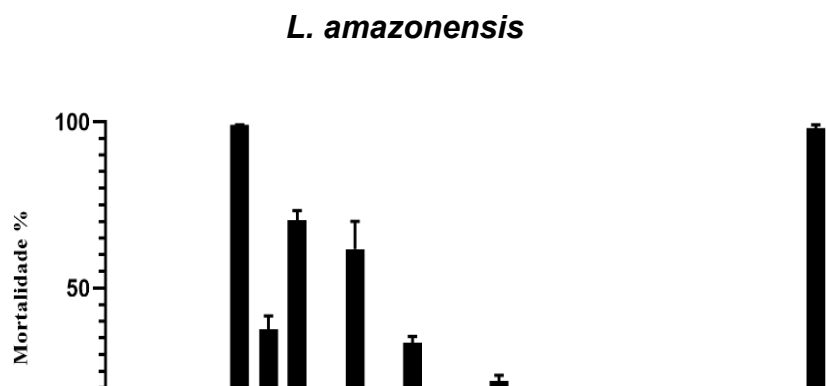
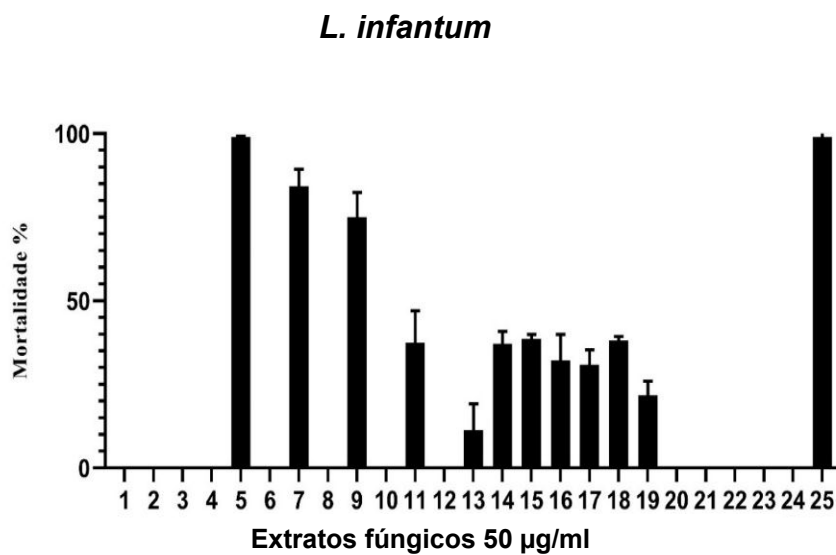
\*EMEHOH – extrato gerado apenas com metanol.

## 5.2 Atividade biológica dos extratos totais de fungos endofíticos

### 5.2.1 Triagem dos extratos fúngicos contra formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Para avaliar a atividade antileishmania dos extratos fúngicos foi realizada primeiramente uma triagem na concentração de 50 µg/ml frente a formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* (Figura 13).

Figura 13 - Taxa de mortalidade de promastigotas das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* frente aos extratos fúngicos na concentração de 50 µg/ml





**Extratos fúngicos 50 µg/ml**

Cada número representa um extrato fúngico e os controles: 1-EDCM/MEOH0047; 2-EDCM/MEOH035; 3-EDCM001; 4-EMEOH001; 5-EDCM231; 6-EMEOH231; 7-EDCM006; 8-EMEOH006; 9-EDCM022; 10-EMEOH022; 11-EDCM015; 12-EMEOH015; 13-EDCM/MEOH119; 14-EDCM/MEOH021; 15-EDCM/MEOH023; 16-EDCM023; 17-EMEOH023; 18-EDCM100; 19-EMEOH100; 20-EDCM068; 21-EMEOH068; 22-EDCMARROZ; 23-EMEOHARROZ; 24-Controle negativo (RPMI 1640 com 1% DMSO); 25-Controle positivo (anfotericina B)

Os extratos que produziram taxa de mortalidade > 50% para ambas as espécies de *Leishmania* foram obtidos por meio da maceração química com diclorometano. Esses extratos são provenientes dos isolados *Arthrinium* sp. (EDCM231) (5), *Stemphylium* sp. (EDCM006) (7) e *Trichoderma longibrachiatum* (EDCM022) (9) (Figura 5) determinaram, em média, mortalidade acima de 60% contra *L. amazonensis* e acima de 75% contra *L. infantum*. O EDCM231 foi o mais ativo ocasionando mortalidade superior a 90% contra ambas as espécies.

### 5.2.2 Atividade citotóxica média (CC<sub>50</sub>) em célula THP-1 e avaliação da concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>) dos extratos totais fúngicos contra formas amastigotas de *Leishmania*

Os extratos EDCM231, EDCM006, EDCM022 foram selecionados para a avaliação de citotoxicidade utilizando como modelo a linhagem celular monocítica humana (THP-1). O extrato que apresentou a maior citotoxicidade foi EDCM231, sendo em média 5,5 vezes mais citotóxico do que os extratos EDCM006 e EDCM022 (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de concentração citotóxica média em células THP-1, concentração inibitória média e índice de seletividade em formas amastigotas intracelulares das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* utilizando diferentes extratos totais.

Extrato	CC <sub>50</sub> (µg/ml)		CI <sub>50</sub> (µg/ml)		IS	
	THP1		LI	LA	LI	LA

<b>EDCM231</b>	45,48	31,02	39,09	1,4	1,1
<b>EDCM006</b>	229,63	112,67	81,92	2	2,8
<b>EDCM022</b>	267,66	103,47	117,57	2,5	2,2

\*CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica a 50% das células; CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória a 50% dos parasitos; IS – Índice de seletividade; LA – *L. amazonensis*; LI – *L. infantum*

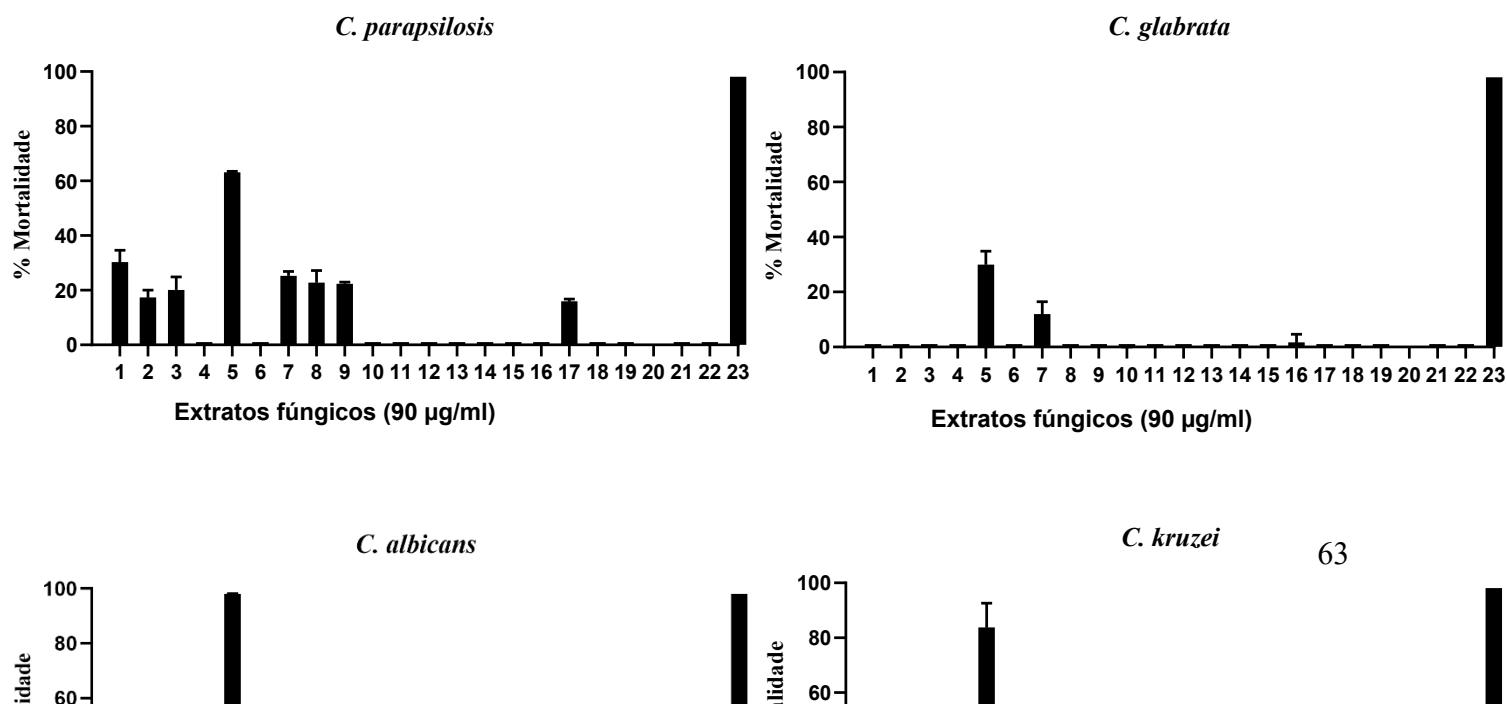
O ensaio de CI<sub>50</sub> utilizando as formas intracelulares foi realizado para avaliar a atividade dos extratos frente a forma infectiva da doença. O extrato EDCM231 foi o que apresentou os menores valores de CI<sub>50</sub>, sendo, 31,02 e 39,09 para *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente. Os extratos EDCM006 e EDCM022 apresentaram valores de CI<sub>50</sub> semelhantes para ambas as espécies (Tabela 3).

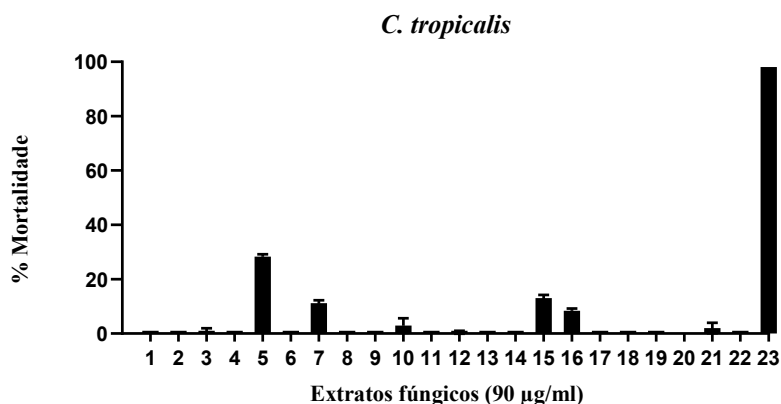
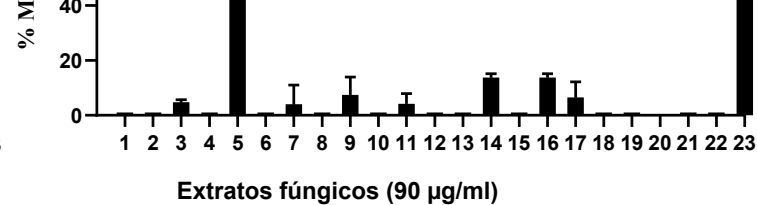
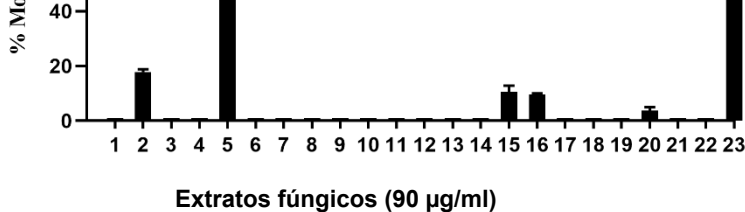
O índice de seletividade do extrato EDCM006 e do extrato EDCM231 frente a forma amastigota de *L. amazonensis* foi de 2,8 e 1,1, respectivamente.

### 5.2.3 Triagem dos extratos fúngicos frente a *Candida* sp.

Inicialmente, para avaliar a atividade dos extratos frente as leveduras das 5 espécies de *Candida* sp., utilizou-se uma única concentração (90 µg/ml) de cada extrato (Figura 14). Durante o preparo dos extratos para a testagem o extrato EDCM/MEOH23 não apresentou volume suficiente para ter a atividade biológica avaliada. Também, os controles EDCMARROZ e MEOHARROZ, não apresentavam uma quantidade suficiente, dessa forma foi decidido juntá-los para obter amostra suficiente para a testagem.

Figura 14 - Taxas de mortalidade de cinco espécies de *Candida* spp. utilizando diferentes extratos fúngicos totais na concentração de 90 µg/ml





Cada número representa um extrato fúngico e os controles: 1-EDCM/MEOH0047; 2-EDCM/MEOH035; 3-EDCM001; 4-EMEOH001; 5-EDCM231; 6-EMEOH231; 7-EDCM006; 8-EMEOH006; 9-EDCM022; 10-EMEOH022; 11-EDCM015; 12-EMEOH015; 13-EDCM/MEOH119; 14-EDCM/MEOH021; 15-EDCM023; 16-EDCM23 17-EDCM100; 18-EMET100; 19-EDCM068; 20-EMEOH068; 21-EDCM/MEOHARROZ; 22-Controle

O extrato EDCM231 (5) demonstrou considerável atividade antifúngica contra *C. albicans* (98%) e *C. kruzei* (81%). No entanto, em relação às espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, as taxas de mortalidade foram de 36%, 37% e 62%, respectivamente, não atingindo o limiar de significância (>70% taxa de mortalidade). Embora tenha havido discrepâncias nas respostas de mortalidade entre algumas espécies submetidas às mesmas concentrações do extrato EDCM231 (5), optou-se por continuar a investigação com o extrato nos próximos experimentos devido à atividade apresentada em *C. albicans* e *C. kruzei*.



#### 5.2.4 Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos fúngicos frente a *Candida* sp.

Após a triagem, foi realizada uma diluição seriada do extrato EDCM231 variando da concentração de 200 – 5,6 µg/ml para definir a concentração inibitória mínima (MIC). A mesma concentração inibitória mínima (150 µg/ml) foi obtida para o extrato EDCM231 frente as espécies *C. tropicalis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (Tabela 4). O MIC mais reduzido (~100 µg/ml) foi encontrado apenas utilizando a espécie *C. albicans*. Mesmo com diferenças no valor de MIC, o extrato EDCM231 demonstrou-se ativo frente todas as espécies de *Candida* sp. em uma faixa de concentração semelhante. Ao final do teste foi realizada o teste de esgotamento nas placas de Petri contendo BDA, e após 24h de crescimento à 28°C nenhuma das espécies apresentou crescimento na concentração de MIC.

Tabela 4 - Valores da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato total diclorometano (EDCM231) obtido do fungo *Arthrinium* sp. frente as cinco espécies de *Candida* sp

Extrato	MIC				
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruzei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
EDCM231	150 µg/ml	150 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml

#### 5.2.5 Atividade hemolítica dos extratos totais fúngicos

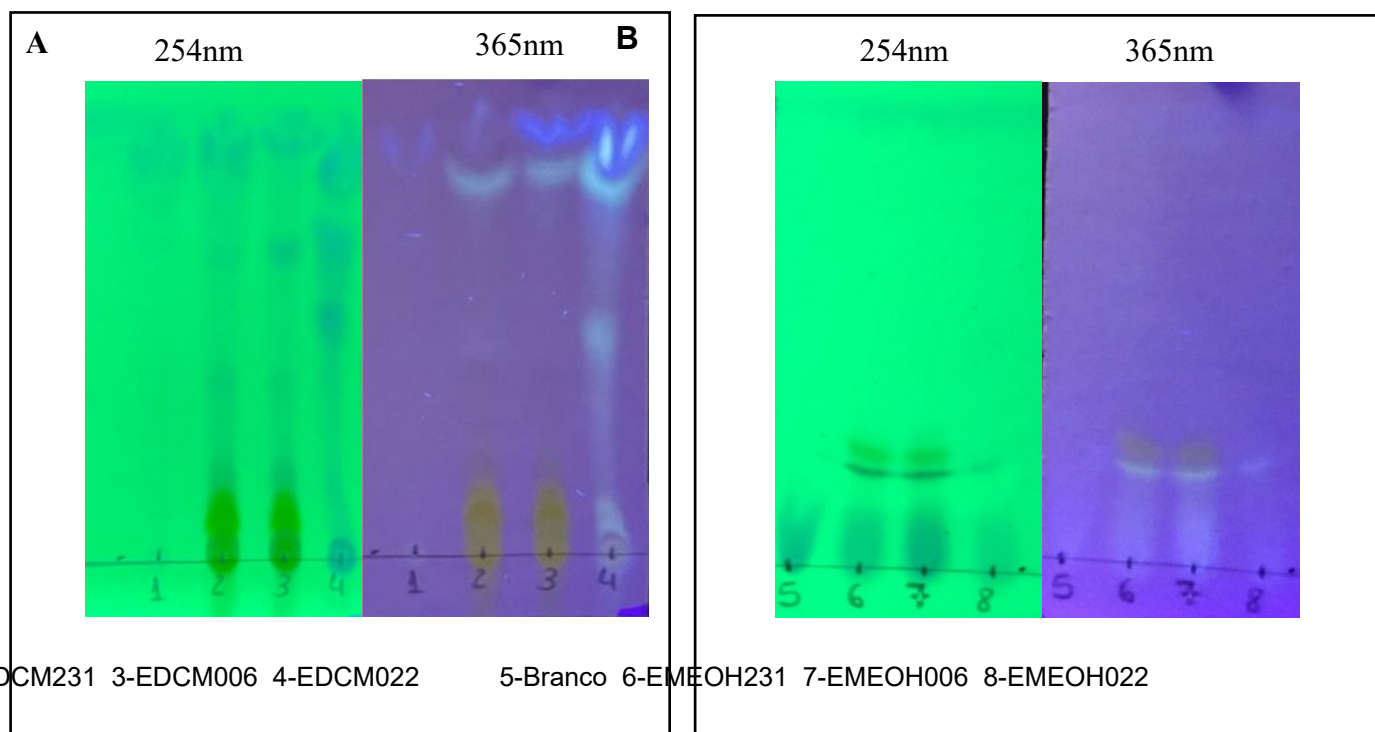
Os resultados de atividade hemolítica dos extratos totais apresentaram semelhança aos de citotoxicidade, sendo o extrato EDCM231 o com maior atividade de β-hemólise, resultando em 30% de hemólise nas concentrações 50-12,5 µg/ml. Os extratos EDCM006 e EDCM022, apresentaram atividade hemolítica de 16% e 8% na concentração de 50 µg/ml, respectivamente.

### 5.3 Caracterização química do extrato total obtido dos fungos endofíticos

A fim de iniciar a compreensão do perfil químico dos extratos a metodologia de cromatografia de camada delgada (CCD) foi aplicada. Considerando que apenas os extratos diclorometano (EDCM231, EDCM022 e EDCM006) apresentaram atividade biológica, a utilização dos mesmos extratos metanólicos (EMET231, EMET022 e EMET006) serviu

para comparar a complexidade dos perfis químicos entre as diferentes solventes. Como controle (branco) foi utilizado a extração apenas do arroz com ambos os solventes. Para a execução da técnica todas as amostras foram ajustadas na concentração de 50 mg/ml e um volume de 20 µl foi aplicado na placa em intervalo de distância regular de 0,5 cm. Por meio da CCD foi possível observar a riqueza do perfil químico nos dois solventes utilizados (Figura 15 A e B).

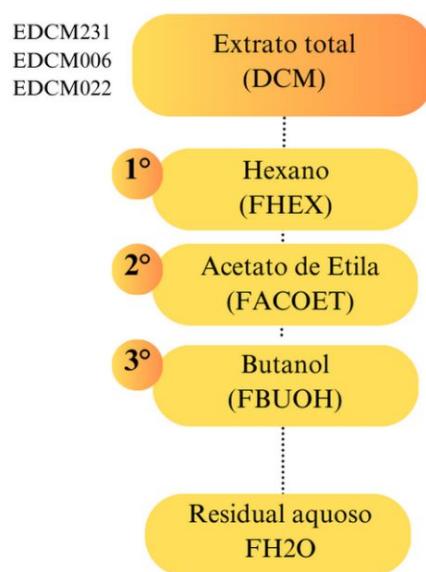
Figura 15 - Análise de cromatografia de camada delgada representativa do perfil químico dos extratos fúngicos obtidos por Diclorometano (DCMARROZ; EDCM231; EDCM006; EDCM022) (A) e Metanol (EMEOHARROZ; EMEOH231; EMEOH006; EMEOH022) (B) revelados em luz ultravioleta



#### 5.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos fúngicos fracionados

Após a análise de CCD os extratos totais de maior atividade (EDCM231; EDCM006 e EDCM022) foi realizada a metodologia de separação líquido-líquido, diluindo-se separadamente os extratos em água e extraíndo com solventes não miscíveis em ordem crescente de polaridade (Figura 16). No final do processo, foram obtidas quatro frações de cada extrato derivadas dos seguintes solventes: hexano, acetato de etila, butanol e água (Tabela 5).

Figura 16 - Fluxograma das etapas do fracionamento líquido-líquido dos extratos DCM ativos com uma ordem crescente de polaridade



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a liofilização desafios como o rendimento das frações foram enfrentados. As frações butanólica e aquosa dos extratos EDCM23 e EDCM006 não renderam quantidade de amostra que pudessem ser testadas biologicamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Frações obtidas após a liofilização do fracionamento dos extratos fúngicos EDCM231; EDCM006 e EDCM022 em diferentes solventes

Extrato total	Fração Hexano	Fração AcOEt	Fração Butanol	Fração Aquosa
EDCM231	FHEX231	FACOET231	N/A	N/A
EDCM006	FHEX006	FACOET006	N/A	N/A
EDCM022	FHEX022	FACOET022	FBUT022	FH <sub>2</sub> O22

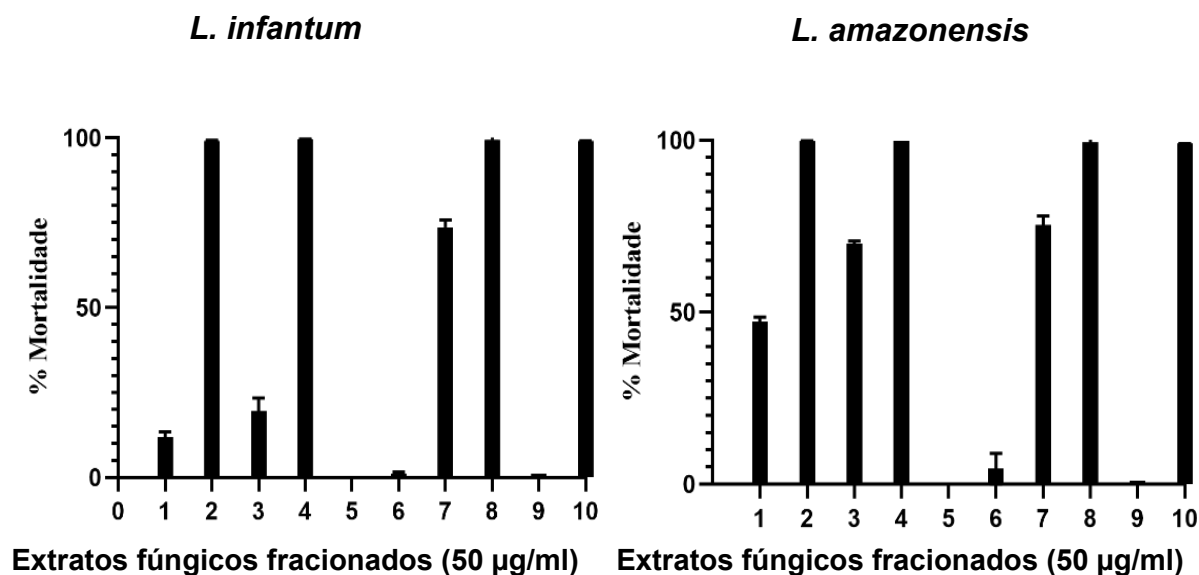
\*N/A: Quantidade insuficiente para análise biológica \*Acoet: Acetato de etila

O extrato total EDCM231 apresentou rendimento muito menor quando comparado aos outros dois extratos totais. Dessa forma, foi realizado um novo cultivo do fungo e obtido um novo extrato total DCM. Após o processo de fracionamento e liofilização, não foi obtido quantidade suficiente das frações butanólica e aquosa para os testes biológicos (Tabela 5).

#### 5.4.1 Triagem das frações contra formas promastigotas de *Leishmania* sp.

Para a triagem da atividade antileishmania das frações, uma concentração única de 50 µg/ml foi utilizada. A fração FACOET dos três fungos *Arthrimum* sp., *Trichoderma longibrachitum* e *Stemphylium* sp. ocasionou uma mortalidade média de 99% das formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania* testadas.

Figura 17 - Taxa de mortalidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* na concentração de 50 µg/ml da fração acetato de etila dos fungos colocar os nomes EDCM231, EDCM006 e EDCM022



Cada número representa uma fração e os controles: 1- FHEX006 2- FACOET006 3- FHEX022 4- FACOET022 5-FBUT022 6- FH2O022 7-FHEX231 8-FACOET231 9- Controle negativo (RPMI 1% DMSO) 10- Controle positivo (anfotericina B). FHEX= Fração hexânica, FBUT= Fração butanólica, FACOET= Fração acetato de etila FH2O= Fração aquosa.

Em relação as frações hexânicas, a fração FHEX231 apresentou a taxa de mortalidade superior a 75% para ambas as espécies. A fração FHEX022 apresentou uma mortalidade expressiva frente a *L. amazonensis* (~70%), porém ele não foi observado para a espécie de *L. infantum* (~20%) (Figura 17). Assim, as frações FACOET231, FACOET006, FACOET022 e FHEX231 foram submetidas aos seguintes testes biológicos.

#### 5.4.2 Atividade citotóxica média (CC<sub>50</sub>) na linhagem celular THP-1 e avaliação da concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>) contra formas amastigotas de *Leishmania*

As frações acetato de etila dos (FACOET231, FACOET006, FACOET022) e a fração de hexano (FHEX231) foram submetidas ao teste de citotoxicidade em células THP-1 e atividade contra formas amastigotas intracelulares. A fração FACOET231 apresentou maior citotoxicidade (CC<sub>50</sub> 24,51 µg/ml). Por outro lado, a fração menos citotóxica foi FACOET006 (CC<sub>50</sub> 169,7 µg/ml) (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de concentração citotóxica média para a linhagem celular THP-1, concentração inibitória média contra formas amastigotas intracelulares das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* e índice de seletividade.

Extrato	CC <sub>50</sub> (µg/ml)		CI <sub>50</sub> (µg/ml)		IS	
	THP-1		LA	LI	LA	LI
<b>FACOET006</b>	169,7		43,94 (36,02 - 54,23)	47,55 (38 - 61,06)	3,9	3,5
<b>FACOET022</b>	95,19		72,80 (58,47 - 92,21)	61,14 (45,57 - 84,71)	1,3	1,5
<b>FACOET231</b>	24,51		12,75 (9,57 - 19,56)	14,88 (11,20 - 19,5)	1,9	1,6
<b>FHEX231</b>	61,36		15,63 (11,25 - 23,01)	21,36 (18,56 - 24,83)	3,9	2,8

\*CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica média; CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória média; IS – Índice de seletividade; LA – *L. amazonensis*; LI – *L. infantum*

Em relação as CI<sub>50</sub> para amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp., a fração FCAOET231 apresentou CI<sub>50</sub> 12,75 µg/ml *L. amazonensis* e 14,88 µg/ml para *L. infantum*. A fração FHEX231 apresentou expressiva atividade frente ambas as espécies de

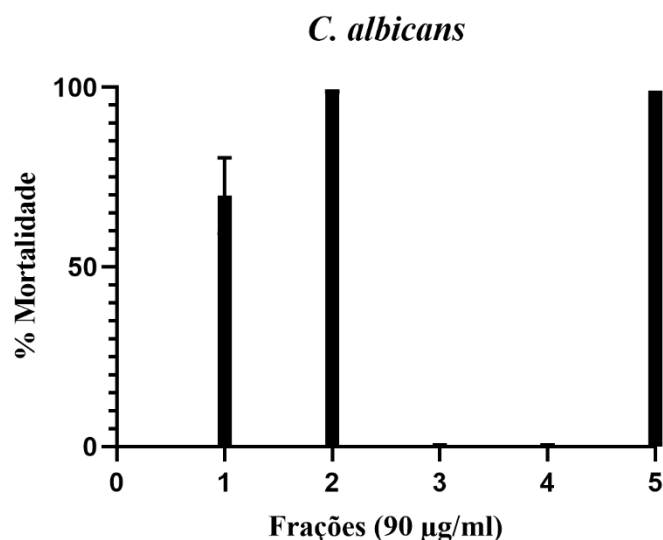
*Leishmania*. Os índices de seletividade foram baixos para todas as frações, chegando próximo a 4 para a fração FACOET006 (Tabela 6).

#### 5.4.3 Triagem dos extratos fúngicos fracionados frente *Candida* sp.

Uma vez que o extrato total EDCM231 foi o responsável pela atividade antifúngica frente as diferentes espécies de *Candida* sp., apenas as frações originadas desse extrato foram selecionadas para a triagem (FHEX231, FACOET231 e FH<sub>2</sub>O231). Nesse experimento as frações foram avaliadas utilizando apenas espécie *C. albicans*.

Os resultados mostraram que a maior taxa de mortalidade de *C. albicans* foi determinada pela fração FACOET (99%) (Figura 18). Já a fração FHEX231 ocasionou uma taxa de mortalidade próxima a 70%. Dessa forma, ambas as frações (FACOET e FHEX231) foram mantidas para as análises seguintes.

Figura 18 Taxa de mortalidade determinada pelas frações acetato de etila e hexânica do fungo *Arthrinium* sp., na concentração de 90 µg/ml



Cada número representa uma fração e os controles: 1-FHEX231 2-FACOET231 3-FH<sub>2</sub>O231 4- Controle negativo (RPMI1640 1% DMSO) 5- Controle positivo (Anfotericina B)

#### 5.4.4 Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos fúngicos fracionados frente a *Candida* sp.

A frações (FACOET231 e FHEX231) foram utilizadas no ensaio para o cálculo de MIC com concentrações que variaram de 200-5,6 µg/ml. O MIC foi próximo a 100 µg/ml para todas as cinco espécies de *Candida* sp. testadas (Tabela 7). Ao final do experimento,

os poços da placa teste referentes a concentração de MIC e superiores foram submetidos ao teste de plaqueamento para diferenciar a atividade fungistática e fungicida. As placas oriundas do teste de esgotamento da fração FHEX231 apresentaram crescimento para todas as espécies, sendo assim, a fração FHEX231 classificada como fungistática. As placas do teste de esgotamento da fração FACOET231 não apresentaram crescimento para nenhuma das espécies, sendo a FACOET231 classificada como uma atividade fungicida.

Tabela 7 – Valores de MIC das frações FHEX231 e FACOET231 para diferentes espécies de *Candida* sp

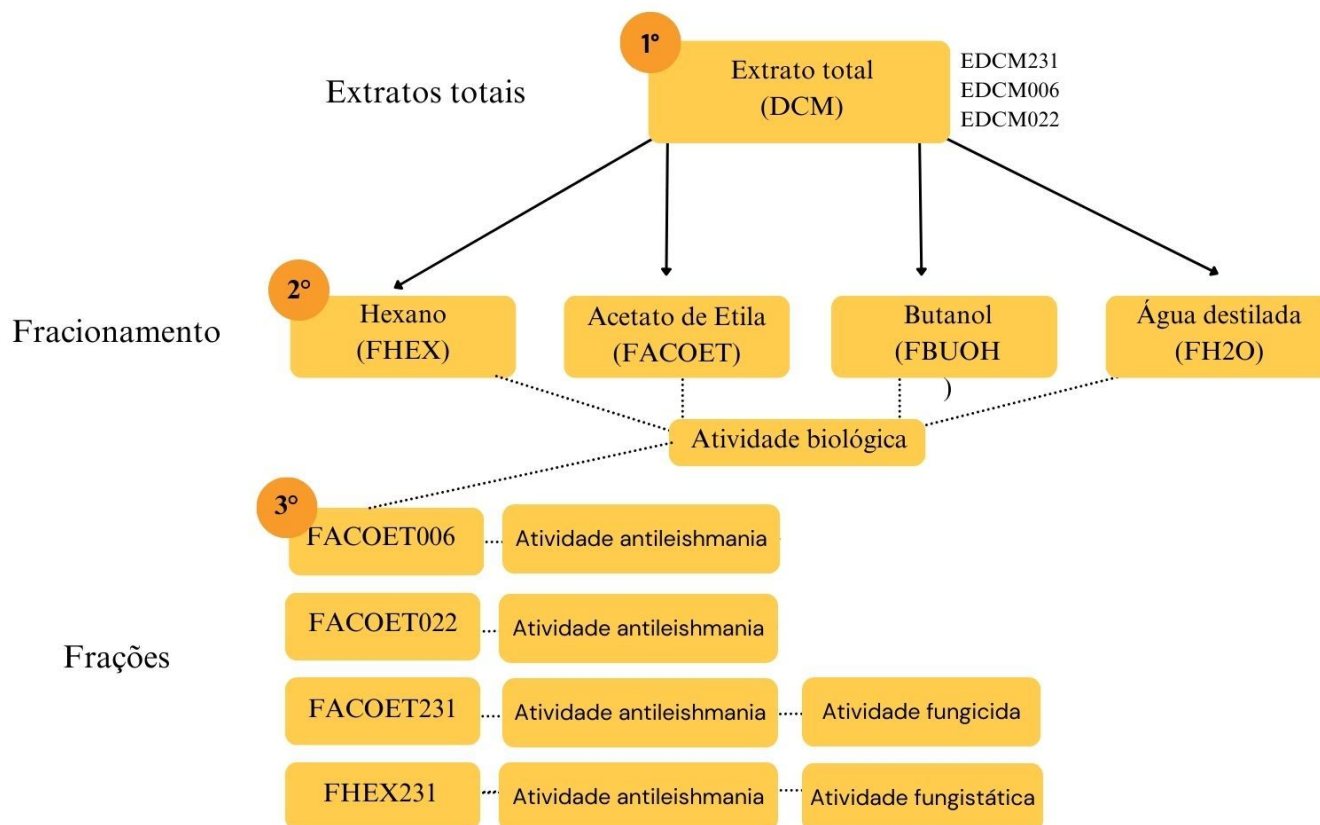
Extrato	MIC				
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruzei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>FHEX231</b>	150 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
<b>FACOET231</b>	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml

FHEX=Fração hexânica; FACOET= Fração acetato de etila

## 5.5 Caracterização química dos extratos fúngicos fracionados

Para a etapa de caracterização química foram selecionadas apenas as frações que apresentaram atividades biológicas validadas pelas técnicas anteriores (Figura 19). As análises de caracterização química se iniciaram pela fração FACOET006 com as análises das demais frações ainda em andamento.

Figura 19 - Fluxograma da obtenção de frações a partir dos resultados de avaliação da atividade biológica



1º Avaliação dos extratos totais obtidos por DCM, para a qual apenas três extratos apresentaram atividades biológicas;

2º Fracionamento líquido-líquido dos três extratos totais, dos quais apenas quatro frações apresentaram atividade biológicas;

3º Frações que apresentaram atividade biológica e serão submetidas a análises qualitativas;

### 5.5.1 Cromatografia flash dos extratos fúngicos fracionados

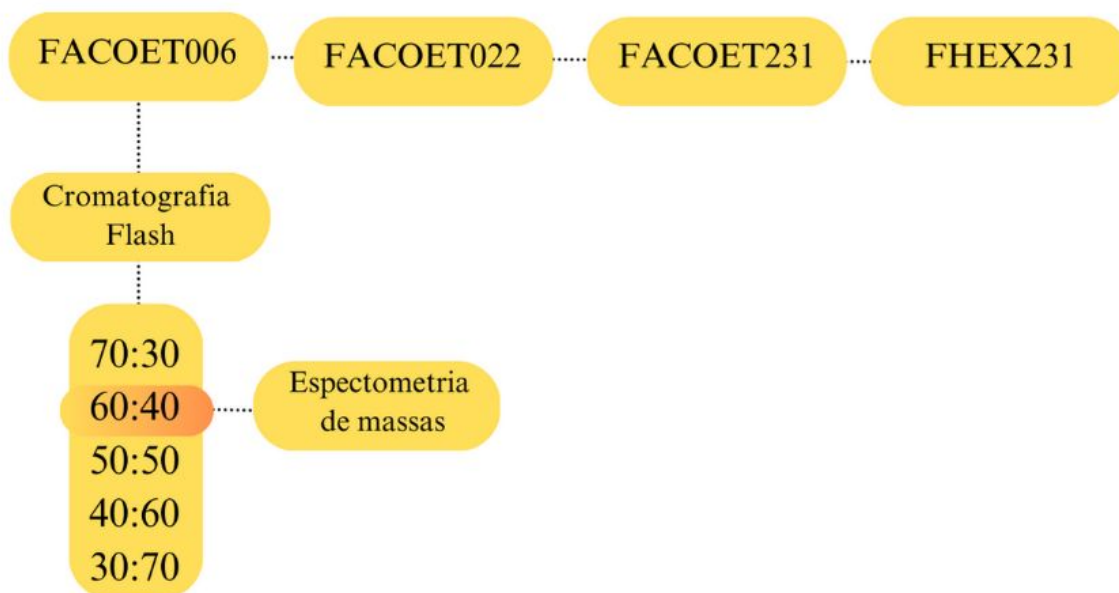
A fração acetato de foi submetida a metodologia de cromatografia Flash<sup>®</sup> por diferença de polaridade na amostra FACOET006. Ao final do processo foram geradas cinco subfrações em diferentes concentrações de hexano e acetato de etila (Hex:AcoEt) (Figura 20). Todas as subfrações foram analisadas pela técnica de CCD, utilizando como eluente hexano 40% e acetato de etila 60% (v/v) (Figura 21).

Figura 20 - Fluxograma da metodologia utilizada para a caracterização química das frações, utilizando como exemplo a fração FACOET006



\*FACOET006: Fração obtida por Acetato de Etila do fungo *Stemphylium* sp.

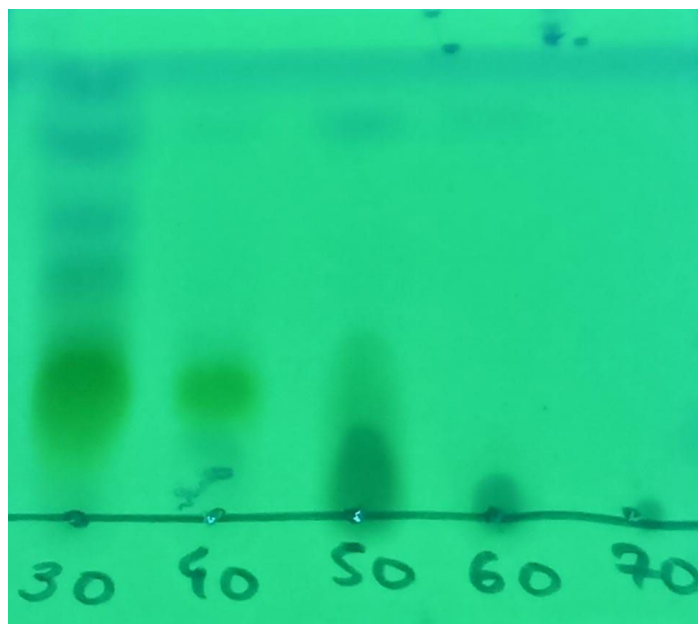
\*FACOET022: Fração obtida por Acetato de Etila do fungo *Trichoderma longibrachiatum*



\*FACOET231: Fração obtida por Acetato de Etila do fungo *Athrinium* sp.

\*FHEX231: Fração obtida por Hexano do fungo *Athrinium* sp.

Figura 21- Cromatografia de camada delgada representativa das subfrações da fração FACOET006 originadas após cromatografia Flash®



Amostras obtidas por Cromatografia Flash® e geradas pelos seguintes eluentes

\*30 – 30:40 (Hex:AcoEt)

\*40 – 40:60 (Hex:AcoEt);

\*50 – 50:50 (Hex:AcoEt);

\* 60 – 60:40 (Hex:AcoEt);

\*70 – 70:20 (Hex:AcoEt);

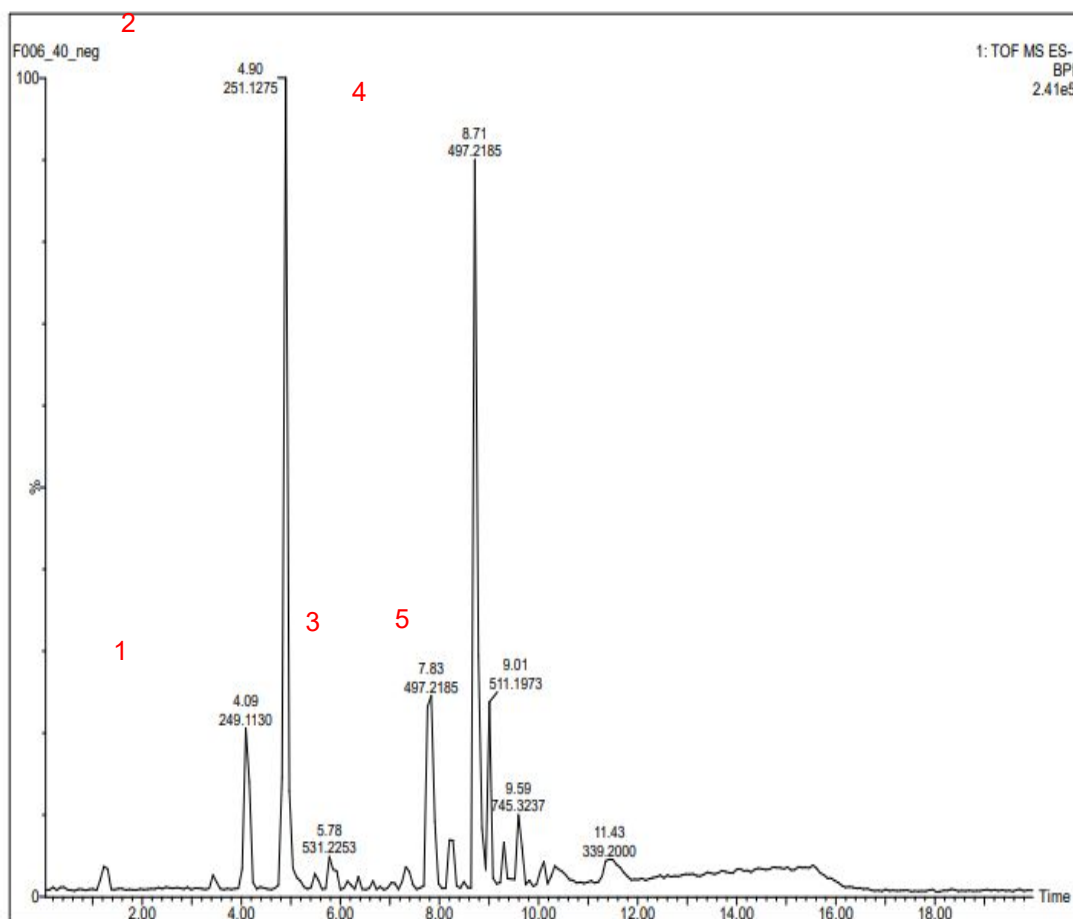
Os resultados da CCD mostraram que a subfração 30, da cromatografia Flash com a eluição 30:40 (Hex:AcoEt), é uma mistura mais complexa quando comparada a 40, 50, 60 e 70 (Figura 13). A subfração 40, proveniente da cromatografia Flash com eluição 60:40 Hex:AcoEt, apresentou um padrão de polaridade semelhante entre as suas moléculas e uma complexidade menor comparada a subfração 30. Dessa forma, a subfração 40 foi submetida as próximas análises com a finalidade de isolar e identificar os compostos nela presentes por meio da técnica de espectrometria de massas.

### 5.5.2 Análise por UPLC-ESI-QTOF MS das subfrações dos extratos fúngicos

O cromatograma da subfração 60:40 (Hex:AcoEt) resultante do fracionamento do extrato total do fungo endofítico *Trichoderma longibrachiatum* apresentou cinco picos majoritários (Figura 22). Os picos 1 e 2 possuem uma relação m/z próxima, o que sugere a similaridade entre as moléculas (Figura 22). Além disso, a estrutura proposta são

fragmentos isômeros, pois variam apenas uma ligação dupla entre si, de um sorbicilinoíde (Tabela 8).

Figura 22 - Espectro obtido por UPLC-ESI-QTOF MS da subfração 60:40 Hex:AcoEt da fração FACOET006



Os picos 3 e 4 por possuírem uma relação  $m/z$  próxima, foram identificados como isômeros entre si (Figura 22). A molécula proposta para ambos os picos é classificada como um sorbicilinoíde, sugerindo uma estrutura química semelhante ao Tricobisvertinol D (Figura 23) (ZHANG et al., 2019). O pico 5 também foi identificado como um sorbicilinoíde, sendo a estrutura proposta semelhante a Bisvertinolona (Figura 23) (SIB; GULDER, 2018a).

Tabela 8 - Compostos identificados na fração FACOET006, subfração 60:40  
Hex:AcoEt, do fungo endofítico *Stemphylium* sp.

N° do pico	TR (min)	Fórmula Molecular	Íon m/z (erro, ppm)	Íons fragmentos MS/MS
1	4,09	[C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> - H]-	249,1130 (1,2)	Não gerou fragmentos
2	4,90	[C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> - H]-	251,1275 (-3.2)	Não gerou fragmentos
3	7,83	[C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub> - H]-	497,2185 (2.0)	Não gerou fragmentos
4	8,71	[C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub> - H]-	497,2185 (2.0)	265,1092; 249,1130; 232,0740; 219,1016; 205,0862; 192,0417; 181,0506; 179,0337; 161,0962; 153,0557; 127,0388.
5	9,01	[C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub> - H]-	511,1973 (1.0)	249,1130; 234,0906; 219,1016; 205,0862; 193,0875; 179,0337; 153,0557; 149,0964; 127,0388.

Figura 23 - Propostas estruturais para os picos obtidos por UPLC-ESI-QTOF MS

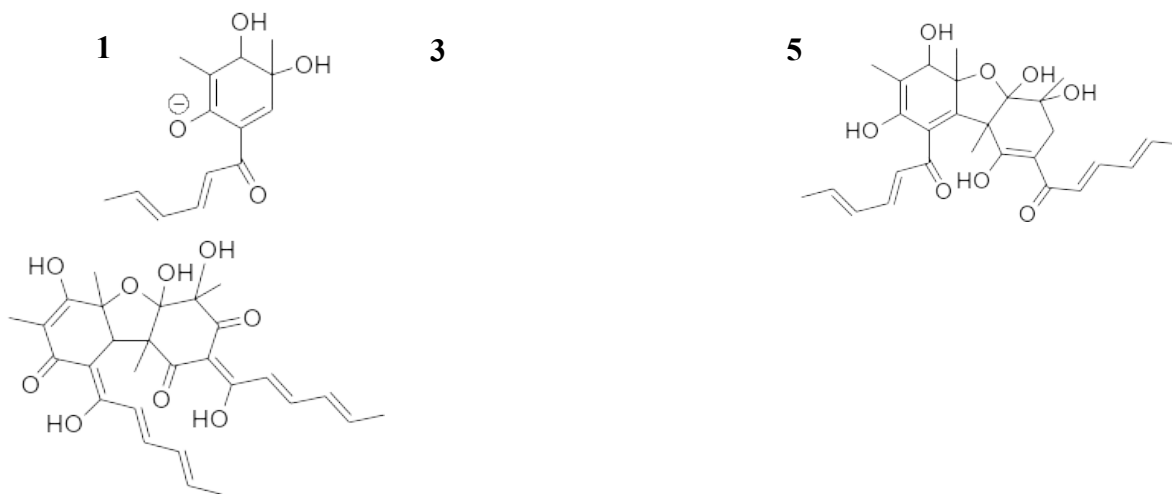


Figura relacionada a tabela 7

- 1 – Estrutura referente ao pico 1 identificada como um monômero fragmentado de sorbicilinóide  
3- Estrutura referente ao pico 3 identificada como Tricobisvertinol D  
5 – Estrutura referente ao pico 5 identificada como Bisvertinolona

## 6 DISCUSSÃO

A necessidade de novas moléculas para doenças infecciosas, especialmente aquelas causadas por fungos e parasitos, é fundamental para a saúde pública global. Embora tenham surgido avanços na ciência com a descoberta e o reposicionamento de medicamentos disponíveis comercialmente, doenças como as leishmanioses e a candidíase carecem de tratamentos eficazes. Além disso, a crescente resistência aos medicamentos existentes é uma preocupação global (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018).

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte de moléculas bioativas, incluindo aquelas de potencial atividade antibacteriana, antitumoral, antiviral, antifúngica, antiparasitária, entre outras (ATANASOV et al., 2021; KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2003; SAHA et al., 2019; WRIGHT, 2019). Exemplos notáveis, que estão no mercado, incluem a artemisinina, derivada da *Artemisia annua*, eficaz contra a malária; a anfotericina B, produzida pelo fungo *Streptomyces nodosus* e utilizada no tratamento de leishmaniose visceral e de infecções fúngicas graves; a ciclosporina A, isolada do fungo *Tolypocladium inflatum* e utilizada em transplantes de órgãos devido sua atividade imunossupressora. Além desses, existem diferentes antibióticos isolados de fungos e bactérias, como: penicilina (*Penicillium notatum*), eritromicina (*Streptomyces erythreus*), cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*), cefalosporina (*Cephalosporium*) e a vancomicina (*Streptomyces orientalis*) (AHMED; VINING, 1983; ÁLVAREZ-BARDÓN et al., 2020; FLEMING, 1941; GRIFFITH; BLACK, 1970; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; NEWTON; ABRAHAM, 1956; PERKINS, 1982; RÜEGGER et al., 1976). Neste sentido, a descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais é uma área promissora para o desenvolvimento de terapias eficazes contra doenças infecciosas.

No presente trabalho 12 fungos endofíticos isolados de plantas de manguezal foram submetidos ao cultivo usando arroz como substrato para obtenção de metabólitos secundários. Sabe-se que dentre os fungos de origem marinha, os fungos isolados de manguezais formam o segundo maior grupo de espécies identificadas e possuem um grande potencial biotecnológico por produzirem uma série de compostos de diferentes classes químicas como terpenos, cumarinas, alcaloides e peptídeos (WANG et al., 2014). O bioma de manguezal proporciona um ambiente com características especiais que molda a produção diferenciada de metabólitos secundários de fungos endofíticos (SEBASTIANES; DE AZEVEDO; LACAVA, 2017).

O processo de prospecção de novas moléculas a partir de produtos de origem natural sofre desafios e uma das maiores limitações está no isolamento dos microrganismos. Isso ocorre, pois quando retirados do seu habitat natural, muitos microrganismos não conseguem ser cultivados ou, ainda, param de produzir os metabólitos relevantes (ATANASOV et al., 2021). Para isso, é importante a escolha do meio e das condições ideais para cultivo do microrganismo. Em estudos iniciais de triagem de metabólitos de origem fúngica busca-se uma forma de cultivo padrão que promova um bom perfil químico de metabolitos e rendimento de extrato. Dados da literatura mostram que, entre as diferentes opções meios, sólidos e líquidos, para cultivo para fungos endofíticos, o meio sólido utilizando arroz como substrato apresenta um rendimento duas vezes superior ao cultivo em meio líquido e, ainda um extrato com maior rendimento com um perfil químico variado (VANDERMOLEN et al., 2013). Foi demonstrado ainda, que o cultivo em estado sólido utilizando arroz como substrato, permite que metabólitos raros de fungos marinhos podem ser obtidos sem a necessidade de mimetizar o ambiente (SHANG et al., 2012). Esses achados demonstram que o arroz é um substrato eficiente para a triagem inicial de metabólitos secundários produzidos por fungos. Dessa forma, optamos pelo uso do arroz como substrato em nosso estudo por proporcionar um melhor crescimento fúngico, maior rendimento do extrato, com um perfil químico mais complexo e ser economicamente viável.

Após o estabelecimento do cultivo, outra etapa limitadora desse processo é a escolha do método de extração dos metabólitos. Uma das metodologias mais empregadas é a maceração química utilizando solventes de diferentes polaridades (HUBERT;

NUZILLARD; RENAULT, 2015). A escolha da maceração química com solventes de polaridade distinta (metanol e diclorometano), foi empregada no presente trabalho. Ainda, foi optado por realizar a extração com os solventes separadamente, gerando dois extratos totais distintos. Essa escolha favoreceu a identificação das moléculas bioativas pois, gerou um pré-fracionamento facilitando o direcionamento das etapas posteriores de caracterização dos compostos ativos. Assim foram obtidos 21 extratos totais, sendo: nove extraídos por diclorometano nove extraídos por metanol e três extraídos por metanol e diclorometano juntos.

Com os extratos totais obtidos existem diferentes caminhos que podem ser seguidos para a avaliação de potenciais biomoléculas. Uma opção é partir diretamente para as análises químicas e realizar o fracionamento, caracterização e obtenção de moléculas isoladas ou, optar por uma abordagem com etapas de validação da atividade biológica anteriores ao processo de caracterização química. O segundo caminho foi o escolhido para o presente trabalho e é denominado de análise bioguiada, uma abordagem para a descoberta de novas moléculas a partir de produtos naturais, pois permite a identificação de compostos com atividade biológica específica e seletiva tornando a pesquisa e desenvolvimento de novos potenciais candidatos a fármacos mais racional. No entanto, a análise bioguiada apresenta desafios, como a complexidade química das amostras naturais, que podem conter centenas de compostos diferentes que dificultam o isolamento e a identificação da molécula responsável pela atividade, a reprodutibilidade das análises biológicas, a perda de atividade pós o fracionamento do extrato e, ainda, a obtenção de amostra suficiente para todos os testes necessários (ATANASOV et al., 2015).

Ainda, para estabelecer uma boa metodologia de análise bioguiada, durante a etapa de experimentação *in vitro*, o método escolhido para avaliar a atividade biológica precisa levar em consideração o ciclo de vida do patógeno, para que os dados gerados sejam reprodutíveis e respondam de melhor forma as hipóteses criadas (OLDONI et al., 2019).

Na triagem de fármacos antileishmania, a testagem com diferentes formas do ciclo de vida pode aumentar a acurácia e representatividade dos dados. O ensaio contra a forma promastigota de *Leishmania* spp. possui a vantagem da simplicidade e facilidade para a triagem inicial. Porém, existem diferenças significativas em relação à bioquímica e sensibilidade ao tratamento entre formas promastigotas e amastigotas, o que sugere que os

resultados de triagem inicial precisam ser confirmados contra a forma amastigota que é clinicamente relevante (VERMEERSCH et al., 2009).

Dessa forma, para avaliar a atividade antileishmania dos 21 extratos foi realizada uma triagem frente a formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* utilizando apenas uma concentração de 50 µg/ml. Três extratos totais dos fungos endofíticos *Arthrinium* sp., *Stemphylium* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* (EDCM231, EDCM006 e EDCM022) promoveram uma taxa de mortalidade próxima a 100% das formas promastigotas de ambas as espécies. No entanto, os testes frente as formas amastigotas intracelulares mostraram que os extratos EDCM231, EDCM006 e EDCM022 revelaram valores de IC<sub>50</sub> de 31,02 µg/ml, 112,67 µg/ml e 103,47 µg/ml, respectivamente, para de *L. infantum* e de 39,09 µg/ml, 81,92 µg/ml e 117,57 µg/ml para *L. amazonensis*.

Comparando os resultados com as diferentes formas é possível observar uma redução da atividade dos extratos frente às formas amastigotas. Esse fato pode ser atribuído às características intrínsecas da forma amastigota que por estar em um ambiente intracelular, impõe obstáculos adicionais como atravessar múltiplas barreiras, incluindo a membrana celular e a membrana do vacúolo parasitóforo para atingir o parasito. Considerando as características da membrana celular, a lipofilicidade dos compostos é uma propriedade relevante, uma vez que a difusão simples representa um dos principais mecanismos de transporte transmembrana. A ausência ou a baixa lipofilicidade dos extratos e frações pode explicar em parte a baixa atividade observada.

Ainda, quando realizado o experimento de citotoxicidade frente a linhagem THP-1, foi verificado baixos índices de seletividade, sugerindo uma atividade pouco específica. O índice de seletividade é um marcador importante para seleção de potenciais extratos e valores superiores a 10 são recomendados pelo DNDi (LOSET et al., 2009). Contudo, por se tratar de um extrato total que possui uma mistura complexa de moléculas o efeito citotóxico pode ser mais elevado devido à mistura desconhecida de moléculas presentes (DZOBO, 2022).

O desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, assim como os antiparasitários, enfrenta dificuldades devido à semelhança de processos bioquímicos e biológicos dos patógenos com as células do hospedeiro. A avaliação da atividade antifúngica utilizando leveduras do gênero *Candida* spp. é facilitada quando comparada ao



parasitos do gênero *Leishmania* sp.. Isso é explicado pois as leveduras possuem apenas uma forma durante o seu ciclo de vida, o que proporciona ensaios biológicos mais simples (ROEMER; KRYSAN, 2014).

Na análise da atividade antifúngica metodologias simples podem ser empregadas para avaliar a atividade biológica. Um exemplo é a mensuração por densidade óptica da cultura, uma técnica rápida e de baixo custo. Porém, essa técnica possui limitações, pois não consegue diferenciar a atividade fungicida da fungistática, sendo necessário ensaios posteriores para avaliar essa diferença (BEATTIE; KRYSAN, 2020). A técnica de esgotamento do primeiro poço que apresentou redução do crescimento em relação ao controle é uma metodologia utilizada. Quando há crescimento no esgotamento o efeito é considerado fungistático e quando não há crescimento é considerado fungicida. No presente trabalho a atividade antifúngica dos 21 extratos totais foi testada frente as diferentes espécies de *Candida* sp. em uma única concentração de 90 µg/ml. O extrato (EDCM231) apresentou atividade antifúngica promissora (mortalidade >90%) para todas as espécies, com valores de MIC variando de 180 µg/ml a 90 µg/ml.

Após a fase de avaliação da atividade biológica dos extratos totais, os três extratos que apresentaram resultados promissores (EDCM31, EDM006 e EDCM022) foram submetidos a diferentes metodologias de fracionamento químico, visando isolar e caracterizar a(s) molécula(s) ativa(s). O extrato total de metabólitos de fúngicos é uma mistura extremamente complexa e pode ser visualizada por meio de técnica de cromatografia de camada delgada. No entanto, a separação do bioativo a partir de uma amostra complexa pode se tornar um desafio. Dessa forma, sabe-se que é possível extrair uma grande variedade de compostos, porém muitas vezes não é viável conhecer a atividade específica de cada molécula isoladamente (DZOBO, 2022). Tal situação pode decorrer por diferentes fatores: o composto isolado pode não estar presente em quantidade suficiente no extrato para avaliar sua atividade, bem como alguns compostos requerem sinergia com outras moléculas ou, ainda, podem mascarar a ação de outros (LI; WENG, 2017).

Devido à complexidade relatada, dificuldades são geradas quando técnicas de separação de alta eficiência, como HPLC, são aplicadas diretamente a esses extratos pois pode ocorrer a sobreposição de picos comprometendo a pureza e o rendimento das frações geradas (MORLEY; MINCEVA, 2020). Sabendo da complexidade dos extratos ativos,

optamos por empregar uma técnica de pré-fracionamento líquido-líquido, uma técnica que utiliza um sistema bifásico líquido estacionária gerando um particionamento entre os constituintes da matriz orgânica (FROMME et al., 2020; SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2015). Por meio dessa técnica foi possível obter 4 frações geradas por hexano, acetato de etila, butanol e o residual aquoso.

As frações foram submetidas novamente a uma análise da atividade biológica, e a fração acetato de etila dos três extratos totais permaneceu ativa frente aos patógenos utilizados no trabalho. No contexto das diversas espécies de *Leishmania* sp., destaca-se que três frações acetato de etila (FACOET022, FACOET006 e FACOET231) e a fração hexânica (FHEX231) mostraram atividade contra o parasito. Contudo, os índices de seletividade contra formas amastigotas, não evidenciaram incremento substancial da atividade em relação ao extrato total. Este resultado pode ser decorrente da baixa atividade específica da fração que embora tenha mostrado uma redução no valor de IC<sub>50</sub>, contra a *Leishmania*, foi também mais citotóxico para a célula hospedeira.

Frente cepas de *Candida* sp., os valores de MIC das frações FACOET231 e FHEX231 permaneceram invariáveis; contudo, a fração hexânica exibiu singularmente uma atividade fungistática. A literatura mostra que infecções sistêmicas ocasionadas por espécies de *Candida*, podem ser fatais quando não tratadas com agentes fungicidas (PAPPAS et al., 2016). Não obstante, a maioria dos estudos que ponderam a superioridade entre agentes fungicidas e fungistáticos denotam restrições substanciais, gerando um proeminente debate em relação à vantagem inerente de um tratamento sobre o outro (KUMAR et al., 2018). Assim, é imperativo considerar que a natureza fungistática da ação observada no extrato hexânico não constitui uma desvantagem, sendo necessário realizar investigações suplementares para aferir tanto a eficácia quanto a composição desta fração.

Assim, podemos observar que de 21 extratos totais avaliados três apresentaram atividade antifúngica e antileishmania, e que as frações geradas a partir desses extratos mantiveram as atividades biológicas iniciais. De acordo com a identificação molecular baseada na região ITS1, os extratos são provenientes dos fungos *Arthrinium* sp. (RASC1B20231), *Stemphylium* sp. (IASF2A10006) e *Trichoderma longibrachiatum* (ILRF2A10022).

Poucos são os estudos que exploram a atividade biológica de extratos de fungos endofíticos do gênero *Arthrinium* que engloba cerca de 88 espécies conhecidas encontradas em habitats marinhos e terrestres (VEREKAR; GUPTA; DESHMUKH, 2023). Em 2010, Rosa e colaboradores avaliaram o extrato total do fungo endofítico *Arthrinium* sp., isolado de folhas da espécie *Piptadenia adiantoide*, que demonstrou uma elevada atividade frente a formas amastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 20 µg/ml (ROSA et al., 2010). Ver aqui qual o composto que inibiu a TR. As atividades biológicas mais exploradas para esse tipo de fungo são em modelos bacterianos. Já foi demonstrada atividade antibacteriana do extrato total do *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053, frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e atividade antioxidante. A atividade anticândida foi avaliada para as espécies *Arthrinium arundinis* e *Arthrinium phaeospermum* (HIL Y-903022). Nesse estudo os metabólitos secundários artricinina (1) e arundifungina (2), apresentaram MIC de 32 µg/ml e 1-8 µg/ml, respectivamente para *C. albicans* (CABELLO et al., 2001; SHU et al., 2022).

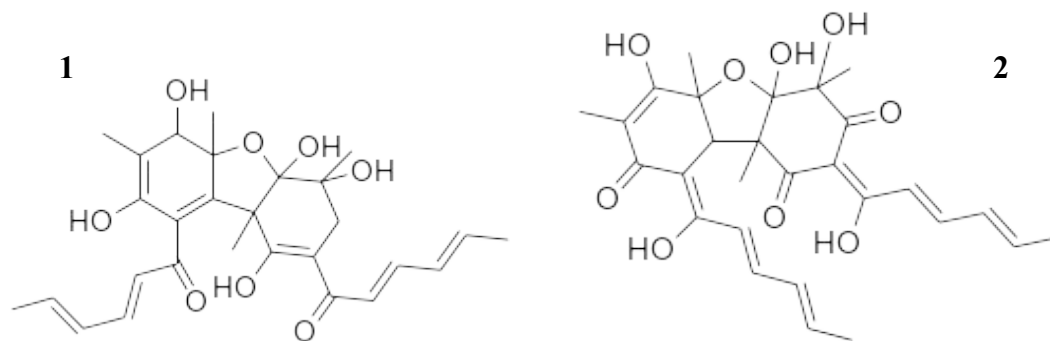
O gênero *Trichoderma* é mais estudado, tendo cerca de 375 espécies já descritas e é reconhecido pelo seu potencial enzimático e aplicação na biorremediação. A atividade biológica de metabólitos secundários desse gênero é fortemente explorada frente a fitopatógenos, possuindo poucos estudos avaliando o potencial desses fungos frente a doenças infecto parasitárias que acometem humanos (POVEDA; ABRIL-URIAS; ESCOBAR, 2020). Somente em 2020, foi publicado o primeiro estudo avaliando o potencial leishmanicida de extratos obtidos de um fungo do gênero *Trichoderma*. Lopes e colaboradores demonstraram que o extrato etanólico de *Trichoderma asperelloides* apresentou um IC<sub>50</sub> de 1,09 ng/µl frente a promastigotas de *L. amazonensis*. Esse extrato foi separado por centrifugação sendo obtidas as frações *high-molecular-weight fraction* (HMWF) e *low-molecular-weight fraction below* (LMWF), onde a fração demonstrada ativa foi a LMWF que ocasionou mudanças estruturais na cromatina, mitocôndria e no autofagossomo (LOPES et al., 2020). Recentemente, foi demonstrada a atividade antiparasitária *in vitro* de *Trichoderma stromacticum* frente ao parasito *Toxoplasma gondii* demonstrando redução da replicação do parasito e a queda na taxa de inflamação intestinal e do parasitismo em camundongos (NASCIMENTO et al., 2022).

Em nosso estudo os extratos diclorometano e metanólico de *Trichoderma longibrachiatum* não apresentaram nenhuma atividade biológica nos modelos avaliados, sugerindo que a atividade biológica pode ser altamente dependente da espécie de fungo. Estudos de bioatividade de fungos endofíticos do gênero *Stemphylium* são escassos na literatura. Contudo, o extrato total, obtido da extração por etanol do fungo endofítico *Stemphylium globuliferum*, cultivado em arroz, apresentou toxicidade considerável frente a células da linhagem L5178Y (linfoblastos murinos) (DEBBAB et al., 2009). O presente estudo é o primeiro a avaliar o extrato total e frações acetato de etila e hexânica do fungo endofítico do gênero *Stemphylium* sp. frente a diferentes espécies de *Candida* sp. e *Leishmania* sp. O extrato apresentou uma atividade moderada, porém com baixa seletividade para as espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis* e em relação as espécies de *Candida* sp. tanto o extrato total quanto as frações apresentaram atividade antifúngica e fungistática baixas.

As frações que apresentaram atividades biológicas foram submetidas a cromatografia por diferença de polaridade. Esse processo iniciou-se pela fração FACOET006 proveniente do fungo *Stemphylium* sp., resultando em 5 subfrações. Uma fração (Hex:AcoEt 40:60), que mostrou apenas uma banda na técnica de CCD, foi submetida a análise de espectrometria de massas e resultou na identificação de duas moléculas com semelhança aos sorbicilínóides. Esses compostos representam metabólitos que possuem um núcleo hexacetídeo cíclico acompanhado de uma cadeia lateral constituída por sorbil (HARNED; VOLP, 2011). A literatura registra a descrição de cerca de 90 sorbicilínóides, os quais foram predominantemente isolados de fungos terrestres e, em menor medida, de fungos marinhos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Ustilagoidea* (MENG et al., 2016).

No presente estudo, as moléculas sob investigação derivam do fungo *Stemphylium* sp., tendo sido identificadas como sorbicilínóides proveniente de uma das subfrações geradas no processo (Figura 20). Neste sentido, não é prudente afirmar que a atividade biológica observada seja unicamente atribuível à molécula isolada, visto que essa etapa da análise ainda se encontra pendente. Contudo, não foram encontrados registros de sorbicilínóides isolados de fungos do gênero *Stemphylium*, na literatura, sugerindo ser esta a primeira identificação dessa molécula em fungos deste gênero.

Figura 24 - Estrutura referente ao Tricobisvertinol D (1) e a Bisvertinolona (2)



As moléculas propostas são especificamente o Tricobisvertinol D (1) e a Bisvertinolona (2). O composto 1 foi descrito pela primeira vez em 2019, juntamente com seu isômero, como os primeiros bisorbicilínóides obtidos de uma fonte natural (*Trichoderma reesei* 4670), com atividade anti-inflamatória (ZHANG et al., 2019). Ding et al (2023) identificaram o composto Tricobisvertinol D no fungo *Paecilomyces* sp. KMU21009, ratificando a sua natureza como uma molécula rara sendo reportada pela segunda vez por esse grupo de pesquisa (GUO et al., 2023).

A molécula 2 foi isolada de fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Acremonium* e *Aspergillus* há mais de duas décadas (ABE; ARAKAWA; HIROTA, 2001; ANDRADE et al., 2011; KONTANI; SAKAGAMI; MARUMO, 1994). A diversidade de atividades biológicas exibidas pela Bisvertinolona é notável. A molécula obtida do fungo *Ustilagoidea virens* demonstrou atividade citotóxica moderada contra diversas linhagens de carcinoma humano, além de uma marcante ação antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas lachrymans* (MENG et al., 2019). Estudo realizado por Corral et al (2018) com a Bisvertinolona isolada de *Aspergillus* sp. corroborou a atividade antibacteriana desta molécula contra *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, a atividade antifúngica direcionada a patógenos vegetais e a capacidade fitotóxica da Bisvertinolona tem sido relatada na literatura (MENG et al., 2019; NGO et al., 2021).

Com o objetivo de potencializar o escalonamento industrial, a exploração de métodos de síntese e semissíntese para a obtenção de estruturas pode ser uma estratégia eficaz (HONG, 2014). Esses métodos podem não apenas melhorar o rendimento e a economia na produção da biomolécula, mas também possibilitar o aprimoramento da estrutura da molécula para aumentar sua bioatividade. No entanto, é importante considerar que a complexidade das estruturas químicas dos produtos naturais pode tornar esse processo inviável, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico.

Ainda não há relatos sobre a obtenção de Tricobisvertinol D por meio de síntese química, isso pode ocorrer devido à complexidade estrutural da molécula. Já em relação a molécula de Bisvertinolona, no ano de 2018 Sib e colaboradores conseguiram estabelecer a primeira rota para síntese total estereosseletiva de sorbicilínóides estruturalmente diversos, incluindo a estrutura complexa da Bisvertinolona (SIB; GULDER, 2018). A abordagem apresentou um rendimento baixo (20%) e foi baseada na utilização de diferentes derivados da sorbicilina, que apresentam diferentes padrões de substituição no sistema de anel aromático, e na atividade catalítica da enzima monoxigenase SorbC. Para a obtenção da bisvertinolona a estrutura de sorbicilinol foi tratada utilizado uma solução de dimetilformamida (DMF), oxosorbicilinol e piridina que promoveu uma sequência de adição/cetalização de Michael altamente seletiva (SIB; GULDER, 2018).

Dados sobre a atividade biológica das moléculas Tricobisvertinol D e Bisvertinolona na literatura são escassos. O isolamento deste grupo de compostos do fungo endofítico do gênero *Stemphylium* sp. no presente estudo mostra uma nova fonte destes compostos e a necessidade de aprofundamento dos estudos em suas atividades biológicas.

## 7 Resumo de resultados

A avaliação da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos dos manguezais de Florianópolis/SC representa um marco inovador, fornecendo resultados iniciais promissores. Durante a fase de triagem dos extratos totais, os extratos provenientes dos fungos *Arthrinium* sp. (EDCM231), *Stemphylium* sp. (EDCM006) e *Trichoderma longibrachiatum* (EDCM022) apresentaram atividades antimicrobianas significativas. Em relação a toxicidade frente a linhagem THP1, os extratos EDCM022 e EDCM006 demonstraram uma toxicidade moderada, com valores de  $CC_{50}$  de 267,66  $\mu\text{g/ml}$  e 229,63  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Já o extrato EDCM, exibiu uma citotoxicidade mais marcante, com um valor de  $CC_{50}$  de 45,48  $\mu\text{g/ml}$ .

O fracionamento dos extratos totais revelou que as frações obtidas utilizando o solvente acetato de etila foram responsáveis pela maior atividade biológica, incluindo a atividade antileishmania, anticandida e citotoxicidade para a linhagem celular THP-1.

A caracterização química da subfração acetato de etila proveniente do fungo *Stemphylium* sp. mostrou a presença dos sorbicilinoídes Tricobisvertinol D e Bisvertinolona, descritos pela primeira vez como metabólitos produzidos por fungos do gênero *Stemphylium* sp.

## 8 CONCLUSÕES

Os extratos totais e suas frações oriundos das espécies de fungos endofíticos isolados de plantas dos manguezais *Arthrimum* sp.; *Trichoderma longibrachiatum* e *Stemphylium* sp. apresentaram atividade antileishmania e anticândida. A atividade antileishmania dos extratos e frações foi moderada frente a formas amastigotas *L. infantum* e *L. amazonensis* e os ensaios de citotoxicidade revelaram baixos índices de seletividade. A atividade anticândida dos extratos e frações revelaram valores de MIC de ~100 µg/ml para as espécies *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Embora os resultados da atividade antiparasitária e antifúngica dos extratos e frações tenham revelado atividade fraca a moderada, a seletividade das frações foi baixa, requerendo estudos adicionais.

A caracterização química da subfração acetato de etila proveniente do fungo *Stemphylium* sp. revelou a presença de duas moléculas do grupo dos sorbicilinoídeos o Tricobisvertinol D e a Bisvertinolona, descritos pela primeira vez como metabólitos produzidos por fungos do gênero *Stemphylium* sp..



## REFERÊNCIAS

ABE, N.; ARAKAWA, T.; HIROTA, A. The biosynthesis of bisvertinolone: evidence for oxosorbicillinol as a direct precursor. 2001.

ACHARYA, S. et al. Anti-bacterial, anti-fungal and anti-oxidative properties of different extracts of *Bruguiera gymnorrhiza* L. (Mangrove). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 36, p. 101140, 1 jun. 2020.

AHMED, M. Z. et al. Antifungal Drugs: Mechanism of Action and Resistance. **Biochemistry of Drug Resistance**, p. 143–165, 2021.

AHMED, Z. U.; VINING, L. C. Evidence for a chromosomal location of the genes coding for chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 1, p. 239–244, 1983.

ALIZADEH BEHBAHANI, B. et al. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 225–232, 1 jan. 2018.

ALONGI, D. M. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2008.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, dez. 2006.

ÁLVAREZ-BARDÓN, M. et al. Screening Marine Natural Products for New Drug Leads against Trypanosomatids and Malaria. **Marine Drugs** 2020, Vol. 18, Page 187, v. 18, n. 4, p. 187, 31 mar. 2020.

ANDRADE, R. et al. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. <https://doi.org/10.1139/v92-320>, v. 70, n. 10, p. 2526–2535, 1 out. 2011.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. PART 2, p. 143–153, 1 fev. 2007.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 1 dez. 2015.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 20:3, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 jan. 2021.

BACON, C.; WHITE, J. **Microbial Endophytes**. [s.l.: s.n.].

BAJPAI, V. K. et al. Invasive Fungal Infections and Their Epidemiology: Measures in the Clinical Scenario. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 24, n. 3, p. 436–444, 1 jun. 2019.

BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany**. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 2021.

BASTOS, I. M. A. DA S. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos de manguezais da Ilha de Santa Catarina**. Florianópolis: Universidade Federal de Pelotas, 2022.

BEATTIE, S. R.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug screening: thinking outside the box to identify novel antifungal scaffolds. **Current Opinion in Microbiology**, v. 57, p. 1–6, 1 out. 2020.

BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 279–311, 1 jun. 2021.

BHANDARI, V. et al. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2580–2585, 2014.

BONITO, G. et al. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 13, p. 3356–3370, 1 jul. 2014.

BOREL, J. F. et al. Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. **Agents and Actions** 1994 43:3, v. 43, n. 3, p. 179–186, dez. 1994.

BRITTINGHAM, A. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4477–4484, 1999.

CABELLO, A. M. et al. Arundifungin, a novel antifungal compound produced by fungi: Biological activity and taxonomy of the producing organisms. **International Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 93–102, 2001.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–335, 1 jul. 2001.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 550–563, 1 set. 2002.

CARDENAS, S. M. M. et al. Death and Regeneration of an Amazonian Mangrove Forest by Anthropogenic and Natural Forces. **Remote Sensing** 2022, Vol. 14, Page 6197, v. 14, n. 24, p. 6197, 7 dez. 2022.

CARLA, N. et al. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. <http://mc.manuscriptcentral.com/tmyc>, v. 13, n. 1, p. 39–55, 2021.

CARNIELLI, J. B. T. et al. Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Candidiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>>. Acesso em: 29 mar. 2023.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 1, abr. 2010.

CHRISTIAN, N.; WHITAKER, B. K.; CLAY, K. A Novel Framework for Decoding Fungal Endophyte Diversity. Em: DIGHTON, J.; WHITE, J. F. (Eds.). **The Fungal Community : Its Organization and Role in the Ecosystem**. [s.l.] CRC Press, 2017. v. 4.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2014.

DA SILVA, A. F. et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 2021 **44:10**, v. 44, n. 10, p. 2003–2034, 16 jun. 2021.

DAVISON, E. K.; BRIMBLE, M. A. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 1–8, 1 out. 2019.

DE COCK, K. M. et al. The New Global Health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1192, ago. 2013.

DE MORAIS, C. G. V. et al. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153–166, 6 ago. 2013.

DEBBAB, A. et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, p. 626–631, 24 abr. 2009.

DEVI, R. et al. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 147–161, 1 jan. 2020.

DINIZ, C. et al. Brazilian Mangrove Status: Three Decades of Satellite Data Analysis. **Remote Sensing** 2019, **Vol. 11, Page 808**, v. 11, n. 7, p. 808, 4 abr. 2019.

**DNDi América Latina.** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

DONOVAN, C. THE ETIOLOGY OF ONE OF THE HETERO GENEIOUS FEVERS OF INDIA - PMC. **British Medical Jornal**, 28 nov. 1903.

DU, W. et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229589, 2020.

DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408, 2022.

EL-GENDY, M. M. A. A. et al. Phylogenetic Analysis and Biological Evaluation of Marine Endophytic Fungi Derived from Red Sea Sponge *Hyrtios erectus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 755–777, 1 jul. 2018.

EMRI, T. et al. Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology 2013 97:8**, v. 97, n. 8, p. 3267–3284, 6 mar. 2013.

FARIA-RAMOS, I. et al. Environmental azole fungicide, prochloraz, can induce cross-resistance to medical triazoles in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1119–1123, 1 nov. 2014.

FEKKAR, A. et al. Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp. in a hospital setting: A consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1489–1496, 9 abr. 2014.

FLEMING, A. Penicillin. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4210, p. 386, 9 set. 1941.

FROMME, A. et al. Correlating the phase settling behavior of aqueous-organic solvent systems in a centrifugal partition chromatograph. **Journal of Chromatography A**, v. 1620, p. 461005, 7 jun. 2020.

GALVIS OVALLOS, F. LEISHMANIOSES NO BRASIL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**, p. 227–255, jun. 2020.

GAO, S. S. et al. Rhizovarins A-F, Indole-Diterpenes from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Mucor irregularis* QEN-189. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 8, p. 2066–2074, 26 ago. 2016.

GEORGE, V. et al. Bioprospecting, Traditional Knowledge, Sustainable Development and Value Added Products: A Review. **J Tradit Med Clin Natur**, v. 7, n. 1, p. 256, 2018.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25, 2018.

GOMES, R.; BERLINCK, S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 27–30, 2012.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GONZÁLEZ-TEUBER, M.; VILO, C.; BASCUÑÁN-GODOY, L. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. **Genomics Data**, v. 11, p. 109–112, 1 mar. 2017.

GOULART ELLER, J.; DOS SANTOS, L.; NASCIMENTO DA SILVA, R. **ANÁLISE AMBIENTAL DO MANGUEZAL DO RIO TAVARES – FLORIANÓPOLIS/SC – BRASIL**. Anales del XIV° EGAL–Encuentro de Geografos de America Latina. **Anais...Lima** : 2013. Disponível em: <[http://geo.pmf.sc.gov.br/geo\\_fpolis/index3.php](http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php)>. Acesso em: 26 jul. 2022

GRAY, L. D.; ROBERTS, G. D. Laboratory Diagnosis of Systemic Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 2, n. 4, p. 779–803, 1 dez. 1988.

GRIFFITH, R. S.; BLACK, H. R. Erythromycin. **Medical Clinics of North America**, v. 54, n. 5, p. 1199–1215, 1 set. 1970.

GUNDEL, P. E. et al. Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 740–748, 17 maio 2009.

GUO, X. Y. et al. Bioactive sorbicillinoids from a rhizospheric soil-derived *Paecilomyces* sp. KMU21009. **Fitoterapia**, v. 166, p. 105443, 1 abr. 2023.

HARNED, A. M.; VOLP, K. A. The sorbicillinoid family of natural products: Isolation, biosynthesis, and synthetic studies. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 11, p. 1790–1810, 18 out. 2011.

HENDRICKX, S. et al. Experimental Selection of Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani* Amastigotes Induces Variable Genomic Polymorphisms. **Microorganisms** **2021**, Vol. 9, Page 1546, v. 9, n. 8, p. 1546, 21 jul. 2021.

HENWOOD, J. M.; HEEL, R. C. Lovastatin. **Drugs** **1988** **36:4**, v. 36, n. 4, p. 429–454, 29 nov. 2012.

HONG, J. Natural Product Synthesis at the Interface of Chemistry and Biology. **Chemistry – A European Journal**, v. 20, n. 33, p. 10204–10212, 11 ago. 2014.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews** **2015** **16:1**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 19 nov. 2015.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 111–117, 1 abr. 2009.

JOINER, K. A. et al. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. VI. IgG increases the bactericidal efficiency of C5b-9 for *E. coli* 0111B4 by acting at a step before C5 cleavage. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 131, n. 5, p. 2570–5, nov. 1983.

KARTHI, S. et al. Larvicidal Enzyme Inhibition and Repellent Activity of Red Mangrove *Rhizophora mucronata* (Lam.) Leaf Extracts and Their Biomolecules against Three Medically Challenging Arthropod Vectors. **Molecules** **2020**, Vol. 25, Page 3844, v. 25, n. 17, p. 3844, 24 ago. 2020.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81–251, 1 jan. 2001.

KHABBAZ, R. F. et al. Challenges of infectious diseases in the USA. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9937, p. 53–63, 2014.

KONTANI, M.; SAKAGAMI, Y.; MARUMO, S. First  $\beta$ -1,6-glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute stereochemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 16, p. 2577–2580, 18 abr. 1994.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135–1144, 30 mar. 2002.

KOPARDE, A. A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural Products is Drug Discovery. Em: **Pharmacognosy: Medicinal Plants**. [s.l.] Indian Academy of Sciences, 2003. v. 28p. 637–646.

KUMAR, A. et al. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. <http://mc.manuscriptcentral.com/tmyc>, v. 9, n. 2, p. 116–128, 3 abr. 2018.

KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. K. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 103–106, jul. 2008.

LANZA, J. S. et al. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 10, p. 1063–1079, 3 out. 2019.

LEISHMAN, W. B. **ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2513550/>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

LEITÃO, A. M. F. et al. **ANTIMICROBIANOS REVISÃO GERAL**. [s.l.: s.n.].

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 9 jul. 2005.

LI, F. et al. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639>, v. 14, n. 5, p. 417–420, 4 maio 2019.

LI, F. S.; WENG, J. K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. **Nature Plants** **2017 3:8**, v. 3, n. 8, p. 1–7, 31 jul. 2017.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)**, v. 8, p. 147, 7 out. 2016.

LIU, A. R.; WU, X. P.; XU, T. [Research advances in endophytic fungi of mangrove]. **Ying Yong Sheng tai xue bao = The Journal of Applied Ecology**, v. 18, n. 4, p. 912–918, 1 abr. 2007.



LOPES, D. DE S. et al. Ethanolic Extract of the Fungus *Trichoderma asperelloides* Induces Ultrastructural Effects and Death on *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 306, 15 jul. 2020.

LOSET, J. R. et al. **Drug screening for kinetoplastid diseases: A training manual for screening in neglected diseases**. DNDi and Pan-Asian Screening Network. **Anais...2009**.

LUGO, A. The Ecology of Mangroves . **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 5, p. 39–64, 1974.

MARTINS, N. et al. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. **Mycopathologia**, v. 177, n. 5–6, p. 223–240, 1 maio 2014.

MATEO, N.; NADER, W.; TAMAYO, G. Bioprospecting. **Encyclopedia of Biodiversity**, v. 1, p. 471–488, 2001.

MATSUMORI, N. et al. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by 2H NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11855–11860, 26 ago. 2009.

MAULANA, A. F. et al. Isolation of endophytic fungi from tropical forest in Indonesia. **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 151–162, 1 out. 2018.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3593, 1992.

MENG, J. et al. Sorbicillinoids from Fungi and Their Bioactivities. **Molecules** **2016, Vol. 21, Page 715**, v. 21, n. 6, p. 715, 1 jun. 2016.

MENG, J. et al. Sorbicillinoids from the fungus *Ustilaginoidea virens* and their phytotoxic, cytotoxic, and antimicrobial activities. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. JUN, p. 459253, 12 jun. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. MS, , 2017. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_)>. Acesso em: 13 ago. 2022

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Candidíase sistêmica** . Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistematica>>. Acesso em: 29 mar. 2023.

MONGE-MAIHO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Treatment Options for Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection. **AIDS Reviews**, v. 18, n. 1, p. 32–43, 1 jan. 2016.

MORLEY, R.; MINCEVA, M. Trapping multiple dual mode liquid-liquid chromatography: Preparative separation of nootkatone from a natural product extract. **Journal of Chromatography A**, v. 1625, p. 461272, 16 ago. 2020.

MORRISEY, D. J. et al. The Ecology and Management of Temperate Mangroves. Em: **Oceanography and Marine Biology**. [s.l.] Chapman and Hall/CRC, 2010. p. 43–160.

MULIANI; NURBAYA; AYU KHAIRANAH KADRIAH, I. The effect of several types of mangrove extracts on tiger shrimp *Penaeus monodon* survival rate challenged with White Spot Syndrome Virus (WSSV). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 564, n. 1, p. 012054, 1 set. 2020.

NASCIMENTO, L. A. C. et al. The ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases the *Toxoplasma gondii* replication in vitro and ameliorates the experimental toxoplasmosis in vivo. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100173, 1 jan. 2022.

NEWAZ, A. W. et al. Antimicrobial metabolites from the Indonesian mangrove sediment-derived fungus *Penicillium chrysogenum* sp. ZZ1151. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2103813>, v. 37, n. 10, p. 1702–1708, 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NEWTON, G. G.; ABRAHAM, E. P. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing d- $\alpha$ -aminoadipic acid. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 4, p. 651, 1956.

NGO, T. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of sorbicillinoids produced by *Trichoderma longibrachiatum* men. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 428, 1 jun. 2021.

OLDONI, T. L. C. et al. Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. **Food research international**, v. 125, 1 nov. 2019.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

ONG JIN-EONG; GONG WOOL KHOON; CLOUGH, B. F. Structure and productivity of a 20-yr-old stand of *Rhizophora apiculata* Bl. mangrove forest. **Journal of Biogeography**, v. 22, n. 2–3, p. 417–424, 1995.

PADDA, I. S.; PARMAR, M. Flucytosine. **Essentials of Clinical Mycology: Second Edition**, p. 57–60, 17 jan. 2023.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 15 fev. 2016.

PERKINS, H. R. Vancomycin and related antibiotics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 181–197, 1 jan. 1982.

PINHO, N. et al. Nitric Oxide Resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Involves Regulation of Glucose Consumption, Glutathione Metabolism and Abundance of Pentose Phosphate Pathway Enzymes. **Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 277**, v. 11, n. 2, p. 277, 29 jan. 2022.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 992, 25 maio 2020.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 1 mar. 2022.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 1 jul. 2019.

RABIEY, M. et al. Endophytes vs tree pathogens and pests: can they be used as biological control agents to improve tree health? **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 3, p. 711–729, 1 nov. 2019.

RAMIREZ, C. S. P.; NOTARTE, K. I. R.; DELA CRUZ, T. E. E. Antibacterial activities of mangrove leaf endophytic fungi from Luzon Island, Philippines. **Studies in Fungi**, v. 5, n. 1, p. 320–331, 2020.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REID, W. V. et al. Bioprospecting. **Issues in Science and Technology**, 1994.

ROCHA, W. R. V. DA et al. Candida genus - Virulence factors, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283–e43910414283, 17 abr. 2021.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 1 maio 2014.

ROMERO, G. A. S. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, 29 jun. 2017.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On Commensalism of *Candida*. **Journal of Fungi 2020, Vol. 6, Page 16**, v. 6, n. 1, p. 16, 17 jan. 2020.

ROSA, L. H. et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, v. 32, n. 2, p. 161–167, 30 fev. 2009.

ROSA, L. H. et al. LEISHMANICIDAL, TRYPANOCIDAL, AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED WITH BIOACTIVE PLANTS IN BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 420–430, 2010.

ROSS, M. R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 11 nov. 1903.

RÜEGGER, A. et al. Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai. **Helvetica Chimica Acta**, v. 59, n. 4, p. 1075–1092, 2 jun. 1976.

RUHE, J. et al. Obligate biotroph pathogens of the genus *Albugo* are better adapted to active host defense compared to niche competitors. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. JUNE2016, p. 820, 20 jun. 2016.

SADAN et al. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plants Research**, 2011.

SAHA, P. et al. Bioprospecting for Fungal-Endophyte-Derived Natural Products for Drug Discovery. p. 35–49, 2019.

SAHOO, S.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. Diversity of Marine Macro-Algicolous Endophytic Fungi and Cytotoxic Potential of *Biscogniauxia petrensis* Metabolites Against Cancer Cell Lines. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1472, 14 jun. 2021.

SANDILANDS, E. A.; BATEMAN, D. N. Opioids. **Medicine**, v. 44, n. 3, p. 187–189, 1 mar. 2016.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 1 maio 2021.

SAURABH, P. et al. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293–304, 2015.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 4 jul. 2015.

SEBASTIANES, F. L. S.; DE AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T. Diversity and Biotechnological Potential of Endophytic Microorganisms Associated with Tropical Mangrove Forests. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**, p. 37–56, 10 jun. 2017.

SERENO, D. et al. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. **Acta tropica**, v. 80, n. 3, p. 195–205, 21 dez. 2001.

SHAFIEI, M. et al. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104240, 1 nov. 2020.

SHAKED-MISHANT, P. et al. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3971–3976, 9 fev. 2001.

SHANG, Z. et al. Diverse Secondary Metabolites Produced by Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. MA75 on Various Culture Media. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1338–1348, 1 jul. 2012.

SHOR, E.; PERLIN, D. S. Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004668, 1 mar. 2015.

SHU, Y. et al. Bioactive cytochalasans from the fungus *Arthrinium arundinis* DJ-13. **Phytochemistry**, v. 194, p. 113009, 1 fev. 2022.

SIB, A.; GULDER, T. A. M. Chemo-enzymatic Total Synthesis of Oxosorbicillinol, Sorrentanone, Rezishanones B and C, Sorbicatechol A, Bisvertinolone, and (+)-Epoxy-sorbicillinol. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 57, n. 44, p. 14650–14653, 26 out. 2018.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. A comprehensive classification of solvent systems used for natural product purifications in countercurrent and centrifugal partition chromatography. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 11, p. 1556–1561, 1 nov. 2015.

SOPALUN, K. et al. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with thai mangrove plants. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 66–76, 1 set. 2021.

SOUZA, C. A. et al. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica. Em: **Educação Ambiental sobre Manguezais**. [s.l.: s.n.].

SOVERNIGO, M. H. Manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC): uma revisão da disponibilidade de dados ecológicos visando o direcionamento de novos estudos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 595, 2009.

SPALDING, M. **World Atlas of Mangroves**. [s.l.] Routledge, 2010.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

SUNDAR, S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, 5 fev. 2011.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. <https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1552853>, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2 jan. 2018.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 9–19, 1 fev. 2009.

TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi** 2021, Vol. 7, Page 79, v. 7, n. 2, p. 79, 22 jan. 2021.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 1 jun. 2016.

TYAGI, G. et al. Cure lies in nature: medicinal plants and endophytic fungi in curbing cancer. **3 Biotech** 2021 11:6, v. 11, n. 6, p. 1–24, 12 maio 2021.

VALLE, I. V. et al. Oral pentamidine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles: an alternative approach for leishmaniasis treatment. **Nanotechnology**, v. 30, n. 45, p. 455102, 21 ago. 2019.

VAN DAELE, R. et al. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical Mycology**, v. 57, n. Supplement\_3, p. S328–S343, 1 jun. 2019.

VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 17 dez. 2013.

VEREKAR, S. A.; GUPTA, M. K.; DESHMUKH, S. K. Discovery of Bioactive Metabolites from the Genus *Arthrinium*. **Fungi and Fungal Products in Human Welfare and Biotechnology**, p. 257–287, 2023.

VERMA, V. C. et al. The Endophytic Mycoflora of Bark, Leaf, and Stem Tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 119–125, jul. 2007.

VERMEERSCH, M. et al. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance

of stage-specific differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, 2009.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 1 ago. 2000.

VIANNA, G. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. **Annaes Paulitas de Medicina e Cirurgia**, 1914.

WANG, J. et al. Exocellular polysaccharides extracted from mangrove fungus *Paecilomyces lilacinus* present anti-HSV-1 activity in mice. **Journal of Virological Methods**, v. 297, p. 114246, 1 nov. 2021.

WANG, K.-W. et al. Bioactive Natural Compounds from the Mangrove Endophytic Fungi: Ingenta Connect. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 370–391, 1 abr. 2014.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1 maio 1971.

WATERMAN, P. G. Secondary Metabolites: Their Function and Evolution - Google Livros. Em: CHADWICK, D.; WHELAN, J. (Eds.). **Secondary Metabolites: Their Function and Evolution**. [s.l.] John Wiley & Sons Ltd., 1992. p. 255–269.

WEN, J. et al. Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2022.

WHITE, T. C. et al. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1704–1713, 2002.

WHO. **Control of the leishmaniasis**. [s.l.: s.n.].

WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology 2004 20:3**, v. 20, n. 3, p. 265–272, 2004.

WOOLLEY, D. W. SOME BIOLOGICAL EFFECTS PRODUCED BY BENZIMIDAZOLE AND THEIR REVERSAL BY PURINES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 152, n. 2, p. 225–232, 1 fev. 1944.



**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 21 jul. 2022.

WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 55–57, 1 jan. 2019.

YANG, T. SEN et al. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 8, p. 1794–1801, 1 ago. 2013.

YAO, H. et al. Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 9 abr. 2019.

YOUNG, J.; KIMA, P. E. Focus: Organelles: The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 511, 2019.

ZHANG, J. Y. et al. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 584–591, 2014.








ZHANG, J.-H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A simple Statistical Parameter for Use in Evaluate and Validation of High Troughput Screening Assays. **Jornal of Biomolecular Screening**, v. 4, 1999.

ZHANG, P. et al. Anti-inflammatory Mono- and Dimeric Sorbicillinoids from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma reesei* 4670. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 4, p. 947–957, 26 abr. 2019.

## APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Open Access Article

### Bioactivity Screening and Chemical Characterization of Biocompound from Endophytic *Neofusicoccum parvum* and *Buergenerula spartinae* Isolated from Mangrove Ecosystem

by  Rafael Dorighello Cadamuro <sup>1</sup>  ,  Isabela Maria Agustini da Silveira Bastos <sup>1</sup>  ,  
 Ana Claudia Oliveira de Freitas <sup>1</sup> ,  Marilene da Silva Rosa <sup>1</sup> ,  Geovanna de Oliveira Costa <sup>2</sup> ,  
 Izabella Thaís da Silva <sup>1,3</sup>  ,  Diogo Robl <sup>1</sup> ,  Patricia Hermes Stoco <sup>1</sup> ,  
 Louis Pergaud Sandjo <sup>2</sup>  ,  Helen Treichel <sup>4</sup>  ,  Mário Steindel <sup>1</sup>  and  
 Gislaine Fongaro <sup>1,\*</sup>  

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 99700970, RS, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Microorganisms* **2023**, *11*(6), 1599; <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061599>

Received: 9 May 2023 / Revised: 5 June 2023 / Accepted: 7 June 2023 / Published: 16 June 2023

CADAMURO RAFAEL, BASTOS ISABELA, DE FREITAS ANA CLAUDIA, ROSA MARILENE, COSTA GEOVANNA, SILVA THAÍS, ROBL DIOGO, STOCO PATRÍCIA, SANDJO LOUIS, TREICHEL HELEN, STEINDEL MÁRIO, FONGARO GISLAINE. Microorganisms

#### **Fator de impacto 4.5**

The discovery of biomolecules has been the subject of extensive research for several years due to their potential to combat harmful pathogens that can lead to environmental contamination and infections in both humans and animals. This study aimed to identify the chemical profile of endophytic fungi, namely *Neofusicoccum parvum* and *Buergenerula spartinae*, which were isolated from *Avecinnia schaueriana* and *Laguncularia racemosa*. We identified several HPLC-MS compounds, including Ethylidene-3,39-biplumbagin, Pestauvicolactone A, Phenylalanine, 2-Isopropylmalic acid, Fusaproliferin, Suspendole, Ansellone, Calanone derivative, Terpestacin, and others. Solid-state fermentation was conducted for 14–21 days, and methanol and dichloromethane extraction were performed to obtain a crude extract. The results of our cytotoxicity assay revealed a  $CC_{50}$  value  $> 500$   $\mu\text{g/mL}$ , while the virucide, Trypanosoma, leishmania, and yeast assay demonstrated no inhibition. Nevertheless, the bacteriostatic assay showed a 98% reduction in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Our findings suggest that these endophytic fungi species with distinct chemical profiles represent a promising niche for further exploring new biomolecules.