



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Marilene da Silva Rosa

**Bioprospecção de compostos com potencial atividade antibacteriana e anti*Trypanosoma cruzi* a partir do biobanco de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina**

Florianópolis  
2023

Marilene da Silva Rosa

**Bioprospecção de compostos com potencial atividade antibacteriana e anti*Trypanosoma cruzi* a partir do biobanco de fungos endofíticos 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 como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Mário Steindel, Dr.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Patrícia Hermes Stoco, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Marilene da Silva

Bioprospecção de compostos com potencial atividade antibacteriana e antiTrypanosoma cruzi a partir do biobanco de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina / Marilene da Silva Rosa ; orientador, Mario Steindel, coorientador, Patricia Hermes Stoco, 2023.

98 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. Fungos endofíticos. 3. Atividade antitripanosoma. 4. Atividade antibacteriana. 5. Sorbicilinoídes. I. Steindel, Mario . II. Stoco, Patricia Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Marilene da Silva Rosa

**Bioprospecção de compostos com potencial atividade antibacteriana e anti*Trypanosoma cruzi* a partir do biobanco de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 20 de setembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Juliane Araújo Greinert Goulart, Dra.

Instituição Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB

Prof. Edmundo Carlos Grisard, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

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

Insira neste espaço a  
assinatura digital

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

---

Prof. Mario Steindel, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho ao meu maior incentivador,  
meu apoio e suporte em todos os momentos,  
por todo amor e compreensão,  
meu noivo Renato Schmitz.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Steindel e minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Hermes Stoco, por terem aceitado me conduzir neste trabalho. Sou muito grata por toda orientação e conversas para que eu pudesse evoluir como profissional. Obrigada pela oportunidade e convívio.

Ao Laboratório de Protozoologia, por ceder os equipamentos e reagentes para os testes com protozoários e cultivo celular. Aos professores, companheiros de pesquisa e aos iniciação científica, pelo convívio diário. A Bibiana Dambrós e Ana Claudia pelo auxílio com o cultivo celular e testes com protozoários.

Ao Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB), ao Prof. Dr. Diogo Robl e a então mestranda Isabela Bastos, por cederem os fungos utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), ao Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo, por ajudar e construir boa parte deste trabalho, aos amigos que fiz neste laboratório Gabriella, Monalisa, Tiago Tizziani, Lucas, Jhuly e Oto, pelas trocas e por me receberem tão bem, me senti parte do grupo em todo o período em que estive aí. Sem o auxílio e suporte de vocês esse trabalho não seria possível.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (GeMBac) em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabienne, por sua disponibilidade, incentivo, por acreditar e confiar em mim ao abrir as portas do seu laboratório.

Ao Laboratório de Ficologia (LAFIC), ao Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig e ao mestrando Diego Serrasol, por ceder e auxiliar com parte da liofilização dos extratos.

Ao Laboratório Central de Análises Químicas (CFM/UFSC) pelo auxílio na realização das análises por CLUE-ESI-EM.

A toda equipe do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB), em especial aos técnicos Bibiana Sgorla, Flávia Cardoso e Willian Oliveira pela disponibilização dos equipamentos e suporte na utilização. Este espaço é muito importante para que muitas pesquisas sejam realizadas.

Aos meus amigos do mestrado em Biotecnologia e Biociências, em especial Carla, Joana e João pelos ótimos momentos que compartilhamos, pelos desabafos, pela parceria e trocas, dos almoços e cafés deliciosos, choros e risadas que tivemos ao longo deste tempo juntos. Foi um prazer conhecer vocês, esta jornada se tornou muito mais leve com a presença de vocês.

As minhas amigas e companheiras de UFSC Bea Cardoso, Daf Reinisch, Fer Reckziegel, Flá Barbosa, Gabi Zanini, Ju Espindola, Monni Gandin, e a pra sempre minha dupla Suli Andrade. Como sou grata por ter vocês, o incentivo de vocês foi muito importante durante esse período.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edna Regina Amante, minha inspiração de profissional e ser humano. Por sempre ser um ombro amigo e suporte desde a graduação.

A Essentia Group, por me possibilitar, no primeiro ano de mestrado, fazer as disciplinas em paralelo às minhas atividades de trabalho. Aos meus queridos amigos Wellen e Günther, pelas infinitas conversas e trocas sobre a prática dos conhecimentos adquiridos e por serem meus incentivadores.

Aos queridos amigos Tefa, Fê Vieira, Fê Peralta e João Marcos pelos inúmeros convites para jantar ao final de um sábado/domingo dedicados aos estudos, por toda parceria.

A toda minha família. Especialmente minha mãe Jocelina, por ser meu porto seguro, por sempre me incentivar na busca pelos meus sonhos e entender meus momentos de ausência, sua força é minha maior inspiração. Aos meus segundos pais dona Neli e seu Paulo que simplesmente não medem esforços para me verem feliz. Meu sobrinho Gael, que sempre torna a caminhada mais leve e feliz. Vocês são incríveis, obrigada por existirem, eu amo vocês!

A Deus, por ter me dado força, sabedoria e saúde para chegar até aqui, e seguir em frente.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), instituição da qual tenho imenso orgulho e sou grata pela oportunidade de ter um estudo gratuito e de qualidade.

A FAPESC pela bolsa de mestrado e a FAPESC/CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e por me oportunizar ter seus conhecimentos compartilhados na forma de contribuições para este trabalho.

Muito obrigada!

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(CURIE, Marie.1867-1934)

## RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, afeta cerca de 6 milhões de pessoas no mundo e o tratamento desta parasitose conta com apenas dois medicamentos disponíveis, ambos desenvolvidos na década de 1960. Na mesma linha, a resistência aos antimicrobianos é um dos maiores problemas para saúde pública e novas alternativas de tratamento para infecções causadas por bactérias são necessárias. Fungos endofíticos se constituem em uma fonte potencial para prospecção de biomoléculas com potencial biotecnológico e farmacológico. O presente estudo buscou identificar novos compostos com atividade antitripanosoma e antibacteriana a partir de fungos endofíticos de plantas de mangue utilizando uma abordagem bioguiada. A partir do cultivo de 12 fungos endofíticos em substrato sólido, foram produzidos 21 extratos totais por maceração química com os solventes diclorometano (DCM) e metanol (MeOH). Na triagem contra formas epimastigotas de cultura de *T. cruzi*, os extratos totais DCM dos fungos *Arthrinium* sp., *Trichoderma longibrachiatum* e *Stemphylium* sp., na concentração de 50 µg/ml reduziram o crescimento do parasito em 20,91%, 40,49% e 63,50%, respectivamente. A concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) contra as formas amastigotas de *T. cruzi* mostrou valores de C<sub>50</sub> de 5,40, 27,40 e 37,24 µg/ml, com índice de seletividade (IS) de 8,42, 9,77 e 6,17, respectivamente. A citotoxicidade 50% (CC<sub>50</sub>) para a linhagem celular THP-1 dos mesmos fungos variou de 45,49 a 267,67 µg/ml. Na avaliação antibacteriana contra bactérias Gram positivas *E. faecalis* e *S. aureus* e Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, nenhum dos extratos totais apresentou atividade nas concentrações de 50 e 500 µg/ml. A partir do particionamento foram obtidas 7 frações particionadas (Hexano (Hex), Acetato de Etila (AcOEt), n-butanol e residual água). A triagem contra formas epimastigotas de *T. cruzi* revelou que o extrato particionado AcOEt dos fungos *T. longibrachiatum* e *Stemphylium* sp., reduziram o crescimento parasitário em 52,00% e 51,97%, respectivamente, na concentração de 50 µg/ml, mas não tiveram atividade relevante contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A CC<sub>50</sub> para a linhagem THP-1 foi de 95,20 µg/ml e 168,27 µg/ml, respectivamente, e contra as formas amastigotas de *T. cruzi*, a CI<sub>50</sub> de 207,77 e 184,97 µg/ml, resultando em IS baixos (0,46 e 0,91), respectivamente. O extrato particionado ativo AcOEt do fungo *Stemphylium* sp. foi fracionado por *cromatografia flash* Isolera gerando 6 frações pré purificadas. A fração mais pura Hex 60: 40 AcOEt e de maior rendimento, foi submetida a purificação em coluna C18 e análise por CLUE-ESI-EM. Foram obtidas 91 subfrações purificadas, e destas, 3 sequências de subfrações foram agrupadas por similaridade e submetidas às análises por CLUE-ESI-EM. Foram identificados 5 compostos majoritários (bisvertinol, bisvertinolona, diidrobisvertinol, diidrosorbicilinol e 10-11 diidrobisvertinolona), pertencentes ao grupo de compostos naturais sorbicilínóides, sendo os potenciais responsáveis pela atividade biológica observada.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos; Atividade antitripanosoma; Atividade antibacteriana; Sorbicilinoídes.

## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas disease, affects around 6 million people worldwide and the treatment of this parasite has only two drugs available, both developed in the 1960s. In the same vein, resistance to antimicrobials is one of the Greater public health problems and new treatment alternatives for infections caused by bacteria are possible. Endophytic fungi are a specific potential source for prospecting biomolecules with biotechnological and pharmacological potential. The present study sought to identify new compounds with antitrypanosome and antibacterial activity from endophytic fungi of mangrove plants using a bioguided approach. From the cultivation of 12 endophytic fungi on a solid substrate, 21 total extracts were produced by chemical maceration with the solvents dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH). In screening against epimastigote forms of *T. cruzi* culture, DCM total extracts of the fungi *Arthrinium* sp., *Trichoderma longibrachiatum* and *Stemphylium* sp., at a concentration of 50 µg/ml reduced parasite growth by 20.91%, 40.49 % and 63.50%, respectively. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) against the amastigote forms of *T. cruzi* showed C<sub>50</sub> values of 5.40, 27.40 and 37.24 µg/ml, with a selectivity index (SI) of 8.42, 9.77 and 6.17, respectively. The 50% cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) for the THP-1 cell line of the same fungi ranged from 45.49 to 267.67 µg/ml. In the antibacterial evaluation against Gram positive bacteria *E. faecalis* and *S. aureus* and Gram negative *E. coli* and *P. aeruginosa*, none of the total extracts showed activity at concentrations of 50 and 500 µg/ml. From the partitioning, 7 partitioned fractions were obtained (Hexane (Hex), Ethyl Acetate (AcOEt), n-butanol and waste water). A screening against epimastigote forms of *T. cruzi* revealed that the EtOAc partitioned extract of the fungi *T. longibrachiatum* and *Stemphylium* sp., reduced parasitic growth by 52.00% and 51.97%, respectively, at a concentration of 50 µg/ml, but had no relevant activity against trypomastigote forms of *T. cruzi*. The CC<sub>50</sub> for the THP-1 lineage was 95.20 µg/ml and 168.27 µg/ml, respectively, and against the amastigote forms of *T. cruzi*, an IC<sub>50</sub> of 207.77 and 184.97 µg/ml, resulting in low IS (0.46 and 0.91), respectively. The active partitioned extract AcOEt from the fungus *Stemphylium* sp. was fractionated by Isolera flash chromatography generating 6 pre-purified fractions. The purest fraction Hex 60: 40 AcOEt and with the highest yield, was subjected to purification on the C18 column and analysis by CLUE-ESI-EM. 91 purified subfractions were obtained, and these, 3 subfraction sequences were grouped by similarity and subjected to investigations by CLUE-ESI-EM. 5 major compounds were identified (bisvertinol, bisvertinolone, dihydrobisvertinol, dihydrosorbicillinol and 10-11 dihydrobisvertinolone), belonging to the group of natural sorbicillinoid compounds, being potentially responsible for the observed biological activity.

**Keywords:** Endophytic fungi; Antitrypanosome activity; Antibacterial activity; Sorbicillinoids.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 19 |
| Figura 2 - Estrutura química dos medicamentos utilizados para tratamento da doença de Chagas.....   | 20 |
| Figura 3 - Estrutura química de compostos isolados de fungos.....   | 25 |
| Figura 4 - Fluxograma da visão geral do trabalho.....   | 31 |
| Figura 5 - Aspecto macromorfológico de fungos endofíticos cultivados em meio BHI por 7 dias a 25 °C.....  | 47 |
| Figura 6 - Cromatografia de camada delgada representativa dos extratos totais DCM ativos contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....   | 51 |
| Figura 7 - Fluxograma da obtenção das frações e os respectivos rendimentos a partir do extrato particionado ativo AcOEt do fungo IASF2A10006.....   | 59 |
| Figura 8 – Cromatografia de camada delgada na luz UV 254 nm das frações do extrato fúngico ASF2A10006 AcOEt obtidas por <i>Cromatografia flash</i> Isolera.....   | 60 |
| Figura 9 - Cromatografia de Camada Delgada luz UV 254nm das sub frações 35 a 56 da Coluna 1.....  | 61 |
| Figura 10 - Fluxograma de obtenção das subfrações em coluna de fase reversa C18 a partir da fração Hex 60: 40 AcOEt por <i>Cromatografia flash</i> Isolera e os respectivos rendimentos.....  | 63 |
| Figura 11 – Cromatografia de camada delgada da união das subfrações 30 a 48 obtidas da Coluna C18 a partir da fração Hex 60:40 AcOEt da <i>cromatografia flash</i> Isolera por extração líquido:líquido DCM e BuOH.....   | 65 |
| Figura 12 - Cromatografia de Camada Delgada reunião das sub frações com precipitado obtidas da coluna C18, DCM 90: 10 MeOH.....   | 66 |
| Figura 13 - Cromatograma adquirido no modo de ionização negativo da análise de CLUE-ESI-EM referente a fração pré purificada por <i>cromatografia flash</i> Isolera e subfração da coluna de fase reversa C18 para o extrato fúngico de <i>Stemphylium</i> sp. .... | 68 |
| Figura 14 - Estrutura dos compostos identificados na fração Hex 60:40 AcOEt e suas subfrações obtidas em coluna de fase reversa C18 do fungo <i>Stemphylium</i> sp. ....  | 70 |
| Figura 15 - Mecanismo de fragmentação para molécula diidrobisvertinol.....  | 70 |
| Figura 16 - Mecanismo de fragmentação para molécula bisvertinol ou isobisvertinol. ....   | 71 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17 - Mecanismo de fragmentação da molécula bisvertinolona.....  | 72 |
| Figura 18 - Mecanismo de fragmentação da molécula 10,11- diidrobisvertinolona...72   | 72 |
| Figura 19 - Cromatograma adquirido no modo de ionização negativo da análise de CLUE-ESI-EM referente às subfrações 1-5, 30-48 DCM e 80-88 obtidas após purificação em coluna de fase reversa C18 a partir da fração Hex 60:40 AcOEt..... | 73 |
| Figura 20 – Seleção para os ensaios biológicos das subfrações obtidas em coluna de fase reversa C18 a partir da fração pré purificada Hex 60:40 AcOEt da <i>cromatografia flash</i> Isolera.....   | 77 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Isolados fúngicos obtidos de plantas de mangue de Florianópolis - SC utilizados no presente estudo.....  | 30 |
| Tabela 2 - Dados dos solventes utilizados no particionamento dos extratos totais...38  |    |
| Tabela 3 – Rendimento de extratos totais de fungos endofíticos de plantas de mangue utilizando diferentes solventes. ....  | 43 |
| Tabela 4 – Percentual de mortalidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com extratos totais de fungos endofíticos na concentração de 50 µg/ml. ....                                   | 46 |
| Tabela 5 - Concentração citotóxica para células THP-1 dos extratos fúngicos totais pré selecionados. ....  | 48 |
| Tabela 6 - Concentração Inibitória de 50 % para amastigotas intracelulares e os IS dos extratos fúngicos totais pré selecionados. ....   | 49 |
| Tabela 7 - Rendimento de extratos particionados obtidos de extratos totais DCM ativos de fungos endofíticos de plantas de mangue utilizando diferentes solventes. ....                                 | 53 |
| Tabela 8 - Percentual de mortalidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com extratos particionados de fungos endofíticos de plantas de mangue na concentração de 50 µg/ml .....       | 55 |
| Tabela 9 - Concentração citotóxica para células THP-1 dos extratos fúngicos particionados pré selecionados com base na mortalidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                    | 56 |
| Tabela 10 - Concentração Inibitória de 50% para amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e IS dos extratos fúngicos particionados. ....   | 57 |
| Tabela 11 - Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com extratos particionados.....  | 58 |
| Tabela 12 - Valores de rendimento do extrato ativo AcOEt IASF2A10006 fracionado por <i>Cromatografia flash</i> Isolera. ....   | 61 |
| Tabela 13 - Compostos caracterizados a partir da fração pré purificada no Isolera e subfrações purificadas em coluna C18 do extrato fúngico de <i>Stemphylium</i> sp. por análise de CLUE-ESI-EM. .... | 68 |
| Tabela 14 - Atividades biológicas para os compostos majoritários identificados. ....   | 74 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ACN              | Acetonitrila   |
| AcOEt            | Acetato de Etila   |
| ATCC             | <i>American Type Culture Collection</i>                                      |
| BuOH             | n-Butanol  |
| BZN              | Benznidazol  |
| $\beta$ -Gal     | Beta Galactosidase   |
| CAS              | <i>American Chemical Society</i>   |
| CC <sub>50</sub> | Concentração Citolóxica 50%  |
| CCD              | Cromatografia de camada delgada  |
| CDC              | <i>Centers for disease control and Prevention</i>                            |
| CI <sub>50</sub> | Concentração Inibitória 50%  |
| CLSI             | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                           |
| CLUE-ESI-EM      | Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa |
| CPRG             | <i>Chlorophenol Red-<math>\beta</math>-D-galactopyranoside</i>               |
| DCM              | Diclorometano  |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido   |
| DO               | Densidade Ótica  |
| Hex              | Hexano   |
| IS               | Índice de Seletividade   |
| ITS              | <i>Internal Transcribed Spacer</i>   |
| L929             | Linhagem de fibroblastos murinos   |
| Rf               | Fator de Retenção  |
| MeOH             | Metanol  |
| MS <sup>2</sup>  | Dois Estágios de Análise de Massas   |
| RMN              | Ressonância Magnética Nuclear  |
| THP-1            | Monócito humano de sangue periférico   |
| UFC              | Unidade formadora de colônia   |
| UV               | Ultra Violeta  |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>18</b> |
| 2.1      | DOENÇA DE CHAGAS.....   | 18        |
| 2.2      | INFECÇÕES HUMANAS POR BACTÉRIAS .....   | 21        |
| 2.3      | BIODIVERSIDADE NA BUSCA DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....                             | 23        |
| <b>3</b> | <b>HIPÓTESE</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>29</b> |
| 4.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 29        |
| 4.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 29        |
| <b>5</b> | <b>MATERIAL</b> .....   | <b>30</b> |
| 5.1      | ISOLADOS FÚNGICOS.....  | 30        |
| <b>6</b> | <b>MÉTODOS</b> .....  | <b>31</b> |
| 6.1      | CULTIVO DOS ISOLADOS FÚNGICOS E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS.....                      | 31        |
|          | .....   | 31        |
| 6.1.1    | <b>Cultivo em Bolsas</b> .....  | <b>32</b> |
| 6.1.2    | <b>Maceração Química</b> .....  | <b>32</b> |
| 6.1.3    | <b>Liofilização dos Extratos</b> .....  | <b>33</b> |
| 6.2      | ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE ISOLADOS FÚNGICOS ..                        | 33        |
| 6.2.1    | <b>Avaliação da atividade antitripanosoma</b> .....                             | <b>33</b> |
| 6.2.1.1  | <i>Triagem dos extratos frente às formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi</i> | 33        |
|          | .....   | 33        |
| 6.2.1.2  | <i>Avaliação dos extratos frente às formas tripomastigotas</i> .....            | 34        |
| 6.2.1.3  | <i>Avaliação dos extratos frente às formas intracelulares</i> .....             | 34        |
| 6.2.2    | <b>Avaliação da atividade citotóxica dos extratos frente às células THP-1</b>   | 35        |
|          | .....   | 35        |
| 6.2.3    | <b>Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos fúngicos</b> .....        | <b>36</b> |
| 6.2.3.1  | <i>Método de difusão em ágar</i> .....  | 36        |
| 6.2.3.2  | <i>Método de macrodiluição</i> .....  | 36        |
| 6.3      | CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....                               | 37        |
| 6.3.1    | <b>Monitoramento por CCD</b> .....  | <b>37</b> |
| 6.3.2    | <b>Particionamento dos extratos totais</b> .....                                | <b>38</b> |
| 6.3.3    | <b>Fracionamento dos extratos particionados</b> .....                           | <b>38</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 6.3.3.1      | <i>Purificação cromatográfica em Isolera (BIOTAGE®)</i> .....  | 38        |
| 6.3.3.2      | <i>Coluna de bancada fase normal</i> .....   | 39        |
| 6.3.3.2.1    | Coluna 1.....  | 39        |
| 6.3.3.2.2    | Coluna 2.....  | 39        |
| 6.3.3.3      | <i>Coluna de bancada fase reversa (C18)</i> .....  | 40        |
| <b>6.3.4</b> | <b>Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM)</b> .....             | <b>40</b> |
| <b>6.3.5</b> | <b>Rendimento dos extratos totais</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>6.3.6</b> | <b>Rendimento dos Extratos Particionados e Fracionados</b> .....   | <b>41</b> |
| 6.4          | ANÁLISE DE DADOS .....   | 42        |
| <b>7</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>43</b> |
| 7.1          | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS TOTAIS .....   | 43        |
| 7.1.1        | <b>Avaliação de atividade antitripanosoma dos extratos totais frente às formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> .....        | <b>45</b> |
| 7.1.2        | <b>Avaliação da atividade citotóxica dos extratos totais frente às células THP-1</b> .....                                       | <b>47</b> |
| 7.1.3        | <b>Avaliação da atividade dos extratos totais frente às formas amastigotas intracelulares</b> .....                              | <b>49</b> |
| 7.1.4        | <b>Atividade antibacteriana em bactérias Gram positivas e Gram negativas</b> .....   | <b>50</b> |
| 7.1.5        | <b>Triagem dos extratos totais por CCD</b> .....   | <b>51</b> |
| 7.2          | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARTICIONADOS .....  | 52        |
| 7.2.1        | <b>Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> ..... | <b>54</b> |
| 7.2.2        | <b>Avaliação da atividade citotóxica dos extratos particionados frente às células THP-1</b> .....                                | <b>56</b> |
| 7.2.3        | <b>Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas amastigotas intracelulares</b> .....       | <b>57</b> |
| 7.2.4        | <b>Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas tripomastigotas</b> .....                  | <b>57</b> |
| 7.3          | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FRACIONADOS .....  | 58        |
| 7.3.1        | <b>Perfil químico do extrato fúngico IASF2A10006 particionado e subfrações por CLUE-ESI-EM</b> .....                             | <b>67</b> |
| <b>8</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | <b>78</b> |

|     |                          |           |
|-----|--------------------------|-----------|
| 8.1 | PERSPECTIVAS.....        | 78        |
|     | <b>REFERÊNCIAS .....</b> | <b>79</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) causador da doença de Chagas está distribuído geograficamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (WHO, 2022). Estima-se que na América Latina aproximadamente 6 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença. É uma doença negligenciada e faz parte de programas da Organização Pan-Americana da Saúde e Organização das Nações Unidas para controle e eliminação da doença até 2030 (OPAS, 2022; WHO, 2022). Os dois fármacos (Benznidazol e Nifurtimox) disponíveis para tratamento são efetivos na fase aguda e tem baixa eficácia na fase crônica da doença, com muitos efeitos adversos (BELTRAN-HORTELANO, et al., 2022; FDA<sup>a</sup>, 2022; MELO, et al. 2022; WCG<sup>a</sup>, 2022; WCG<sup>b</sup>, 2022).

Outro importante problema de saúde pública está relacionado às infecções humanas por bactérias. Embora muitas delas não representem risco à saúde, algumas espécies são patogênicas tanto para indivíduos imunocompetentes quanto para indivíduos imunocomprometidos (ANVISA<sup>b</sup>, 2004). A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema de saúde mundial e ocorre de maneira natural ao longo do tempo e está relacionada a alterações genéticas que ocorrem nestes microrganismos. É uma ameaça para a saúde pública em escala mundial e merece a atenção na busca por novas fontes de moléculas antimicrobianas (ARIAS; MURRAY, 2012; PEREIRA, et al. 2015; RUPPÉ, et al. 2015; YILMAZ & ÖZCENGİZ, 2017; CDC<sup>b</sup>, 2019; WEF, 2019; ANVISA<sup>a</sup>, 2020).

A busca por novas moléculas tem relação com o avanço do conhecimento na química e na fitoquímica (VIEGAS, 2006). Atualmente muitos dos medicamentos comercializados têm como fonte, ou são inspirados em produtos naturais (OMURA, 2002; DIAS, et al., 2012; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J., 2020). O Brasil possui uma riqueza biológica incomparável, representando cerca de 15 a 20% de toda a biodiversidade do planeta, e boa parte da biodiversidade brasileira permanece amplamente inexplorada. O bioma Mata Atlântica, no qual está inserido o estado de Santa Catarina, está associado também ao ecossistema manguezal (BARBOSA, VIANA, 2014; MONTEIRO, 2017; MACHADO et al., 2021). Em Florianópolis, a área total estimada de manguezal é de 1.744 hectares e, entre eles, estão o manguezal do

Itacorubi e do Rio Ratonés (OBSERVA, 2018; BRASIL<sup>a</sup>, 2022; DIÁRIO CATARINENSE, 2022).

Os fungos endofíticos de plantas de mangue são encontrados no interior de tecidos vegetais em uma relação evolutiva mútua, em simbiose, onde há benefícios para ambos (ROSA, 2021; PARDO et al., 2022). Estes microrganismos se tornam interessantes para busca de produtos naturais, pois são fonte potencial de metabólitos secundários bioativos de interesse biotecnológico, úteis em diferentes aplicações terapêuticas (PELÁEZ et al., 1998; CAMPOS et al., 2015).

A obtenção de moléculas de interesse produzidas por microrganismos, envolve uma série de operações unitárias típicas após o cultivo microbiano para alcançar o produto de interesse. A pesquisa por novos fármacos, requer a colaboração entre as diferentes áreas como a química e biologia, para a avaliação da bioatividade de extratos, sejam eles semi purificados, frações ou finalmente as substâncias puras, nas quais se busca identificar o(s) componente(s) químico(s) e/ou cofator(es) responsáveis pelo efeito biológico (HARBORNE, 1998; SCHMIDELL, et. al., 2001; MACHADO, 2021; CESAD, 2022).

Portanto, considerando a diversidade química dos metabólitos secundários de endófitos relatados na literatura, a caracterização de novos extratos fúngicos poderá trazer informações de grande relevância científica e tecnológica, incluindo a busca de moléculas líder para desenvolvimento de novos agentes antitripanosoma e antibacteriano com potencial biotecnológico e farmacológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DOENÇA DE CHAGAS

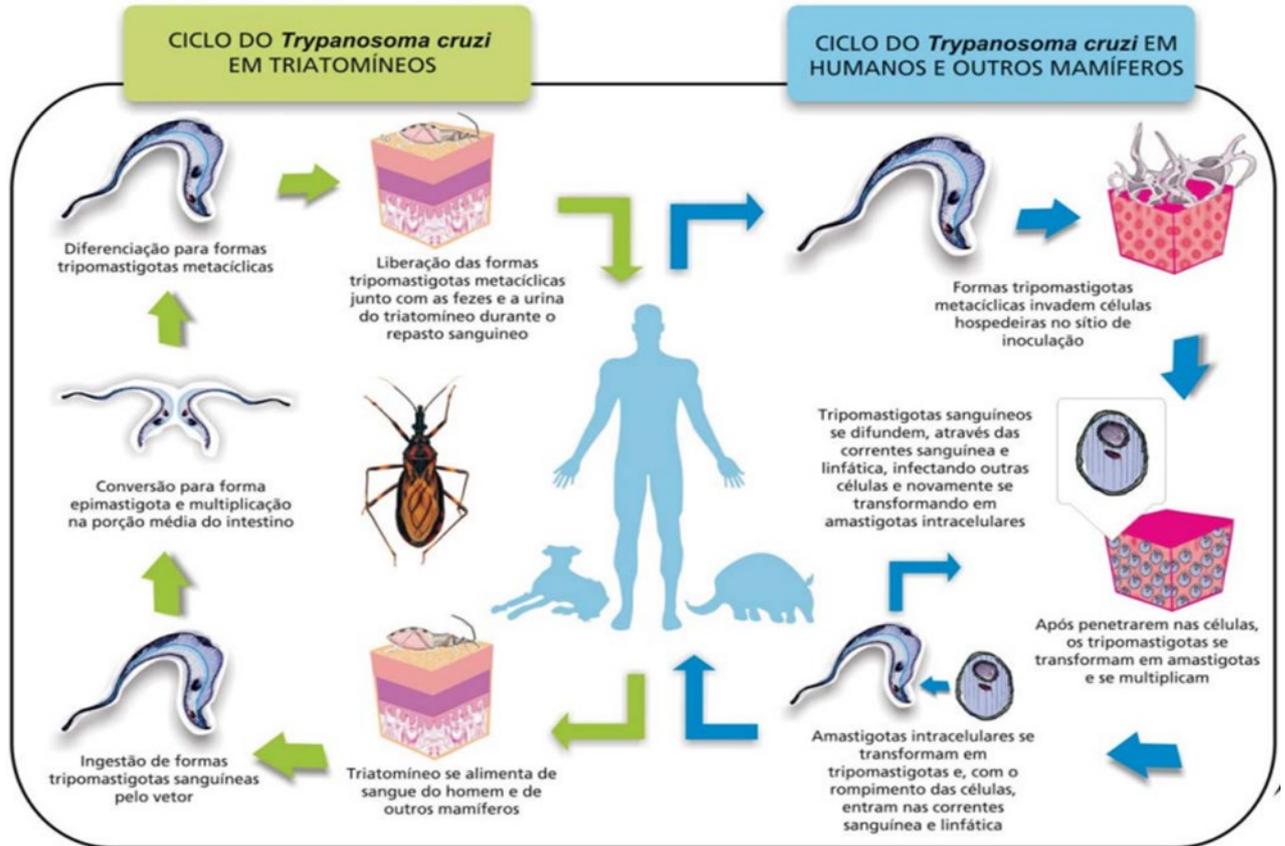
O protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) causador da doença de Chagas é um parasito hemoflagelado, pertencente a classe Kinetoplastea, família Trypanosomatidae que tem como vetor hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae. A transmissão vetorial ocorre pela contaminação da pele ou mucosas com fezes ou urina do inseto infectado, mas pode ocorrer ainda por via transfusional, congênita, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais ou por via oral (ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas) (ARGOLO et al., 2008; FIOCRUZ<sup>b</sup>, 2017; BVS<sup>a</sup>, 2022).

Geograficamente o *T. cruzi* está distribuído no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, sendo considerado como uma espécie heterogênea, com pelo menos seis genótipos circulantes entre triatomíneos e mamíferos no ambiente silvestre e doméstico (GALVÃO. C., 2014; CDC<sup>a</sup>, 2022; MAGALHÃES, L. M. D. et al., 2022). Nos estados brasileiros, em que a doença não é considerada endêmica, há relatos da infecção humana por *T. cruzi* também pela via oral (STEINDEL et al., 2008). Na América Latina, estima-se que aproximadamente 6 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito e cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença (OPAS, 2022; WHO, 2022).

A infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro mamífero ocorre quando o triatomíneo infectado pica o mamífero durante o repasto sanguíneo e libera formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes e urina do inseto sobre a pele ou mucosa do mamífero. Ao acessarem a circulação sanguínea os tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares próximos ao local de entrada, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. Os amastigotas se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas, os quais rompem a célula hospedeira, sendo liberados na circulação sanguínea indo infectar novas células ou permanecem na circulação por algum período. O inseto vetor se infecta ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero com tripomastigotas circulantes. Os tripomastigotas ingeridos se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do vetor onde se multiplicam sucessivamente por divisão binária. No intestino posterior as formas epimastigotas

iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (um processo conhecido como metaciclogênese) (CDC<sup>a</sup>, 2022; FIOCRUZ<sup>c</sup>, 2022) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: ARGOLO et. al., (2008).

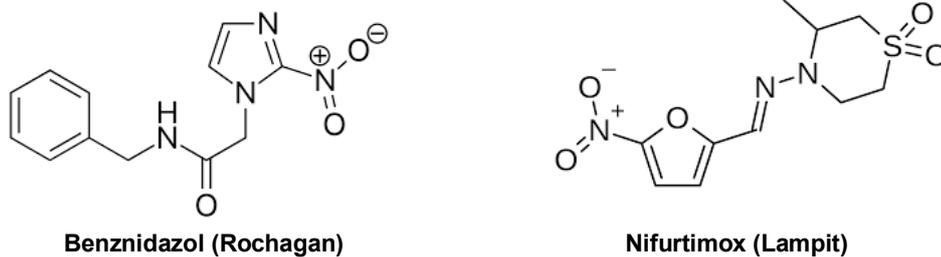
Em humanos a doença de Chagas apresenta duas fases: a aguda que perdura por cerca de 45 dias e a fase crônica que pode se estender por toda a vida do paciente. Do ponto de vista clínico podemos ainda ter uma infecção assintomática ou sintomática e diferentes formas clínicas da doença: forma indeterminada (ausência de sintomas e comprometimento tecidual/ou de órgãos), forma cardíaca (comprometimento cardíaco de leve a grave), forma digestiva (megaesôfago e /ou megacólon) e forma mista ou cardio-digestiva (FIOCRUZ<sup>d</sup>, 2017).

A fase aguda da doença usualmente está acompanhada de febre, adenomegalia, arritmia cardíaca, entre outros sintomas e se caracteriza pela presença de tripomastigotas no sangue circulante. Nesta fase o diagnóstico pode ser feito pela detecção direta do parasito por meio de exame parasitológico, hemocultura ou via PCR ou ainda por exame sorológico destacando-se a detecção de anticorpos da classe IgM. Na fase crônica a parasitemia pode ser subpatente ou indetectável, apesar

de poderem existir graves sintomas clínicos. Nesta fase, o diagnóstico clínico é usualmente confirmado por meio de exames laboratoriais - sorologia e PCR (FIOCRUZ<sup>d</sup>, 2017; ALVES, 2018).

Existem apenas dois medicamentos (Figura 2) disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, sendo dois compostos nitroheterocíclicos: o benznidazol (BZN), um nitroimidazólico (Rochagam® - ROCHE) e nifurtimox, um nitrofurano (Lampit® - BAYER, 2022). Ambos foram desenvolvidos na década de 1960, e apenas o BZN tem seu uso permitido no Brasil. Estes fármacos são administrados via oral e apresentam melhor eficácia na fase aguda (ou inicial) da doença, mas tem pouca ou nenhuma efetividade na fase crônica da doença onde se encontra a maioria dos infectados pelo *T. cruzi* (BELTRAN-HORTELANO, et al., 2022; FDA<sup>a</sup>, 2022; MELO, et al. 2022; WCG<sup>a</sup>, 2022; WCG<sup>b</sup>, 2022).

Figura 2 - Estrutura química dos medicamentos utilizados para tratamento da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de FIOCRUZ<sup>a</sup> (2023).

O tratamento na fase crônica deve levar em conta os benefícios potenciais das medicações existentes, considerando o tempo do tratamento e as possíveis reações adversas que ocorrem em até 40% dos pacientes adultos tratados (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015). Além disso, há significativos efeitos colaterais provocados pelo BZN, medicamento com uso clínico considerado seguro. Dentre as manifestações mais frequentes estão a dermatite com erupção cutânea, linfadenopatia, dores musculares e nas articulares, depressão da medula óssea - incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; polineuropatia periférica por parestesias e polineurite. Estas manifestações podem ser graves ao ponto de interromper o tratamento (FERREIRA et al., 2019; WCG<sup>a</sup>, 2022).

A limitação dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas, sua relevância para a saúde pública e o fato das tripanossomíases serem consideradas doenças tropicais negligenciadas (DTN) demonstra a grande importância de buscar moléculas bioativas que contribuam para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes chagásicos (FIOCRUZ<sup>b</sup>, 2017; BVS<sup>a</sup>, 2022; SBMT, 2022).

## 2.2 INFECÇÕES HUMANAS POR BACTÉRIAS

Outro importante problema de saúde pública está relacionado às infecções humanas por bactérias. As bactérias são encontradas no meio ambiente e também fazem parte da nossa microbiota indígena. Embora a maioria delas não represente risco à saúde, algumas espécies são patogênicas tanto para indivíduos imunocompetentes quanto para indivíduos imunocomprometidos (ANVISA<sup>b</sup>, 2004). Estudo realizado pelo *Global Burden Disease* em 2019 mostra que as infecções bacterianas comuns se tornaram a segunda causa de mortalidade, sendo responsáveis por cerca de 7,7 milhões de óbitos globalmente (GBD, 2022).

Para o tratamento das infecções bacterianas são utilizados antimicrobianos que podem ter efeito bacteriostático ou bactericida. A descoberta dos antibióticos revolucionou a história da medicina, mas seu uso indiscriminado em humanos e animais, pode estar associado a resistência de bactérias aos antimicrobianos (RAM). Quando existe resistência a mais de um antimicrobiano, os microrganismos passam a ser denominados como multirresistentes (ANVISA, 2020<sup>a</sup>; BVS<sup>b</sup>, 2022; OPAS/OMS, 2022).

A RAM é um desafio para a saúde mundial e ocorre de maneira natural ao longo do tempo e está relacionada a alterações genéticas que ocorrem nestes microrganismos. A capacidade de multirresistência, por algumas linhagens, pode ocorrer por mutação cromossômica, ou aquisição de plasmídeo, entre diferentes espécies ou gêneros (ARIAS; MURRAY, 2012; PEREIRA, et al. 2015; YILMAZ & ÖZCENGİZ, 2017). Essa troca horizontal de genes é auxiliada por plasmídeos que contêm um ou mais de um gene de resistência, que pode resultar em alta produção de  $\beta$ -lactamases, superexpressão de bombas de efluxo, mudanças em sítios alvo de antimicrobianos e alterações na permeabilidade celular (RUPPÉ, et al. 2015; CDC<sup>b</sup>, 2019; ANVISA<sup>a</sup>, 2020).

Alguns grupos de bactérias têm uma propensão a serem mais resistentes que outros. Podemos dividir as bactérias em dois grandes grupos pela estrutura da sua parede celular que pode ser observada por meio da coloração Gram. As bactérias Gram positivas possuem parede celular mais espessa e as Gram negativas possuem parede celular com uma camada de peptidoglicano mais fina e uma parede celular externa, que não existe nas Gram positivas. De maneira geral, quando há presença de lipopolissacarídeo na parede exterior das bactérias Gram negativas, estas se tornam mais patogênicas e assim, podem ser refratárias ao tratamento clínico aumentando as taxas de morbidade e mortalidade (NOGUEIRA et al., 2015). Como representantes de bactérias Gram positivas temos os gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus*, e como representantes de bactérias Gram negativas os gêneros *Escherichia* e *Pseudomonas*.

*Staphylococcus aureus* é considerado um patógeno humano oportunista frequentemente associado com infecções adquiridas em hospitais e sua comunidade hospitalar. As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos. Infecções agudas por *S. aureus* podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer. Sua resistência é mediada pela aquisição de genes que codificam para enzimas  $\beta$ -lactamases e dentro deste conjunto de cepas há um grupo denominado *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (ANVISA<sup>c</sup>, 2022).

*Enterococcus faecalis* é normalmente encontrada no intestino e no trato genital feminino e faz parte das 14 espécies descritas do gênero *Enterococcus*. *E. faecalis* apresenta resistência intrínseca aos antimicrobianos de uso comum como aminoglicosídeos, aztreonam, cefalosporinas, clindamicina e oxacilina. Sua resistência à vancomicina está associada a modificações na parede celular que impedem a ligação do fármaco em seu sítio de ação, podendo esta resistência ser mediada por plasmídeo ou alteração no cromossomo (ANVISA<sup>c</sup>, 2022).

*Escherichia coli* é uma enterobactéria universalmente distribuída no solo, plantas, água e no trato gastrointestinal de humanos e de animais. É encontrada em sítios infecciosos como abscessos, pneumonias, meningites, septicemias, feridas, trato urinário e gastrintestinal, embora possam causar infecção em outros sítios. Quanto à sua resistência intrínseca podemos citar múltiplos antibióticos como o ácido fusídico, clindamicina, estreptograminas, glicopeptídeos, linezolid, macrolídeos,

mupirocin e penicilina G. A resistência por capacidade adquirida, ainda é a mais predominante devido a composição de sua parede celular (ANVISA<sup>c</sup>, 2022).

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista encontrado em uma grande variedade de ambientes, como solo e água e é formador de biofilme. Está relacionado frequentemente com uma das principais causas de doença e morte em humanos em condições imunossupressoras e crônicas. Também pode não responder a medicamentos por uma série de mecanismos de resistência a antibióticos por aquisição de genes de resistência ou por mutações em genes já existentes (DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M., 2020).

A RAM representa uma ameaça para a saúde pública em escala mundial e merece a atenção de organizações, instituições e governos de todo mundo para o desenvolvimento de políticas públicas em saúde, prevenção, educação, investimentos em pesquisa científica e a busca por novas fontes de moléculas antimicrobianas (WEF, 2019).

A busca por novas moléculas tem relação com o avanço do conhecimento na química e na fitoquímica (VIEGAS, 2006). Na medicina tradicional, a busca por compostos ativos a partir de plantas e fungos vem desde a antiguidade e, atualmente muitos dos medicamentos comercializados tem como fonte, ou são inspirados em produtos naturais (OMURA, 2002; DIAS, et al., 2012; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J., 2020).

### 2.3 BIODIVERSIDADE NA BUSCA DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O Brasil possui cerca de 15 a 20% da biodiversidade do planeta, e boa parte desta biodiversidade permanece inexplorada. No território brasileiro são encontrados seis biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal), e em Santa Catarina o bioma Mata Atlântica inclui também ao ecossistema manguezal (BARBOSA, VIANA, 2014; MONTEIRO, 2017; MACHADO et al., 2021).

As plantas de mangue se caracterizam por um tipo de comunidades florestais diversas que, embora pertençam a famílias botânicas sem qualquer relação taxonômica entre si, compartilham características fisiológicas similares (ICMBio, 2018). A formação dos bosques de mangue do Brasil tem cobertura vegetal, com três gêneros de árvores típicas conhecidas como mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*,

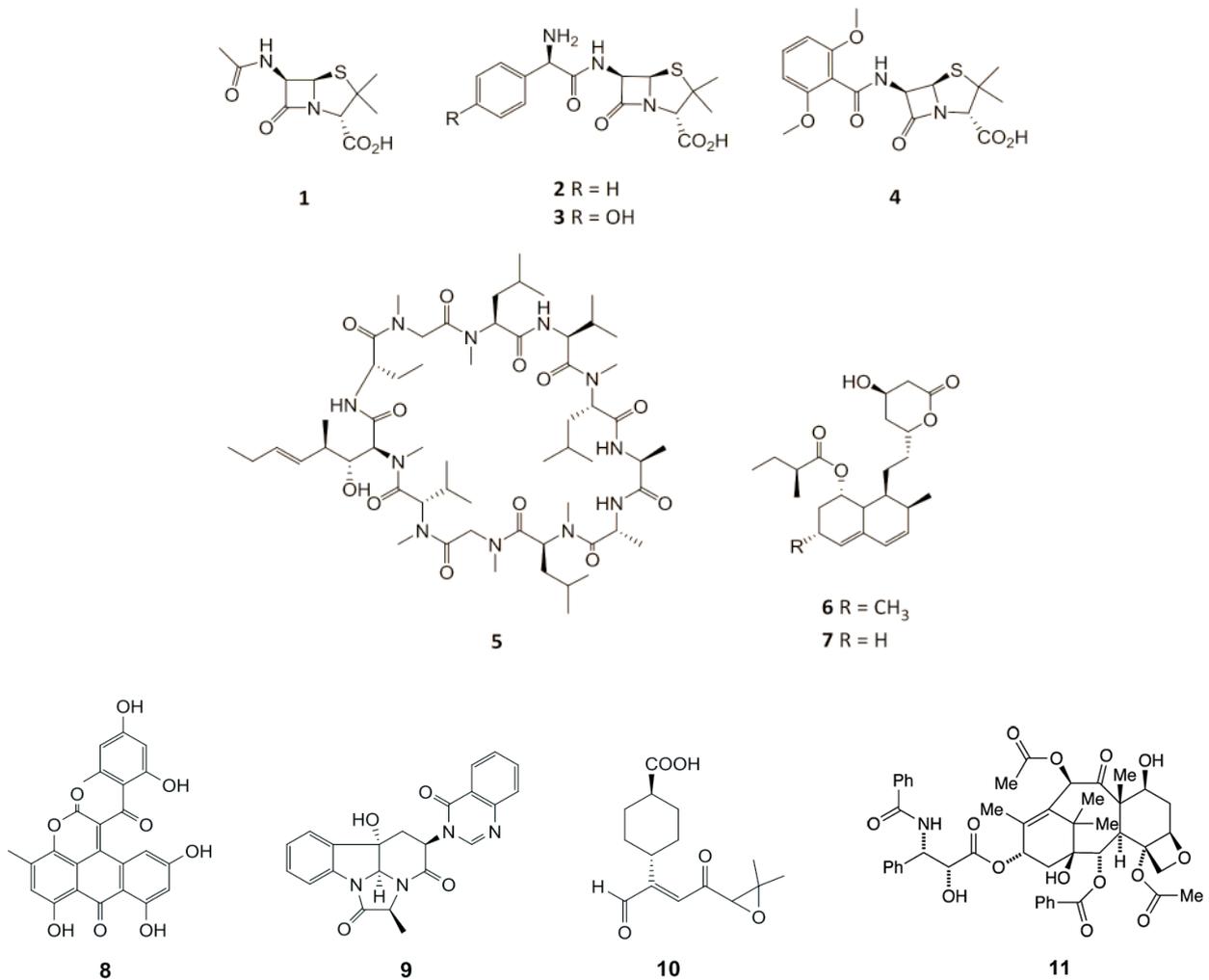
*R. racemosa* e *R. harrisonii*); mangue-preto (*Avicennia schaueriana* e *A. germinans*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) (PEIRÓ et al., 2022).

Os manguezais brasileiros se estendem ao longo do litoral do Estado do Amapá até Santa Catarina (USP, 2022). Em Florianópolis, a área total estimada de manguezal é de 1.744 hectares, com o segundo maior manguezal em uma área urbana do município, o manguezal do Itacorubi sofre com os impactos da urbanização (OBSERVA, 2018; DIÁRIO CATARINENSE, 2022). Segundo a prefeitura de Florianópolis (PMF<sup>a, b</sup>, 2022), atualmente 27,19 % do território municipal está protegido por áreas de preservação, entre a elas Unidade de Conservação Parque Municipal do Manguezal do Itacorubi sob os cuidados FLORAN (Fundação Municipal do Meio Ambiente) e a Estação Ecológica Carijós ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) que protege o ecossistema manguezal do Rio Ratonos (BRASIL<sup>a</sup>, 2022).

Dentre os microrganismos encontrados no mangue estão os fungos endofíticos presentes no interior de tecidos vegetal (folhas, caules e raízes), os quais não causam prejuízos ou danos à planta hospedeira, convivendo em uma relação de simbiose (MALICKA, M. et al., 2022; PANDEY et al., 2022). Os estômatos ou ferimentos nos tecidos das plantas são os locais por onde os endófitos colonizam os diversos tecidos. Como resultado ocorre uma relação evolutiva mútua, em que há benefícios para ambos. Entre os benefícios podemos citar a nutrição e proteção para os microrganismos endófitos, e para a planta hospedeira, a resistência a fitopatógenos, adaptação a diferentes ambientes e tolerância ao estresse, entre outros (ROSA, 2021; PARDO et al., 2022).

Fonte potencial de metabólitos secundários bioativos de interesse biotecnológico, os fungos endofíticos de plantas de mangue se tornam interessantes para triagem de produtos naturais, por estarem em ambiente extremo e possuírem ampla diversidade e espectro taxonômico. Nos últimos anos os fungos endofíticos têm se revelado candidatos promissores para a busca de compostos potencialmente úteis em diferentes aplicações terapêuticas (PELÁEZ et al., 1998; CAMPOS et al., 2015). Vale lembrar que diversos metabólitos secundários produzidos por fungos são marcos importantes da história (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química de compostos isolados de fungos.



Fonte: Adaptado de TAKAHASHI, et al., (2017) e ACS (2023).

Legenda: 1- Antibiótico penicilina e seus derivados (2, 3 e 4) 2- derivados ampicilina, 3- amoxicilina e 4- metecilina, hipocolesterolêmicos (5, 6 e 7) 5- ciclosporina A, 6- lovastatina e 7- mevastatina, 8- antitumoral aspergiolídio, 9- alcalóide chaetominina, 10- anti-inflamatório ganodermicina e 11- antitumoral paclitaxel.

Substâncias obtidas a partir de fungos apresentam as mais variadas atividades biológicas, e podem ter diferentes propriedades farmacológicas entre as quais podemos destacar as atividades antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, analgésica, imunomodulatória, inseticida, antiparasitária, antiviral, antifúngica, entre outras (DIAS, et al., 2012; MAHMUD, et al, 2020).

Por meio dos conhecimentos adquiridos ao longo de muitos anos foi possível o isolamento de moléculas que se tornaram produtos farmacêuticos conhecidos até os dias atuais, como é o caso da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em

1929. Sua estrutura química permitiu à indústria farmacêutica o desenvolvimento de novos derivados a partir de síntese e modificações químicas como os antibióticos ampicilina, amoxicilina e metilicina. A ciclosporina, primeiro imunossupressor viabilizou a realização de transplantes, e outros fármacos de grande relevância terapêutica como a lovastatina e mevastatina redutores de colesterol que também foram isolados de fungos (VIEGAS, 2006; TAKAHASHI, et al., 2017).

Segundo Campos e colaboradores (2015) apenas uma pequena proporção dos fungos endofíticos existentes tem sido estudada, em especial os de plantas tropicais do Brasil. Dados da literatura mostram que fungos endofíticos foram isolados de plantas de manguezais, incluindo os gêneros: *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Fomopsis* e *Phyllosticta* isolados na ilha de Itamaracá – PE; *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria* isolados em Cananeia e Bertioga – SP; *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* isolados em Canavieiras – BA (MAZLAN et al., 2019). Em Florianópolis – SC, dentre as espécies isoladas estão o *Neofusicoccum parvum*, *Stemphylium* sp., *Bjerkandera* sp., *Dothideomycetes/Muyocopron* sp., *Penicillium*, *Glabra series*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Buergeria spartinae*, *Curvularia* sp., *Phyllosticta* sp., *Phlebia* sp. e *Arthrinium* sp. (BASTOS, 2022). Mesmo com estes estudos, se considerado todo litoral brasileiro, ainda são escassas as pesquisas com fungos endofíticos, em especial os que estão associados a plantas de mangue. Os metabólitos de fungos endofíticos, incluindo de plantas de mangue, isolados em diversas partes do mundo apresentam uma grande variedade de classes químicas onde se destacam: cumarinas, isocumarinas, xantonas, alcalóides, macrolactamas p-quinonas, sesquiterpenos, naftoquinonas, antraquinonas, entre outras, com diferentes propriedades biológicas (CRAGG & NEWMAN, 2015; CADAMURO, et al., 2021; LENZI, et al., 2022).

A pesquisa de novos fármacos, é uma tarefa multidisciplinar e requer a colaboração entre as diferentes áreas do conhecimento como a química e biologia, para a avaliação das atividades biológicas de extratos, frações e compostos e o isolamento e identificação da(s) molécula(s) responsável pelos efeitos observados (MACHADO, 2021).

Para determinação do perfil químico de um extrato/fração extraído de fungos endofíticos se torna necessário conhecer a mistura complexa dos metabólitos utilizando diferentes metodologias. Dentre as metodologias para se descobrir os

compostos de uma mistura, podemos destacar o particionamento e o fracionamento de um extrato, por exemplo. O particionamento pode ser feito por meio de extração líquido-líquido, onde a polaridade e a afinidade do extrato pelo líquido extrator vão determinar a obtenção do produto de interesse. Já no fracionamento de um extrato, o uso de colunas cromatográficas é uma metodologia largamente utilizada. A separação em coluna é baseada na diferença de afinidade entre duas fases: uma móvel e outra estacionária. A mistura a ser purificada é colocada sob uma coluna de vidro, plástica ou placa de metal, preenchida com um material sólido que atua como fase estacionária. Esse material geralmente é a sílica-gel e, em seguida, um solvente ou mistura de solventes (sistema) líquido ou gás, chamados de eluente ou fase móvel, são adicionados à coluna e por interações com os componentes da mistura, é possível separar ou purificá-los. Cada componente irá migrar de forma distinta a depender de sua polaridade, carga e tamanho. Assim, em uma coluna de fase normal que é polar, por exemplo, os componentes mais polares ficam retidos na fase estacionária, enquanto os menos polares eluem com a fase móvel, a depender da polaridade do sistema (mistura de solventes) utilizado. Dessa forma, os componentes são separados e podem ser coletados na saída da coluna (OLIVEIRA, 2015; SIMÕES, 2017). A cromatografia em coluna é muito usada na indústria farmacêutica, pois permite processar grandes quantidades de produto com baixo custo e alta eficiência. Além disso, essa técnica pode ser combinada com outras formas de cromatografia, como a cromatografia em camada delgada (CCD), para aumentar a precisão, resolução e monitoramento da análise. Também quando associada a uma segunda purificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLUE-ESI-EM) e elucidação estrutural por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), essas técnicas são essenciais para caracterização e para dar continuidade aos estudos para o desenvolvimento de um potencial candidato a fármaco (ANVISA<sup>d</sup>, 2022).

Neste sentido, a diversidade de fungos endofíticos de plantas de mangue se constitui em uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas de interesse biotecnológico e farmacológico. Considerando a diversidade química dos metabólitos secundários de endófitos relatados na literatura, a caracterização de novos extratos fúngicos poderá trazer informações de grande relevância científica e tecnológica, incluindo a busca de moléculas líder para desenvolvimento de novos agentes

antitripanosoma e/ou antibacterianos gerando impactos positivos na saúde humana e animal.

### 3 HIPÓTESE

Extratos totais, seus particionados e fracionados, isolados de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina possuem atividades antitripanosoma e antibacteriana.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo bioguiado de metabólitos de fungos endofíticos de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina para identificação de novas moléculas bioativas com atividade antitripanosoma e antibacteriana.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Obter extratos totais e seus particionados para ensaios biológicos;
- II. Avaliar a atividade antitripanosoma dos extratos totais e extratos particionados;
- III. Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos totais;
- IV. Avaliar a citotoxicidade de extratos totais e particionados frente a células THP-1;
- V. Obter fracionados do extrato particionado ativo AcOEt IASF2A10006 para identificação do perfil químico de compostos majoritários.

## 5 MATERIAL

### 5.1 ISOLADOS FÚNGICOS

Neste estudo foram utilizados doze fungos endofíticos pertencentes ao filo *Ascomycota* e três pertencentes a filo *Basidiomycota* (IASCM10015, RASFM10100 e RASCM10119). Os fungos foram isolados a partir de caules, folhas e raízes de plantas dos mangues do Itacorubi e Ratonos no município de Florianópolis/SC-Brasil (BASTOS, 2022). Os isolados utilizados no presente estudo foram obtidos do biobanco de fungos endofíticos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal - SC (MIP/CCB/UFSC) (Tabela 1).

Tabela 1- Isolados fúngicos obtidos de plantas de mangue de Florianópolis - SC utilizados no presente estudo.

| Código do Fungo | Mangue de origem | Planta - estrutura coletada          | Identificação Molecular dos fungos                   |
|-----------------|------------------|--------------------------------------|--|
| IASF1A10001     | Itacorubi        | <i>Avicennia schaueriana</i> - Folha | <i>Neofusicoccum parvum</i>                          |
| IASF2A10006     | Itacorubi        | <i>Avicennia schaueriana</i> - Folha | <i>Stemphylium</i> sp.                               |
| IASCM10015      | Itacorubi        | <i>Avicennia schaueriana</i> - Caule | <i>Bjerkandera</i> sp.                               |
| IASFM30068      | Itacorubi        | <i>Avicennia schaueriana</i> - Folha | <i>Dothideomycetes/Muyocopron</i> sp.                |
| ILRF1A10021     | Itacorubi        | <i>Laguncularia racemosa</i> - Folha | <i>Penicillium Glabra series</i>                     |
| ILRF2A10022     | Itacorubi        | <i>Laguncularia racemosa</i> - Folha | <i>Trichoderma</i> Section<br><i>longibrachiatum</i> |
| ILRF2A10023     | Itacorubi        | <i>Laguncularia racemosa</i> - Folha | <i>Buergeria spartinae</i>                           |
| ILRR1A20047     | Itacorubi        | <i>Laguncularia racemosa</i> - Raiz  | <i>Curvularia</i> sp.                                |
| IRMC2A10035     | Itacorubi        | <i>Rhizophora mangle</i> - Caule     | <i>Phyllosticta</i> sp.                              |
| RASFM10100      | Ratonos          | <i>Avicennia schaueriana</i> - Folha | <i>Phlebia</i> sp.                                   |
| RASCM10119      | Ratonos          | <i>Avicennia schaueriana</i> - Caule | <i>Bjerkandera</i> sp.                               |
| RASC1B20231     | Ratonos          | <i>Avicennia schaueriana</i> - Caule | <i>Arthrimum</i> sp.                                 |

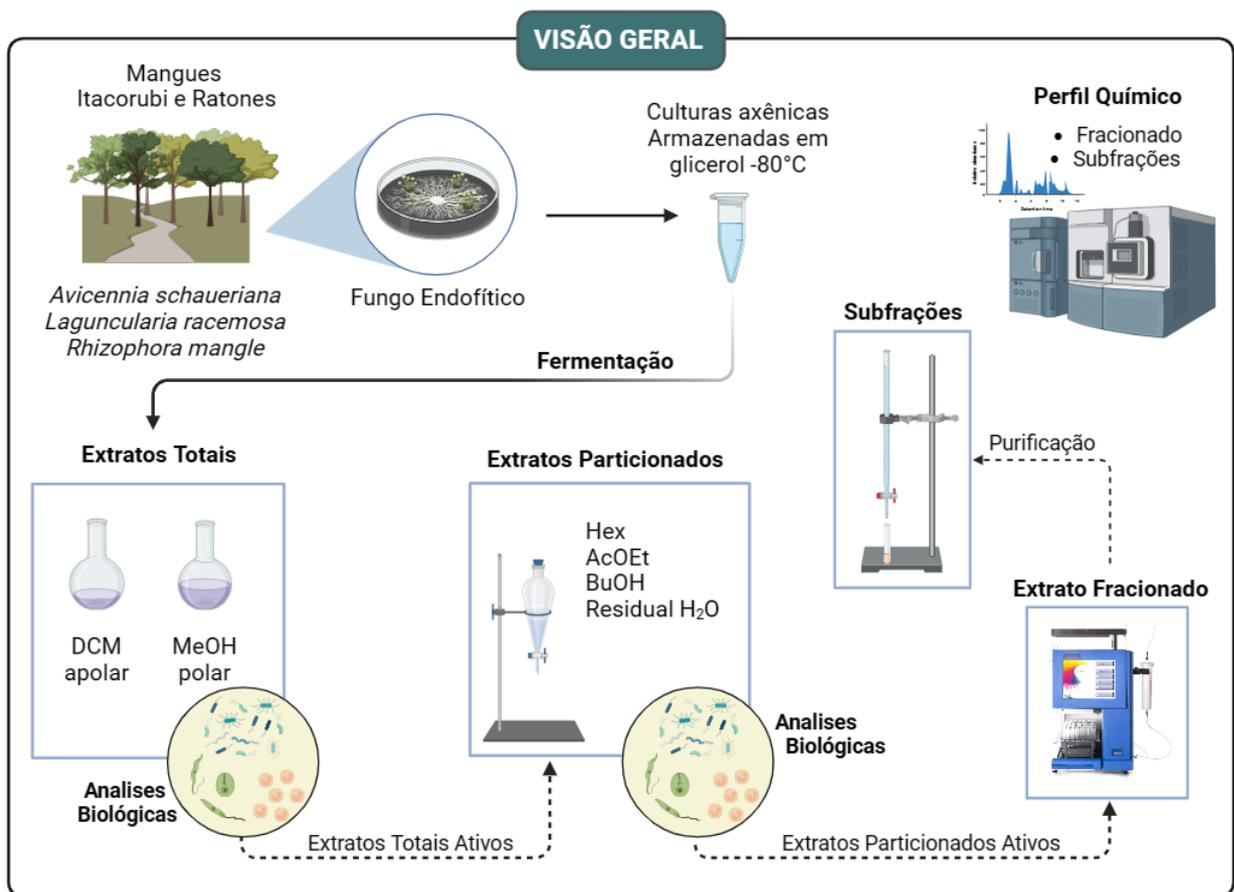
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Código do Fungo: Primeira letra - Local de isolamento: I – Itacorubi ou R - Ratonos; Segunda e terceira letra - Espécie de planta do qual foi isolado: AS - *Avicennia schaueriana*; LR - *Laguncularia racemosa*; RF - *Rhizophora mangle*; Quarta letra - Parte da planta do qual foi isolado: C - Caule; F - Folha; R – Raiz.

## 6 MÉTODOS

Por se tratar de um estudo bioguiado, os extratos fúngicos foram produzidos, e submetidos a ensaios biológicos. Desta forma, primeiro foi produzido e testado o extrato total e a seguir os extratos ativos foram particionados em diferentes sistemas de solventes, e novamente testados biologicamente. O extrato particionado ativo foi fracionado e submetido a caracterização química (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma da visão geral do trabalho.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 6.1 CULTIVO DOS ISOLADOS FÚNGICOS E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

No Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB), do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC) os estoques de cada fungo foram cultivados em tubos contendo caldo BHI - Infusão Cérebro e Coração (KASVI) por um período de 7-14 dias sob temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . A seguir

os fungos foram plaqueados com auxílio de alça de Drigalski sobre placas de Petri contendo meio BDA - Ágar Batata Dextrose (KASVI) e incubados por 7-14 dias a temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e confirmada a axenização da cultura. Fragmentos do micélio fúngico (5 mm de diâmetro), contendo os esporos foram recortados e inoculados no centro de 9 placas de Petri com meio de cultura BDA (KASVI) para cada isolado e incubadas por 7-14 dias a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , para posterior inoculação nas bolsas de cultivo.

### **6.1.1 Cultivo em Bolsas**

Em bolsas de polietileno autoclaváveis (Mushroom Filter Bag, SATRISE®) com dimensões de 200 x 415 mm e com filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$ , foi adicionado 600 g de arroz parboilizado orgânico (substrato) e 600 ml de água destilada. Após autoclavação ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min.), as bolsas foram resfriadas para posterior inoculação. Para cada isolado, três bolsas foram inoculadas com esporos fúngicos obtidos de três placas de Petri, após lavagem com 7-8 ml de solução estéril de polisorbato 80 a 0,01% (Tween 80, Sigma-Aldrich®). As bolsas foram lacradas com auxílio de seladora e incubadas por 21 dias, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  em estufa BOD, para crescimento. Também foram produzidas bolsas contendo apenas o substrato (arroz parboilizado orgânico) e a solução de polisorbato 80 a 0,01% sem esporos, cultivada sob os mesmos parâmetros, que foi utilizada como controle (branco).

### **6.1.2 Maceração Química**

As bolsas foram transportadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/UFSC) no Departamento de Química da UFSC, e a biomassa (substrato, micélio e esporos) foi extraída por maceração separadamente, primeiramente com diclorometano (PA, QUIMIDROL) na proporção 1:1 (biomassa: solvente) por 4 dias, e após a remoção deste solvente, a mesma biomassa foi extraída adicionando metanol (PA, LAB SYNTH), na proporção 1:1 (biomassa: solvente) e macerado por mais 4 dias. Para cinco dos fungos (ILRF1A10021, ILRF2A10023, IRMC2A10035, ILRR1A20047, RASCM10119) a maceração ocorreu com os dois solventes, diclorometano e metanol de maneira simultânea na proporção 1:1 por 4 dias. Após a extração, a biomassa foi filtrada em papel filtro e os solventes

rotaevaporados sob pressão reduzida utilizando um rotaevaporador rotativo a 39 °C para o diclorometano e 55 °C para o metanol. O solvente residual foi eliminado em capela de exaustão química, por 12 horas a 23±1 °C, ao abrigo de luz.

### 6.1.3 Liofilização dos Extratos

Os extratos rotaevaporados foram congelados a -80°C e liofilizados por 24 horas, em liofilizador (Terroni® LS300D®) de bancada, em copos com fechamento a vácuo sob temperatura de -55 °C, seguindo os protocolos estabelecidos pelo laboratório LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia/UFSC).

## 6.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE ISOLADOS FÚNGICOS

### 6.2.1 Avaliação da atividade antitripanosoma

#### 6.2.1.1 *Triagem dos extratos frente às formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi*

Os ensaios de atividade foram realizados em placas de 96 poços contendo epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuén modificada geneticamente pela inserção do gene β-galactosidase (BUCKNER et al. 1996). Para tanto, os parasitos obtidos no terceiro dia de cultivo a 27°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®), foram distribuídos na placa (0,54x10<sup>6</sup> parasitos/poço), e incubados na presença de 50 µg/ml dos extratos totais (concentração final), branco (extrato do arroz s/ fungo) DCM MeOH solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO - Merck®), mantendo uma concentração final de DMSO 1%. Como controle positivo foi utilizado o fármaco benznidazol (BZN, Sigma-Aldrich®) na concentração de 7,8 µg/ml e como controle negativo DMSO 1%. As placas foram incubadas por 67 horas em estufa a 27°C. Ao final do tempo de tratamento foi adicionado 20 µl de Resazurina (Sigma-Aldrich®) na concentração de 250 µg/ml em todos os poços e a placa incubada por 5 horas a 37°C e a leitura da fluorescência feita em espectrofotômetro (Tecan®, Infinite M200) a 560 nm com referência em 590 nm (RODRÍGUEZ-CORRALES; JOSAN, 2017).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica. Os extratos totais foram considerados ativos contra epimastigotas de *T. cruzi* quando apresentaram percentual de inibição acima de 20%, conforme Equação (1).

$$\% \text{ de Inibição} = \left( \frac{1-DO \text{ composto}-DO \text{ branco composto}}{DO \text{ controle}-DO \text{ branco controle}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 6.2.1.2 Avaliação dos extratos frente às formas tripomastigotas

Os ensaios de atividade contra formas tripomastigotas foram realizados com os extratos particionados. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuén foram obtidas a partir de cultura em células L929 infectadas mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) 10% de SBF. Um total de  $1,8 \times 10^5$  parasitos/poço foram tratados com os extratos fúngicos particionados na concentração de 50 µg/ml, previamente solubilizados em DMSO conforme descrito acima. Como controle positivo foi utilizado BZN na concentração de 13 µg/ml e como controle negativo DMSO 1%. As placas foram incubadas por 67 horas em estufa a 37°C. Ao final do tempo de tratamento foi adicionado 250 µg/ml de Resazurina (Sigma-Aldrich®) e a placa incubada por 5 horas em estufa a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. A leitura da fluorescência foi feita em espectrofotômetro (Tecan®, Infinite M200) a 560 nm com referência em 590 nm, e os resultados obtidos por meio da Equação (1).

#### 6.2.1.3 Avaliação dos extratos frente às formas intracelulares

Para avaliar a Concentração Inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) dos extratos totais e particionados,  $4 \times 10^4$  células/poço da linhagem monocítica humana THP-1 foram cultivadas por 72 horas a 37°C 5% CO<sub>2</sub>, em placas de 96 poços contendo meio RPMI-1640 10% de SBF, 2 mM L-glutamina e 1 mM piruvato de sódio, na presença de 100 ng/ml de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) para diferenciação dos monócitos em macrófagos e estabelecimento do tapete celular. A seguir, o meio de cultivo foi removido e as monocamadas infectadas com tripomastigotas da cepa Tulahuén expressando β-galactosidase, na razão de 2:1 parasitos/célula. A placa foi incubada por 18 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub> e adicionados os extratos totais e particionados ativos solubilizados em DMSO e diluídos na razão 1:3 em concentrações de 30 a 0,04 µg/ml

para o extrato do fungo RASC1B20231 e 90 a 0,12 µg/ml para os extratos totais dos fungos IASF2A10006 e ILRF2A10022. Como controle positivo foi utilizado o BZN na concentração de 30 µM (7,8 µg/ml) e como controle negativo DMSO 1%. As placas foram incubadas por 72 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi retirado e adicionado 200 µl de CPRG (100 µM), e a reação desenvolvida por 4 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub> e lida em espectrofotômetro (Tecan®, Infinite M200) a 570 nm com referência em 630 nm (ROMANHA et al., 2010).

Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados a partir de três réplicas em triplicata, por interpolação linear conforme Equação (2).

$$Y' \text{ ou } Y'' = 100 / (1 + 10^{((\text{Log} Y' \text{ ou } Y'' - X) \cdot \text{HillSlop}))} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

Y' = CI<sub>50</sub>%

Y'' = CC<sub>50</sub>%

x = concentração do extrato

HillSlop = pico do coeficiente angular

### 6.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos frente às células THP-1

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos totais e particionados ativos foi utilizado o ensaio de redução da resazurina (Sigma-Aldrich®). Para tanto, 4x10<sup>4</sup> células/poço da linhagem monocítica humana THP-1 foram cultivadas e diferenciadas conforme descrito acima. Após o período de incubação, o meio de cultivo foi removido e substituído por meio contendo os extratos diluídos em DMSO na concentração final 1%. A razão de diluição dos extratos totais e particionados ativos foi de 1:3 (500 a 0,68 µg/ml) e a placa foi incubada por 48 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo foi utilizado DMSO 50% e como controle negativo DMSO 1%. Ao final do período de incubação, foi adicionado 20 µl de resazurina (250 µg/ml) e a placa foi incubada novamente por 24 h a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, a fluorescência foi medida em leitor de microplaca (Tecan®, Infinite M200) com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm (RODRÍGUEZ-CORRALES; JOSAN, 2017). Os valores de Concentração Citotóxica a 50% (CC<sub>50</sub>) foram calculados plotando-se curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 8.0, com base

na Equação (2). O índice de seletividade (IS) foi determinado por meio da razão do valor de  $CC_{50}$  pelo valor de  $CI_{50}$  com base na Equação (3).

$$IS = \frac{\text{Valor de } CC_{50}}{\text{Valor de } CI_{50}} \quad \text{Eq. (3)}$$

### 6.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos fúngicos

A atividade antibacteriana dos extratos totais foi testada contra cepas de referência de bactérias Gram positivas *E. faecalis* (ATCC29212) e *S. aureus* (ATCC25923), e Gram negativas *E. coli* (ATCC25922) e *P. aeruginosa* (ATCC9027).

#### 6.2.3.1 Método de difusão em ágar

Os extratos totais e os brancos (extrato do arroz s/ fungo) MeOH e DCM, tiveram seu potencial antibacteriano avaliado utilizando-se o método de difusão em ágar (ARULMOZHI et al., 2019). Resumidamente, o inóculo padronizado na escala 0,5 Mc Farland (CLSI, 2018), da respectiva cepa microbiana, foi inoculado na superfície do ágar Mueller-Hinton (MHA). Em seguida, os extratos totais foram solubilizados em DMSO (concentração final 1%) e água destilada estéril para obtenção da concentração de 50 µg/ml. Foram pipetados 70 µl dos extratos totais separadamente em seus respectivos poços (6 mm de diâmetro) no ágar, e as placas incubadas por 24h a 37 °C. Uma solução de clorexidina (0,2% c/v) e água destilada estéril foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente. As zonas de inibição foram medidas para seu diâmetro (mm).

#### 6.2.3.2 Método de macrodiluição

O potencial antibacteriano dos extratos totais foi avaliado utilizando-se o método de macrodiluição descrito NCCLS (1999) com modificações. Os inóculos de *E. faecalis* (ATCC29212), *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922) e *P. aeruginosa* (ATCC9027) foram cultivados em ágar Mueller-Hinton (MHA) 24 h a 37°C. Após, as cepas foram padronizadas em 0,5 na escala Mc Farland em caldo Mueller-Hinton (MHB) e incubadas com os extratos totais DCM IASF2A10006, ILRF2A10022,

RASC1B20231 e branco (extrato do arroz s/ fungo) diluídos em MHB e DMSO (concentração final 1%) nas concentrações 50 µg/ml e 500 µg/ml e incubadas por 24h a 37°C sob agitação (150 rpm). Após a incubação, o caldo contendo o inóculo tratado com os extratos totais e suas diluições seriadas, foi plaqueado por gota com 10 µL em MHA, e incubado por 24h a 37°C. A clorexidina (0,2% c/v) e MHB 1% DMSO foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

As unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas por contagem a partir da diluição seriada de cada microtubo amostral. A atividade bactericida foi calculada pelo percentual de inibição do microrganismo, considerando a UFC/ml do controle negativo (CN) como 100% do crescimento, conforme Equação (4). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{UFC \text{ ml}^{-1}}{CN} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

## 6.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS FÚNGICOS

### 6.3.1 Monitoramento por CCD

Inicialmente para direcionar a avaliação do perfil químico dos extratos totais DCM ativos e o branco (extrato do arroz s/ fungo), foram utilizados os extratos na concentração de 50 µg/ml. Utilizou-se como fase móvel (eluente) uma mistura binária de hexano (Hex): acetato de etila (AcOEt), na proporção 70:30 (v/v), respectivamente. A metodologia também foi utilizada para fins de acompanhamento do fracionamento conforme foram sendo obtidos. A cromatografia em camada delgada (CCD) (AMORIM, 2019) foi feita em cromatoplas de sílica gel espessura de 0,2 mm (Sigma-Aldrich®). A revelação dos compostos nas placas cromatográficas foi realizada por irradiação ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 365 nm com indicador de fluorescência, e por revelação em imersão em solução de vanilina sulfúrica (15 g de vanilina, 250 ml de etanol e 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) seguida de aquecimento a 110 °C, com soprador térmico. Os resultados foram observados por visualização das bandas que indicam a presença dos possíveis constituintes da mistura e/ou compostos majoritários presentes na amostra.

### 6.3.2 Particionamento dos extratos totais

Os extratos totais DCM ativos dos fungos IASF2A10006, ILRF2A10022, RASC1B20231, foram particionados utilizando três solventes (Tabela 2) em ordem crescente de polaridade. Inicialmente o extrato total foi dissolvido em 50 ml de água destilada e adicionado em funil de separação. Em seguida, adicionou-se em momentos distintos cada um dos solventes. A extração com cada solvente ocorreu 3 vezes em um volume de 50 ml. A fase orgânica foi coletada, e a fase aquosa seguiu no processo de separação com os demais solventes. Conforme procedimentos descritos anteriormente, as frações foram rotaevaporadas, liofilizadas e armazenadas a - 80°C em microtubos (Eppendorf®) até seu uso.

Tabela 2 - Dados dos solventes utilizados no particionamento dos extratos totais.

| Ordem crescente de polaridade | Solvente         | Sigla            | Densidade kg/m <sup>3</sup> |
|-------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| 1                             | Hexano           | Hex              | 655                         |
| 2                             | Acetato de Etila | AcOEt            | 902                         |
| 3                             | n-butanol        | BuOH             | 810                         |
| 4                             | Água destilada   | H <sub>2</sub> O | 997                         |

Fonte: Elaborado pela autora.

### 6.3.3 Fracionamento dos extratos particionados

O extrato particionado ativo AcOEt IASF2A10006 foi selecionado para caracterização química. Para tanto, 250 mg da amostra foi utilizada para separação em coluna cromatográfica.

#### 6.3.3.1 Purificação cromatográfica em Isolera (BIOTAGE®)

A separação foi feita em coluna automatizada, *Cromatografia flash Isolera™ One* (BIOTAGE®, Uppsala, Suécia) (Figura 7). A amostra foi solubilizada em AcOEt e aplicada em pastilha preparativa *Samplet®* (BIOTAGE®) e deixada secar anteriormente à análise. Utilizou-se uma coluna *Sfär Sílica 10g* (BIOTAGE®) em um gradiente crescente de polaridade (A) Hex:AcOEt (B) em fluxo contínuo de 20 ml/min (A) 70:30 (B), (A) 60:40 (B), (A) 50:50 (B), (A) 40:60 (B) e (A) 30:70 (B) e as frações

foram reunidas por similaridade de acordo com o sistema de solventes utilizados. Para limpeza da coluna e retirada de resquícios da amostra, utilizou-se MeOH 100% com fluxo contínuo de 40 ml/min coletada em uma única fração.

#### 6.3.3.2 Coluna de bancada fase normal

O extrato pré-purificado (6.3.3.2.1 e 6.3.3.2.2) em *cromatografia flash* Isolera foi solubilizado em DCM e misturado em sílica gel 10-40  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich®). O solvente residual foi evaporado à temperatura ambiente em capela com sistema de exaustão. A coluna de bancada ( $\varnothing = 2\text{cm}$ ) foi empacotada utilizando como fase estacionária a sílica gel 10-40  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich®) ( $h = 16\text{ cm}$ ) e como fase móvel DCM. Em seguida, iniciou-se o fracionamento cromatográfico em gradiente crescente de polaridade.

##### 6.3.3.2.1 Coluna 1

Para purificação das frações 40:60 e 30:70 pré-purificadas no Isolera, utilizou-se uma mistura binária de DCM: MeOH em gradiente crescente de polaridade (100:0, 98:2, 96:4, 94:6 e 92:8). O sistema 1, 100:0, foi aplicado para o intervalo de frações de 1 a 4. O sistema 2, nas proporções 98:2, foi aplicado no intervalo de frações de 5 a 17. O sistema 3, nas proporções 96:4, foi aplicado nas frações 18 a 50. O sistema 4, nas proporções 94:6, foi aplicado no intervalo de frações de 51 a 72. O sistema 4, nas proporções 92:8, foi aplicado no intervalo de frações de 73 a 92. Desta forma, foram coletadas 92 subfrações e as mesmas foram monitoradas por CCD. Todas as subfrações com similaridade de fatores de retenção ( $R_f$ ) foram reunidas.

##### 6.3.3.2.2 Coluna 2

Após a junção das subfrações 35-56 isoladas a partir da coluna 1, foi realizada uma nova purificação. Desta vez, utilizou-se como eluente uma mistura binária de Hexano: DCM em gradiente de polaridade (80:20, 90:10). O sistema 1, nas proporções 80:20, foi aplicado no intervalo de frações de 1 a 8. O sistema 2, nas proporções 90:10, foi aplicado nas frações 9 a 11. Desta forma, foram coletadas 11 subfrações e as

mesmas foram monitoradas por CCD e todas as subfrações com similaridade de Rf foram reunidas.

#### 6.3.3.3 Coluna de bancada fase reversa (C18)

A coluna de bancada em fase reversa ( $\varnothing = 1,2\text{cm}$ ) foi empacotada com solvente ACN e sílica C18 40-75  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich®) ( $h = 8\text{ cm}$ ). A fração 60:40 pré-purificada em *cromatografia flash* Isolera, foi solubilizada em ACN e misturada em celite (Synth®). O solvente residual foi evaporado à temperatura ambiente em capela com sistema de exaustão. Em seguida, iniciou-se o fracionamento cromatográfico utilizando-se uma mistura binária de H<sub>2</sub>O: ACN em gradiente crescente de polaridade (60:40, 50:50, 40:60, 30:70 e 10:30) com aplicação de pressão 2,1 bar. O sistema 1, na proporção 60:40, foi aplicado para o intervalo de frações de 1 a 75. O sistema 2, na proporção 50:50, foi aplicado no intervalo de frações de 76 a 129. O sistema 3, na proporção 40:60, foi aplicado nas frações 130 a 144. O sistema 4, na proporção 30:70, foi aplicado no intervalo de frações de 145 a 171. O sistema 5, na proporção 10:90, foi aplicado no intervalo de frações de 172 a 191. Foram coletadas 191 subfrações e monitoradas por CCD. As subfrações com Rf similar foram reunidas, secas e submetidas à análise de CLUE-ESI-EM.

#### 6.3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM)

A fração Hex 60:40 AcOEt obtida a partir da *Cromatografia flash* Isolera, do extrato particionado IASF2A10006 AcOEt do fungo *Stemphylium* sp. e as subfrações obtidas em coluna de fase reversa C18, foram submetidas a análise de CLUE-ESI-MS. Para tanto, 1,6 mg das amostras foi diluído em 2 ml de acetonitrila (ACN, grau HPLC) para gerar uma solução de concentração de 800  $\mu\text{g/ml}$  e filtrada em vial utilizando um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de fotodiodos (PDA), gerenciador de amostras e um gerenciador de solvente quaternário, bem como uma coluna de fase reversa (BEH, C18 de 5x1 cm e 1,7 $\mu\text{m}$  de partículas) foi utilizado 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 ACN (B) a 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 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 CLUE para detectar os componentes químicos de cada fração. Os dados foram adquiridos em um intervalo de 100-1500 Da, em um tempo de varredura de 1,0 s em 20 min. A amostra de leucina encefalina com massas de referência em m/z 554,2615 (ESI-) e 556,2771 (ESI+), foi utilizada para calibração dos valores de razão massa carga (*m/z*). 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.

### 6.3.5 Rendimento dos extratos totais

Após produzidos os extratos totais foi calculado o percentual de rendimento a partir da razão da massa de extrato total seco (após os processos de rotaevaporação e liofilização), pelo total de extração conforme Equação (5).

$$\% \text{ de rendimento} = \frac{\text{massa de extrato total seco}}{\text{massa total de extração}} \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

### 6.3.6 Rendimento dos Extratos Particionados e Fracionados

Os extratos ativos DCM IASF2A10006, ILRF2A10022, RASC1B20231 e o branco (extrato do arroz s/ fungo) foram novamente produzidos (subitens 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4, 5.1.5), para fracionamento (subitem 5.3.2) nos solventes Hex, AcOEt e BuOH. O percentual de rendimento foi calculado a partir da razão da massa inicial, pela massa final conforme Equação (6).

$$\% \text{ de rendimento} = \frac{\text{massa final 'ou'}}{\text{massa inicial 'ou'}} \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde:

Massa inicial = Extrato total DCM' ou Extrato particionado''

Massa final = Extrato particionado' AcOEt ou Extrato fracionado''

#### 6.4 ANÁLISE DE DADOS

As análises foram realizadas em triplicata e pelo menos dois experimentos independentes. Também, para as análises de viabilidade celular o fator Z de estatística simples e adimensional foi avaliado, valores  $\geq 0,7$  foram considerados ensaios bons (VOGEL, 2008). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão e as curvas foram geradas utilizando o programa GRAPHPAD PRISM 5.0 (GraphPad Software, nc., La Jolla, Califórnia, EUA).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS TOTAIS

Foram obtidos 23 extratos totais, sendo nove extratos DCM, nove extratos MeOH e cinco a partir da extração com ambos solventes DCM+MeOH de maneira simultânea (Tabela 3).

Tabela 3 – Rendimento de extratos totais de fungos endofíticos de plantas de mangue utilizando diferentes solventes.

| Extrato Fúngico | Massa de Extração (kg) | Solvente de Extração | Extrato Total Seco (g) | % de Rendimento |
|-----------------|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| IASF1A10001     | 1,2                    | DCM                  | 0,04                   | 0,00            |
|                 |                        | MeOH                 | 7,39                   | 0,61            |
| IASF2A10006     |                        | DCM                  | 3,22                   | 0,27            |
|                 |                        | MeOH                 | 8,57                   | 0,71            |
| IASCM10015      |                        | DCM                  | 0,47                   | 0,04            |
|                 |                        | MeOH                 | 0,32                   | 0,03            |
| ILRF1A10021     |                        | DCM+MeOH             | 12,20                  | 1,01            |
| ILRF2A10022     |                        | DCM                  | 0,60                   | 0,05            |
|                 |                        | MeOH                 | 8,60                   | 0,71            |
| ILRF2A10023     |                        | DCM                  | 0,28                   | 0,02            |
|                 |                        | MeOH                 | 2,91                   | 0,24            |
|                 |                        | DCM+MeOH             | 2,25                   | 0,24            |
| IRMC2A10035     |                        | DCM+MeOH             | 5,46                   | 0,45            |
| ILRR1A20047     |                        | DCM+MeOH             | 7,16                   | 0,59            |
| IASFM30068      |                        | DCM                  | 32,00                  | 2,65            |
|                 |                        | MeOH                 | 51,76                  | 4,28            |
| RASFM10100      |                        | DCM                  | 0,29                   | 0,02            |
|                 |                        | MeOH                 | 4,78                   | 0,40            |
| RASCM10119      |                        | DCM+MeOH             | 15,02                  | 1,24            |
| RASC1B20231     |                        | DCM                  | 0,30                   | 0,03            |
|                 |                        | MeOH                 | 21,62                  | 1,79            |
| Branco          |                        | DCM                  | 0,17                   | 0,01            |
|                 |                        | MeOH                 | 0,22                   | 0,02            |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: DCM – Diclorometano; MeOH – Metanol; Branco (extrato do arroz s/ fungo).

A obtenção de moléculas de interesse produzidas por microrganismos, envolve uma série de operações unitárias típicas após o cultivo microbiano. No presente estudo, os fungos foram cultivados em meio sólido (arroz) e a maceração para obtenção do extrato total foi realizada utilizando os solventes diclorometano (DCM) (apolar) e metanol (MeOH) (polar) separadamente ou simultaneamente. O extrato foi obtido após um tempo definido, até que o sistema sature, que neste caso foi de 4 dias para ambos os solventes utilizados. Logo após, por filtração simples (gravidade), o extrato foi separado do substrato sólido. O solvente foi então evaporado à pressão reduzida, com auxílio do rotaevaporador (HARBORNE, 1998; SCHMIDELL, et. al., 2001; CESAD, 2022).

No início dos experimentos a extração foi realizada com a mistura dos dois solventes, sendo obtidos cinco extratos. Posteriormente foi definido o processo de extração utilizando os solventes em momentos distintos, primeiramente com DCM e após com MeOH. Para fins de mitigar interferentes, o extrato total do fungo ILRF2A10023 foi obtido nas duas formas de extração, sendo uma extração com os solventes em momentos distintos, e uma extração com os solventes simultaneamente, dando origem aos três extratos totais do mesmo fungo, com ambas formas de extração, utilizado como mais uma forma de controle.

O rendimento dos extratos totais obtidos está mostrado na Tabela 3, evidenciando rendimento superior para os extratos MeOH em comparação com os extratos DCM. O rendimento dos extratos tem relação direta com a afinidade do solvente e a biomassa extraída, neste caso, o arroz e a biomassa fúngica. O solvente MeOH por ser mais polar rompe a parede celular do fungo e faz a extração de componentes como: carboidratos simples (mono e dissacarídeos) e lipídeos de cadeias curtas, como os fosfolipídios presentes nas membranas celulares dos fungos. Muitos desses componentes estão presentes na parede celular de fungos como as glicoproteínas, glucanos (polissacarídeos) e quitina. Esses componentes por estarem em grande quantidade na biomassa extraída pode justificar o maior rendimento de massa obtido para o extrato total metanólico (HARBORNE, 1998; GARCIA-RUBIO, 2020; TBCA, 2023). Já o solvente DCM por ser mais apolar extrai seletivamente lipídios de cadeias mais longas, os quais estão mais relacionados aos possíveis metabólitos fúngicos produzidos, porém presentes em quantidade menor quando comparado aos constituintes extraídos por solvente mais polar (RESENDE, 2015). Assim, o rendimento de massa de extrato total obtido foi menor para os extratos DCM.

Os extratos obtidos nesta primeira etapa, foram submetidos a avaliação bioguiada *in vitro*, e os extratos biologicamente ativos foram posteriormente particionados e fracionados para caracterização química, visando a identidade dos metabólitos.

### **7.1.1 Avaliação de atividade antitripanosoma dos extratos totais frente às formas epimastigotas de *T. cruzi***

Os extratos totais foram inicialmente avaliados quanto à sua atividade antiparasitária contra epimastigotas de *T. cruzi* na concentração de 50 µg/ml como um critério de seleção dos extratos ativos para ensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em macrófagos THP-1. Os resultados da triagem dos extratos totais fúngicos contra epimastigotas estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de mortalidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com extratos totais de fungos endofíticos na concentração de 50 µg/ml.

| Código do Fungo | % de Morte Extrato Total |            |            | % Morte Controles |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|-------------------|
|                 | MeOH                     | DCM        | MeOH + DCM |                   |
| IASF1A10001     | 0,68±0,05                | 0,00±0,03  | ..         | ..                |
| IASF2A10006     | 0,00±0,03                | 63,50±0,09 | ..         | ..                |
| IASCM10015      | 0,00±0,04                | 0,00±0,04  | ..         | ..                |
| RASCM10119      | ..                       | ..         | 0,00±0,12  | ..                |
| ILRF1A10021     | ..                       | ..         | 0,00±0,03  | ..                |
| IRMC2A10035     | ..                       | ..         | 0,00±0,07  | ..                |
| ILRR1A20047     | ..                       | ..         | 7,45±0,07  | ..                |
| IASFM30068      | 0,00±0,05                | 0,00±0,08  | ..         | ..                |
| ILRF2A10022     | 0,00±0,04                | 40,49±0,02 | ..         | ..                |
| ILRF2A10023     | 0,00±0,07                | 0,00±0,05  | 0,00±0,04  | ..                |
| RASFM10100      | 0,00±0,01                | 0,00±0,08  | ..         | ..                |
| RASC1B20231     | 0,00±0,05                | 20,91±0,09 | ..         | ..                |
| Branco          | 0,00±0,06                | 0,00±0,14  | ..         | ..                |
| BZN             | ..                       | ..         | ..         | 84,66±0,00        |
| CN              | ..                       | ..         | ..         | 0,00±0,03         |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). .. - Campo anulado; DCM – Diclorometano; MeOH - Metanol; [ ] extratos - 50 µg/ml DMSO 1%; Branco - controle (extrato do arroz s/ fungo); CN – Controle Negativo (DMSO 1%); CP – Controle Positivo (Benznidazol 7,8 µg/ml).

Os extratos totais que apresentaram atividade contra *T. cruzi* foram de fungos endofíticos pertencentes ao filo *Ascomycota*. Neste filo estão inclusos fungos com hifas septadas e esporos assexuados (TORTORA et al., 2017). Liu et al. (2017) e Orfali et al. (2020) também isolaram fungos endofíticos *Ascomycota* sp. de manguezais na China e Arábia Saudita. Estudo realizado por Freitas (2023) com os mesmos extratos fúngicos mostrou uma baixa atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

Os extratos ativos foram obtidos de fungos *Stemphylium* sp., e *Arthrinium* sp. isolados de *A. schaueriana* (IASF2A10006 e RASC1B20231) e *Trichoderma longibrachiatum* (ILRF2A10022) isolado de *L. racemosa*. A espécie *A. schaueriana*, conhecida como mangue-preto, é explorada pela população para diversos fins, havendo relatos na literatura do uso das folhas para salgar alimentos e de sua casca para preparação de chás e repelente contra insetos. Já a espécie *L. racemosa*

conhecida como mangue-branco, é alvo de exploração por sua madeira e seus taninos utilizados no beneficiamento de couro, também devido às suas propriedades terapêuticas é utilizada na preparação de remédios populares (ICMBio, 2018).

Estes fungos ascomicetos (Figura 5) são encontrados no solo e em ambientes ricos em matéria orgânica e águas salinas, como os manguezais, demonstrando sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (SEBAK et al., 2022). Ainda segundo os autores, seus metabólitos secundários, ainda pouco explorados, podem apresentar potenciais aplicações industriais.

Figura 5 - Aspecto macromorfológico de fungos endofíticos cultivados em meio BHI por 7 dias a 25 °C.



Fonte: Adaptado de Bastos (2022).

### 7.1.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos totais frente às células THP-1

A  $CC_{50}$  dos extratos fúngicos totais DCM para a linhagem celular THP-1, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração citotóxica para células THP-1 dos extratos fúngicos totais pré selecionados.

| Extrato          | CC <sub>50</sub> µg/ml |
|------------------|------------------------|
| <b>Total DCM</b> |                        |
| IASF2A10006      | 229,63±15,86           |
| ILRF2A10022      | 267,67±36,89           |
| RASC1B20231      | 45,49±5,92             |
| <b>Controle</b>  |                        |
| BZN              | >500±0,0               |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). DCM – Diclorometano; BZN – Benznidazol; [ ] extratos – Diluição 1/3 µg/ml DMSO 1%;

A farmacologia pré-clínica é que guia a implementação de estudos para viabilizar a possível obtenção de um medicamento. Ela é constituída por ensaios biológicos com diferentes graus de complexidade, como no caso do estudo com células e outros, com o objetivo de determinar, por exemplo, a eficácia farmacológica (SIMÕES et al., 2017). Os bioensaios baseados em células, são alternativas cada vez mais atraentes aos ensaios bioquímicos *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade de substâncias pode ser feita *in vitro* por meio de ensaios com linhagens de células humanas ou animais. Estes ensaios foram desenvolvidos com o intuito de substituir a utilização de animais, pois além de reprodutíveis, rápidos e sensíveis, atendem a legislação do Concea (BRASIL<sup>b</sup>, 2014) no que concerne a redução no uso de animais em estudos experimentais. A avaliação da citotoxicidade consiste em colocar um possível agente tóxico, como é o caso dos extratos estudados, em contato com linhagens celulares e verificar os efeitos tóxicos. As condições devem simular o mais próximo possível as condições fisiológicas encontradas *in vivo* (ROMANHA et. al., 2010).

Diferentes linhagens celulares vêm sendo utilizadas para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de novos compostos (VOGEL, 2008; BRIOSCHI et. al. 2022). A linhagem monocítica humana THP-1 é de cultivo contínuo, e pode ser usada para testes de citotoxicidade, uma vez que é cultivada em considerável quantidade para uso no protocolo de diferenciação de monócitos para macrófagos.

A literatura registra diversos exemplos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos que se iniciaram com triagem baseada em modelos celulares, como o programa desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI – EUA) e estudos com

tripanosomatídeos desenvolvidos pelo Instituto Carlos Chagas (SIMÕES, 2008; ICC, 2023).

As concentrações citotóxicas 50% (CC<sub>50</sub>) para os três extratos totais variaram de 267,67 a 45,49 µg/ml. Quando avaliados os extratos totais DCM ativos, o extrato RASC1B20231 se apresentou como mais citotóxico (45,49 µg/ml) seguido pelo extrato IASF2A10006 (229,63 µg/ml) e o menor valor de citotoxicidade foi observado para o extrato ILRF2A10022 (267,67 µg/ml).

### 7.1.3 Avaliação da atividade dos extratos totais frente às formas amastigotas intracelulares

A forma amastigota de *T. cruzi* é a forma intracelular aceita como clinicamente relevante, uma vez que é a responsável pela patologia da doença (COURA, 2013). Para avaliar de forma específica a mortalidade dessa forma do parasito e não da célula hospedeira que a contém é necessária a adequação dos métodos utilizados. Nesse sentido, a utilização de ensaios com culturas de parasitos modificados geneticamente pela inserção do gene que codifica a enzima β-galactosidase (β-Gal), é uma metodologia prática para quantificar a atividade de extratos, frações e compostos isolados (BUCKNER et al., 1996; ROMANHA et al., 2010).

Os resultados da atividade antitripanosoma contra as amastigotas intracelulares e o Índice de Seletividade (IS) estão apresentados na Tabela 6 para os extratos fúngicos totais DCM.

Tabela 6 - Concentração Inibitória de 50 % para amastigotas intracelulares e os IS dos extratos fúngicos totais pré selecionados.

| Extrato          | CI <sub>50</sub> µg/ml | IS     |
|------------------|------------------------|--------|
| <b>Total DCM</b> |                        |        |
| IASF2A10006      | 37,24±0,81             | 6,17   |
| ILRF2A10022      | 27,40±0,77             | 9,77   |
| RASC1B20231      | 5,40±0,69              | 8,42   |
| <b>Controle</b>  |                        |        |
| BZN              | 11,38±0,16             | >43,94 |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). DCM - Diclorometano; [ ] extratos – Diluição 1/3 µg/ml DMSO 1%; BZN - Benznidazol 7,8 µg/ml.

O extrato total DCM RASC1B20231 foi o mais ativo com a  $CC_{50}$  de 5,40  $\mu\text{g/ml}$ , seguido do extrato ILRF2A10022  $CI_{50}$  de 27,40  $\mu\text{g/ml}$ , e o menos ativo foi o extrato IASF2A10006  $CI_{50}$  37,24  $\mu\text{g/ml}$ . Contudo, todos os extratos ativos apresentaram índice de seletividade menor que 10 (DNDi, 2015). No estudo realizado por Freitas (2023) contra *Leishmania* spp. os índices de seletividade foram inferiores a 3, sugerindo que a atividade biológica destes extratos possivelmente é em um alvo não específico. Entretanto, como se trata de um extrato total, o fracionamento e o possível isolamento das moléculas podem em teoria melhorar a atividade específica.

#### **7.1.4 Atividade antibacteriana em bactérias Gram positivas e Gram negativas**

Os testes de atividade antibacteriana dos extratos totais na concentração final de 50 e 500  $\mu\text{g/ml}$  frente bactérias Gram+ e Gram- resultaram em ausência de atividade nas duas concentrações testadas.

Xue-Ming et al. (2014) avaliando a atividade antibacteriana de 23 compostos isolados de fungo *Stemphylium* sp. provenientes de um mangue na China, na concentração de 512  $\mu\text{g/ml}$  relataram que três isolados apresentaram fraca atividade para *E. coli* e *S. aureus*, e um quarto isolado com fraca atividade apenas para *S. aureus*. Zhao et al. (2021) testaram 5 poliquetídeos isolados do fungo endofítico marinho *Arthrinium* sp. e também não observaram efeito inibitório para as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, e *P. aeruginosa*, nas concentrações de 25, 5, 1 e 0,2 mg/ml testadas.

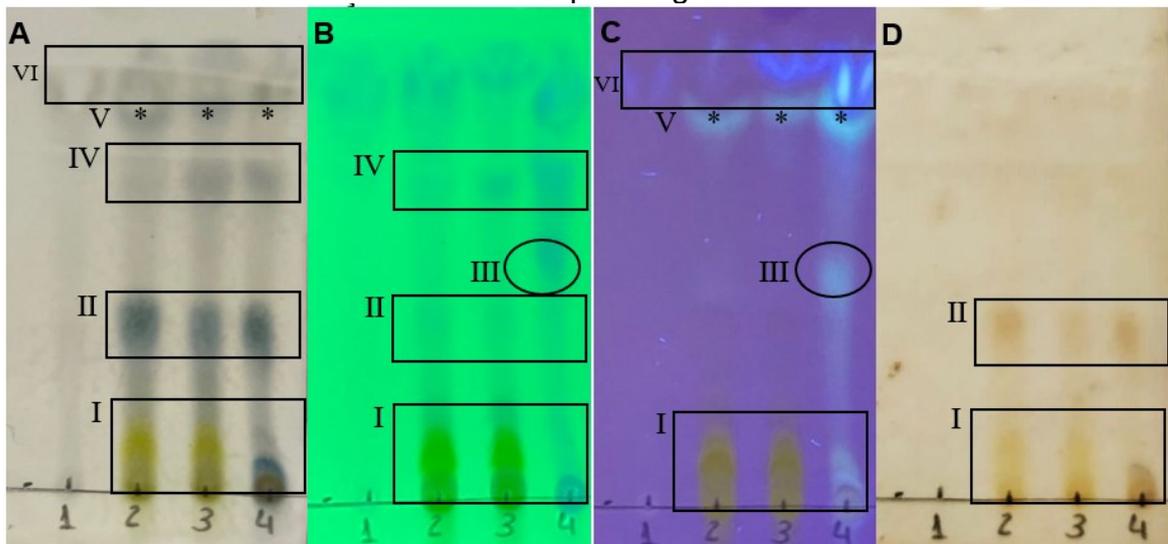
A forma como uma molécula, neste caso o extrato, interage com as células bacterianas, também pode dificultar sua atividade. A dificuldade em encontrar substâncias com atividade antibacteriana contra linhagens Gram negativas, pode estar, em parte, associada às características do envoltório celular deste grupo de bactérias. As bactérias Gram negativas apresentam uma estrutura complexa da sua membrana externa com a presença de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma das principais barreiras encontradas nestas bactérias para a entrada e efetividade de muitos antibióticos, sua característica hidrofílica, faz uma seleção para a entrada de muitas moléculas, inclusive as que possuem potencial antimicrobiano. Por isso, encontrar substâncias com atividade antibacteriana contra essas bactérias é um desafio, já que elas apresentam multirresistência a vários antibióticos usados para tratar infecções (GHAI; GHAI, 2018; OLIVEIRA; REYGAERT, 2023).

### 7.1.5 Triagem dos extratos totais por CCD

A CCD é uma metodologia indispensável no estudo de produtos naturais, uma vez que permite a visualização dos principais componentes em uma matriz complexa, como é o caso de extratos e frações, permitindo o monitoramento das etapas de purificação (HILDEBERT; BLADT, 2009; SIMÕES, 2017). A técnica consiste em uma camada de sílica gel (fase estacionária) sobre um suporte planar, utilizado como mecanismo de separação, e um sistema de solventes (fase móvel), que permite a eluição dos constituintes da amostra que são revelados utilizando a luz ultravioleta ou a vanilina sulfúrica, por exemplo (HILDEBERT; BLADT, 2009).

No presente estudo, os extratos DCM ativos foram submetidos a CCD para visualização da complexidade do perfil químico (Figura 6).

Figura 6 - Cromatografia de camada delgada representativa dos extratos totais DCM ativos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

1 – Branco (extrato do arroz s/ fungo) DCM; 2 - IASF2A10006 DCM; 3 - ILRF2A10022 DCM; 4 - RASC1B20231; A - Sem revelação; B - UV 254 nm; C - UV 365 nm; D - Revelador Vanilina Sulfúrica; Sistema de eluição Hex 70:30 AcOEt; I, II, III, IV, V e VI identificação das bandas observadas.

Os resultados de CCD dos extratos DCM dos três fungos revelados em diferentes sistemas de detecção mostraram um complexo perfil químico similar de pelo menos cinco bandas.

De acordo com Hildebert e Bladt (2009), compostos lipofílicos migram na cromatoplaça (CCD) no sistema mais lipofílico, como é o caso da composição hexano:acetato. Observa-se que na revelação UV 254 nm (B) o perfil é mais complexo que na revelação UV 365 nm (C). Segundo Hildebert e Bladt (2009) as bandas destacadas em azul destacadas, que absorveram fluorescência podem ser referentes a compostos com ligações duplas conjugadas devido a presença de grupamentos cromóforos e fluoróforos. A cromatoplaça também foi analisada quanto à presença de constituintes no extrato por revelação com vanilina sulfúrica (D), e as bandas que foram observadas apresentaram a coloração marrom amarelada. Como esperado, o extrato do arroz sem o fungo (branco), não mostrou a presença de bandas, o que evidencia que as bandas detectadas são provenientes dos fungos.

Observa-se na base (A, B, C e D) da placa (I) uma pigmentação amarela para 2 - IASF2A10006 e 3 - ILRF2A10022, e marrom/azul para 4 - RASC1B20231, relacionada a própria cor dos extratos. Por estarem mais retidos na base das cromatoplaças, esses compostos possuem características polares, considerando a mistura dos solventes utilizada. No entanto, observou-se a presença de pelo menos três bandas similares para os três extratos totais. O perfil dos três extratos (2, 3 e 4), revelou três bandas (II) azuis na placa sem revelação (A) e na placa de 254 nm (B), e marrom quando revelada com vanilina sulfúrica (D). Para o extrato 4 - RASC1B20231 na revelação em luz UV 254 e 365 nm, foi possível observar a presença de uma banda (III) bem definida, não comum para os demais extratos. Outras três bandas puderam ser observadas tanto para a placa sem revelação como na luz UV 254 nm (IV) para os três extratos. Também na placa sem revelação e na placa em UV 365 nm, é possível observar três bandas (V) comuns aos três extratos, e quatro bandas (VI) que foram comuns a todos os extratos, incluindo o 1 – Branco. Estas últimas (VI), tipicamente podem ser associadas aos resíduos presentes nos solventes do sistema de eluição.

## 7.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARTICIONADOS

Para a obtenção de compostos isolados e a identificação de metabólitos secundários por meio de métodos cromatográficos, segundo Simões et al. (2017), o particionamento dos extratos totais se torna uma boa opção. Os particionados obtidos são ricos nos compostos bioativos de interesse e, neste sentido, seguiram a

sequência clássica, para um procedimento de partição com solventes por extração líquido-líquido.

A Tabela 7 apresenta o rendimento dos extratos particionados com diferentes solventes a partir dos extratos totais DCM.

Tabela 7 - Rendimento de extratos particionados obtidos de extratos totais DCM ativos de fungos endofíticos de plantas de mangue utilizando diferentes solventes.

| Extrato Fúngico | Extrato Total DCM<br>Rotaevaporado<br>(g) | Solvente do<br>Particionamento | Extratos<br>Particionados Secos<br>(g) | % de<br>Rendimento |
|-----------------|---|--------------------------------|--|--------------------|
| IASF2A10006     | 10  | Hex                            | 1,13                                   | 11,32              |
|                 |   | AcOEt                          | 1,04                                   | 10,43              |
|                 |   | BuOH                           | -                                      | -                  |
|                 |   | H <sub>2</sub> O               | -                                      | -                  |
| ILRF2A10022     | 39  | Hex                            | 1,96                                   | 5,02               |
|                 |   | AcOEt                          | 0,50                                   | 1,27               |
|                 |   | BuOH                           | 0,40                                   | 1,04               |
|                 |   | H <sub>2</sub> O               | 1,53                                   | 3,92               |
| RASC1B20231     | 3   | Hex                            | 0,24                                   | 8,01               |
|                 |   | AcOEt                          | -                                      | -                  |
|                 |   | BuOH                           | -                                      | -                  |
|                 |   | H <sub>2</sub> O               | -                                      | -                  |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: - sem massa (g) de extração; Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etila; BuOH – n-butanol; H<sub>2</sub>O – Água destilada.

Para todos os extratos IASF2A10006, ILRF2A10022 e RASC1B20231 o particionado hexânico apresentou maior percentual de rendimento. Tal comportamento já era esperado, uma vez que no decorrer do estudo foi observado uma característica apolar dos extratos fúngicos. Embora o rendimento pós particionamento tenha sido baixo, a massa obtida foi suficiente para os testes biológicos e para a caracterização química. O baixo rendimento também foi observado por KAMAT et al. (2023), que descreveram a produção comercial de compostos naturais de fungos, como muitas vezes limitada pelo seu baixo rendimento, e pela singularidade dos metabólitos secundários. Para superar esse desafio, se propõe utilizar processos biotecnológicos por técnicas de melhoria da cepa, modificações do meio de cultivo e métodos interdisciplinares como por síntese química parcial /semisíntese /modificação, para criar sistemas sustentáveis de geração de

metabólitos secundários bioativos (MOHAMED, et al. 2021; SUGUMARAN, et al. 2022).

Foram obtidos sete extratos ao final do processo de particionamento dentre 12 esperados. Os particionados dos fungos IASF2A10006 BuOH e RASC1B20231 AcOEt e BuOH, bem como suas frações residuais aquosas, não apresentaram massa de extração após o processo de secagem por liofilização. Essa característica é inerente à afinidade que o solvente e extrato apresentam, que neste caso pode ser extremamente pequena, não havendo presença de massa extraída (SIMÕES et al. 2017).

Os extratos totais DCM foram separados considerando sua solubilidade e seu coeficiente de partição em diferentes solventes por grau de polaridade crescente, como no caso dos solventes utilizados: hexano, acetato de etila, n-butanol e água. A densidade dos solventes também é importante, uma vez que a água é mais densa que os demais solventes, o que permitiu uma melhor diferenciação das fases e separação entre as fases orgânica e aquosa. Simões et al. (2017) relatam ainda que o particionamento associado posteriormente ao fracionamento dos extratos, auxiliam na identificação e possível isolamento de compostos. As substâncias purificadas pelo fracionamento foram testadas novamente quanto às suas potenciais atividades antitripanosoma (subitem 6.1.2) e citotóxica para THP-1 (subitem 6.2.2).

### **7.2.1 Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas epimastigotas de *T. cruzi***

Os resultados da triagem dos extratos fúngicos particionados contra epimastigotas mostraram que a atividade biológica foi detectada somente na fração AcOEt (Tabela 8).

Tabela 8 - Percentual de mortalidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com extratos particionados de fungos endofíticos de plantas de mangue na concentração de 50 µg/ml

| Código do Fungo | % de Morte Extrato Particionado |            |           |                  | % Morte Controles |
|-----------------|---------------------------------|------------|-----------|------------------|-------------------|
|                 | Hex                             | AcOEt      | BuOH      | H <sub>2</sub> O |                   |
| IASF2A10006     | 0,00±0,10                       | 51,97±0,07 | ..        | ..               | ..                |
| ILRF2A10022     | 0,00±0,10                       | 52,00±0,08 | 0,00±0,04 | 0,00±0,01        | ..                |
| RASC1B20231     | 0,00±0,10                       | ..         | ..        | ..               | ..                |
| CP              | ..                              | ..         | ..        | ..               | 90,12±0,01        |
| CN              | ..                              | ..         | ..        | ..               | 0,00±0,04         |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). .. - Campo anulado; Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etila; BuOH – n-butanol; H<sub>2</sub>O – Água destilada; [ ] extratos - 50 µg/ml DMSO 1%; CN – Controle Negativo (Epimastigotas *T. cruzi* DMSO 1%); CP – Controle Positivo (Benznidazol 7,8 µg/ml).

Dentre os sete extratos particionados, dois extratos AcOEt IASF2A10006 e ILRF2A10022 foram ativos frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*. Joel & Bhimba (2013), demonstraram atividade contra células tumorais e para as bactérias *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, a partir de extratos AcOEt do fungo endofítico *Meyerozyma guilliermondii* isolado de folhas de planta de mangue da Índia. Xue-Ming et al. (2014) que também avaliaram as atividades citotóxica contra a linhagem celular A549 de carcinoma de pulmão e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus albus*, a partir de extrato de AcOEt da cultura fúngica de *Stemphylium* isolada da planta *Bruguiera sexangula* de manguezais no mar da China Meridional.

No presente estudo, o particionamento dos extratos IASF2A10006 e ILRF2A10022 mostrou que a atividade biológica ficou restrita ao particionado AcOEt. A comparação da atividade com a obtida para o extrato total IASF2A10006, revelou uma redução de 10% na atividade para o particionado AcOEt. Já para o extrato ILRF2A10022 houve um aumento da atividade contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* em relação ao extrato total. Estes resultados corroboram com o descrito por Simões et al. (2017), onde o particionamento pode gerar frações enriquecidas, mas em alguns casos pode haver perda da atividade como observado no presente estudo.

Os particionados ativos contra *T. cruzi* identificados no presente estudo foram isoladas do fungo *Stemphylium* sp. (IASF2A10006) e do fungo *Trichoderma longibrachiatum* (ILRF2A10022).

O fungo endofítico *Stemphylium* também foi isolado por Moussa et al. (2016) de uma planta *Avicennia marina* de mangue no Egito e o fungo do gênero *Trichoderma* também foi isolado de ambiente marinho por KAMAT et al. (2023).

Ambos os extratos AcOEt particionados ativos (IASF2A10006 e ILRF2A10022), seguiram para as análises de citotoxicidade a 50% e concentração inibitória a 50%.

### 7.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos particionados frente às células THP-1

Os resultados obtidos para a avaliação da citotoxicidade a 50% dos extratos fúngicos particionados, em células THP-1, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração citotóxica para células THP-1 dos extratos fúngicos particionados pré selecionados com base na mortalidade de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

| Extrato                   | CC <sub>50</sub> µg/ml |
|---------------------------|------------------------|
| <b>Particionado AcOEt</b> |                        |
| IASF2A10006               | 168,27±25,81           |
| ILRF2A10022               | 95,20±12,57            |
| <b>Controle</b>           |                        |
| BZN                       | >500±0,0               |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). AcOEt – Acetato de Etila; BZN – Benznidazol; [ ] extratos – Diluição 1/3 µg/ml DMSO 1%.

O extrato ILRF2A10022 mostrou um valor de CC<sub>50</sub> de 95,20 µg/ml e o IASF2A10006 um valor de 168,27 µg/ml. A comparação dos valores de CC<sub>50</sub> dos extratos totais e particionados dos fungos IASF2A10006 e ILRF2A10022, mostra um aumento da citotoxicidade dos extratos particionados, em relação aos extratos totais.

### 7.2.3 Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas amastigotas intracelulares

Os resultados da  $CI_{50}$  dos extratos fúngicos particionados AcOEt para as amastigotas intracelulares e o Índice de Seletividade (IS) são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração Inibitória de 50% para amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e IS dos extratos fúngicos particionados.

| Extrato                   | $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$ | IS     |
|---------------------------|----------------------------|--------|
| <b>Particionado AcOEt</b> |                            |        |
| IASF2A10006               | 184,97 $\pm$ 13,89         | 0,91   |
| ILRF2A10022               | 207,77 $\pm$ 4,36          | 0,46   |
| <b>Controle</b>           |                            |        |
| BZN                       | 11,38 $\pm$ 0,16           | >43,94 |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD)  $\pm$  desvio padrão (DP). AcOEt – Acetato de Etila; [ ] extratos – Diluição 1/3  $\mu\text{g/ml}$  DMSO 1%; BZN - Benznidazol 7,8  $\mu\text{g/ml}$ .

Os valores de  $CI_{50}$  dos extratos particionados AcOEt contra formas amastigotas foram mais elevados que os valores obtidos para o extrato total, resultando em IS de 0,91 e 0,46 para os extratos IASF2A10006 e ILRF2A10022, respectivamente. Considerando as diretrizes do DNDi (2015) que recomendam um IS >10 para que extratos sigam para estudos pré-clínicos, nenhum dos dois extratos do presente estudo contemplam esses requisitos.

### 7.2.4 Avaliação da atividade antitripanosoma dos extratos particionados frente às formas tripomastigotas

Os resultados da atividade dos extratos particionados contra formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com extratos particionados.

| Código do Fungo | Percentual (%) de Morte Extrato Particionado |            |            |                  | % Morte Controles |
|-----------------|--|------------|------------|------------------|-------------------|
|                 | Hex  | AcOEt      | BuOH       | H <sub>2</sub> O |                   |
| IASF2A10006     | 8,04±0,07                                    | 5,49±0,08  | ..         | ..               | ..                |
| ILRF2A10022     | 7,29±0,08                                    | 12,28±0,13 | 15,35±0,16 | 11,62±0,05       | ..                |
| RASC1B20231     | 0,36±0,04                                    | ..         | ..         | ..               | ..                |
| CP              | ..   | ..         | ..         | ..               | 99,56±0,00        |
| CN              | ..   | ..         | ..         | ..               | 0,00±0,02         |

Fonte: Elaborado pela autora.

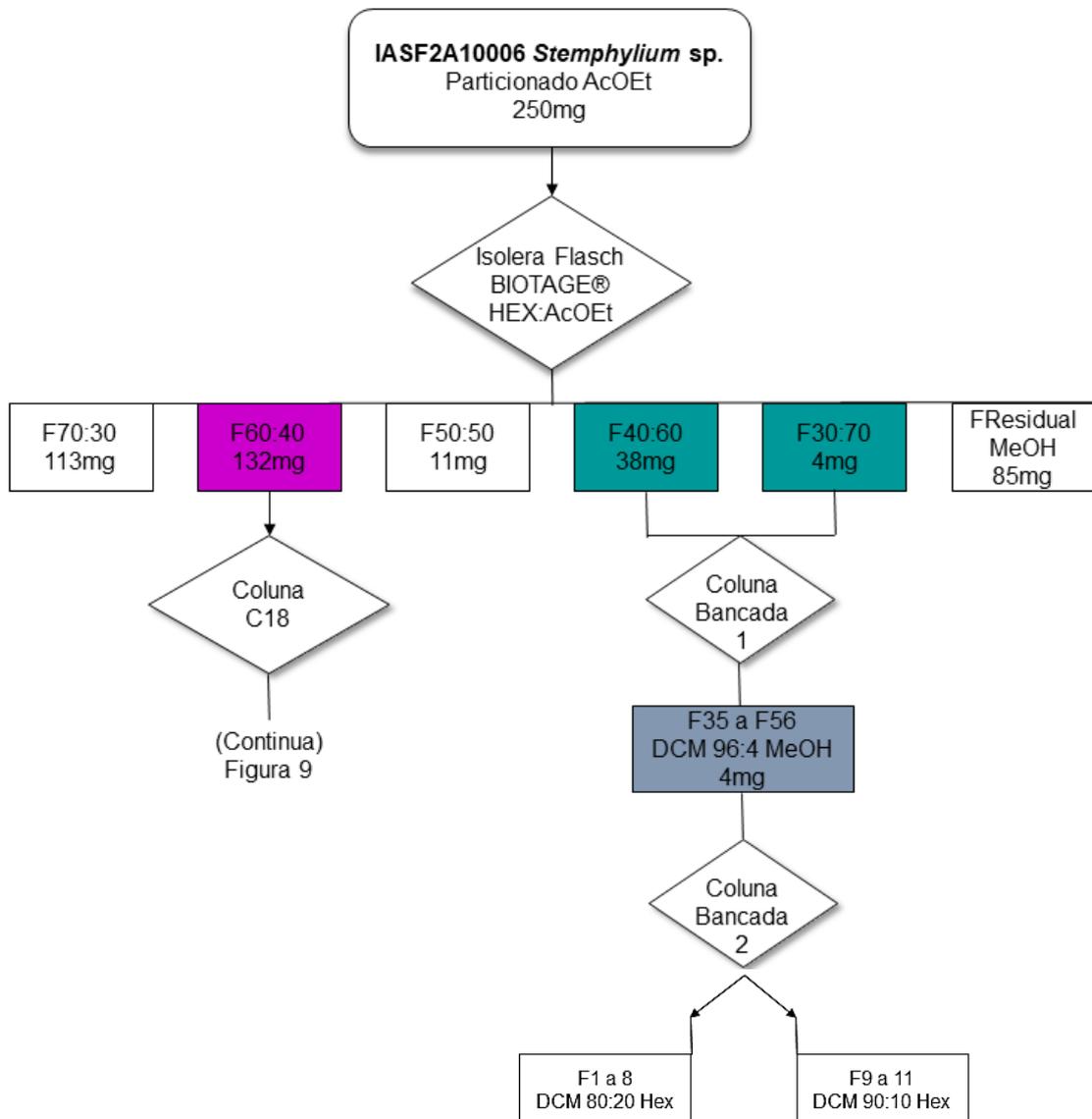
Legenda: Resultados foram expressos como a média (MD) ± desvio padrão (DP). .. - Campo anulado; Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etila; BuOH – n-butanol; H<sub>2</sub>O – Água destilada; [ ] extratos - 50 µg/ml DMSO 1%; CN – Controle Negativo (tripomastigotas *T. cruzi*) DMSO 1%; CP – Controle Positivo (Benznidazol 13 µg/ml).

Os resultados mostraram baixa atividade dos extratos contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* para os três fungos avaliados.

### 7.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FRACIONADOS

O fracionamento dos extratos ativos foi iniciado pelo extrato particionado ativo AcOEt IASF2A10006 do fungo *Stemphylium* sp., devido ao seu maior percentual de rendimento. O fluxograma de fracionamento está representado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma da obtenção das frações e os respectivos rendimentos a partir do extrato particionado ativo AcOEt do fungo IASF2A10006.

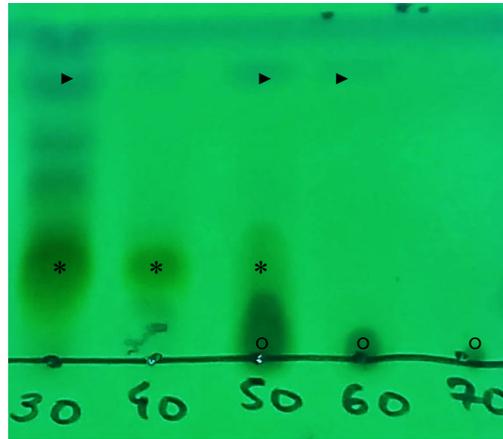


Fonte: Elaborado pela autora.

O fracionamento do extrato AcOEt IASF2A10006, iniciou com uma pré purificação em coluna por *Cromatografia flash* no Isolera. Por meio da *Cromatografia flash* foram obtidas 6 frações, destas, cinco são provenientes dos solventes Hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt), em função da polaridade do solvente AcOEt, a sexta fração é residual, proveniente da limpeza da coluna cromatográfica com o solvente MeOH.

Uma CCD foi feita para fins de monitoramento das frações pré purificadas obtidas da *Cromatografia flash* Isolera (Figura 8).

Figura 8 – Cromatografia de camada delgada na luz UV 254 nm das frações do extrato fúngico ASF2A10006 AcOEt obtidas por *Cromatografia flash* Isolera.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: 30 – F70:30; 40 – F60:40; 50 – F50:50; 60 – F 40:60; 70 – F30:70.

Sistema de eluição Hex 70: 30 AcOEt; ▶ \* ◦ identificação das bandas observadas.

A CCD revelou um perfil químico complexo para a fração Hex 70:30 AcOEt indicando a presença de pelo menos 4 possíveis compostos majoritários, por esse motivo essa fração não foi escolhida para purificação.

A fração Hex 60:40 AcOEt apresentou banda única bem definida indicando que existe um grupo/composto majoritário. A fração Hex 50:50 AcOEt apresentou bandas semelhantes às observadas nas frações anteriores e posteriores (▶ \* ◦). Como seu rendimento foi muito pequeno, e os possíveis compostos majoritários presentes nesta fração aparecem nas outras frações, esta fração não teve seu estudo continuado. As frações Hex 40:60 AcOEt e Hex 30:70 AcOEt apresentaram perfis semelhantes e foram reunidas para continuidade do estudo de purificação em coluna de bancada de fase normal (sub-item 6.3.3.2.). A fração metanólica (MeOH) por ser residual não teve seu estudo continuado.

A Tabela 12 apresenta as porcentagens de rendimento a partir do extrato particionado AcOEt inicial em relação aos extratos pré purificados com os diferentes solventes.

Tabela 12 - Valores de rendimento do extrato ativo AcOEt IASF2A10006 fracionado por *Cromatografia flash* Isolera.

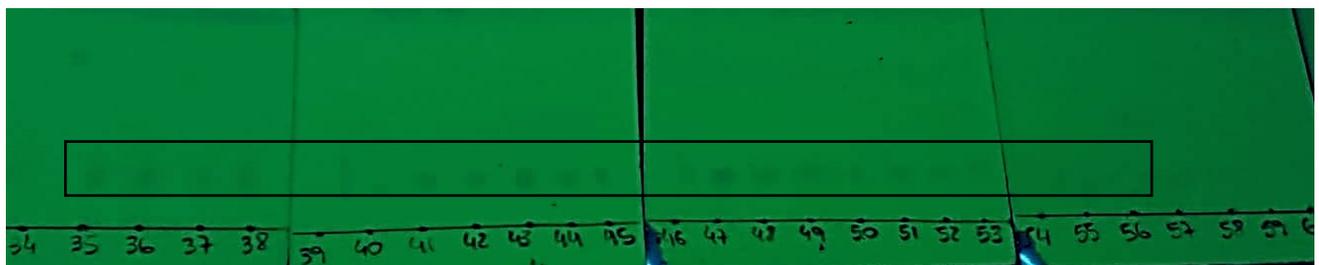
| Extrato Fúngico | Extrato                              |                              | Extratos Fracionados Secos (g) | % de Rendimento |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|
|                 | Particionado AcOEt Rotaevaporado (g) | Proporção solvente Hex:AcOEt |                                |                 |
| IASF2A10006     | 0,250                                | 70:30                        | 0,11                           | 45,20           |
|                 |                                      | 60:40                        | 0,13                           | 52,80           |
|                 |                                      | 50:50                        | 0,01                           | 4,40            |
|                 |                                      | 40:60                        | 0,04                           | 15,20           |
|                 |                                      | 30:70                        | 0,00                           | 0,01            |
|                 |                                      | Fração residual MeOH         | 0,09                           | 0,34            |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etila; MeOH - Metanol.

Na purificação das frações Hex 40:60 AcOEt e Hex 30:70 AcOEt, em coluna de bancada fase normal (Coluna 1), foram obtidas 92 subfrações. Após evaporação dos solventes, as subfrações foram monitoradas por CCD. O intervalo das subfrações de 35 a 56, obtidas principalmente com o sistema 3 de solventes na proporção DCM 96:4 MeOH, apresentaram um perfil semelhante (Figura 9), com a mesma característica de banda aparente, indicando uma melhor purificação, e foram reunidas.

Figura 9 - Cromatografia de Camada Delgada luz UV 254nm das sub frações 35 a 56 da Coluna 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Sistema de eluição DCM 95: 5 MeOH.

A seguir, as subfrações foram novamente monitoradas por CCD e observado a presença de mais de uma banda, indicando que o processo de purificação não havia isolado ou separado apenas um dos compostos majoritários, como observado

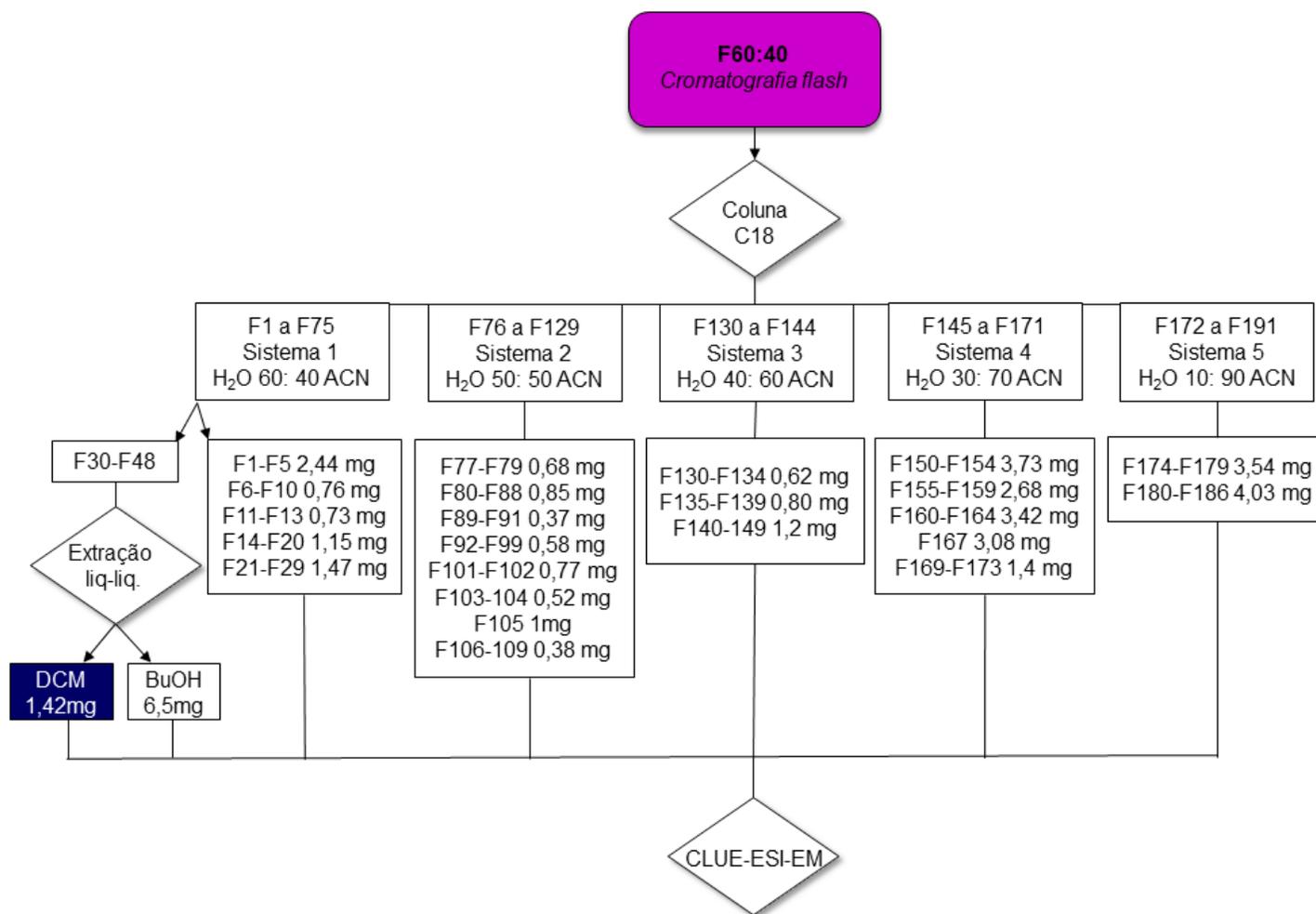
anteriormente. Este fato pode ter relação com a diluição dos compostos nas subfrações separadamente monitoradas, que após reunião, pode ter havido uma maior concentração dos compostos presentes, possibilitando sua melhor visualização.

As subfrações (35 a 56) foram novamente purificadas em coluna de bancada de fase normal, Coluna 2, e dela foram obtidas 11 subfrações. Mesmo após nova purificação, com diferentes sistemas de eluição aplicados na Coluna 2 de bancada, as subfrações de 1 a 11 ainda permaneceram semelhantes e apresentando mais de uma banda. Uma possibilidade para que não tenha ocorrido a separação é que os compostos ali presentes, podem ser isômeros e por isso apresentem Fatores de Retenção (RF) muito próximos, além da pouca quantidade de amostra (4 mg).

Na impossibilidade de purificação apresentada diante dos resultados obtidos para as Colunas 1 e 2, novos testes foram feitos, com a fração Hex 60:40 AcOEt, também obtida da *Cromatografia flash* Isolera, objetivando sua purificação. Primeiramente, utilizou-se o sistema A ACN 70: 30 H<sub>2</sub>O, e após testou-se o sistema B ACN 60: 40 H<sub>2</sub>O, monitorados em CCD com sílica de fase reversa (C18). Após monitoramento por CCD dos sistemas A e B, foi possível observar que ambos os sistemas apresentam bandas semelhantes, sendo que no sistema B as bandas estavam mais próximas da base, o que resulta em uma retenção maior dos grupos majoritários presentes na fração pré purificada. Com base nessa triagem, foi possível ter uma indicação de que na coluna de bancada de fase reversa (C18) pode haver melhor purificação, com sistema de eluição H<sub>2</sub>O:ACN em ordem crescente de polaridade em relação à ACN.

Com base no descrito anteriormente, foi feita a purificação da fração Hex 60:40 AcOEt, obtida da pré purificação no Isolera, em coluna de fase reversa C18. Após a purificação em coluna C18, foram obtidas 191 subfrações. O fluxograma deste fracionamento está mostrado na Figura 9.

Figura 10 - Fluxograma de obtenção das subfrações em coluna de fase reversa C18 a partir da fração Hex 60: 40 AcOEt por *Cromatografia flash* Isolera e os respectivos rendimentos.

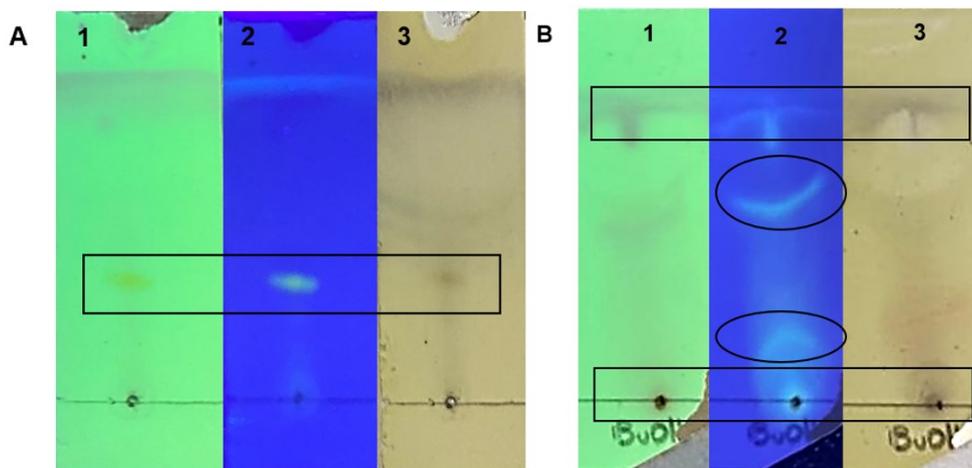


Fonte: Elaborado pela autora.

As subfrações obtidas em coluna C18 foram monitoradas por CCD, e a partir da revelação em luz UV 254 foram observadas bandas aparentes nas subfrações: F2 a F10, F21 a F24 e F33 a F39 obtidas do sistema 1 (H<sub>2</sub>O 60: 40 ACN); nas subfrações F84 a F94 obtidas do sistema 2 (H<sub>2</sub>O 50: 50 ACN) e nas subfrações F174 a 177 obtidas do sistema 5 (H<sub>2</sub>O 60: 40 ACN). Na luz UV 365 as bandas aparentes foram observadas nas subfrações: F2 a F10, F12 a F15, F30 a F48 obtidas do sistema 1 (H<sub>2</sub>O 60: 40 ACN), F80 a F84, F85 a F94, F96 a F104 e F105 a F109; nas subfrações: F110 a F119 obtidas do sistema 2 (H<sub>2</sub>O 50: 50 ACN); e nas subfrações F133 a F136 obtidas do sistema 3 (H<sub>2</sub>O 40: 60 ACN). Com o revelador vanilina sulfúrica as bandas aparentes foram observadas nas subfrações: F2 a F14, F21 a F24, e F78 a F108, obtidas do sistema 1 (H<sub>2</sub>O 60: 40 ACN). Nas subfrações F130 a F191 foi possível observar a presença de precipitado de coloração amarela, e a partir da subfração F177 não foram mais observadas bandas nas CCD de monitoramento.

A partir dos resultados observados nas CCD, as subfrações de 30 a 48 que apresentaram uma banda única, foram reunidas. Para separar a fase orgânica, com o possível composto de interesse procedeu-se com uma extração líquido-líquido, utilizando DCM e BuOH. Após secagem dos solventes foram feitas novas CCD de monitoramento (Figura 10) para o particionado DCM e para o particionado BuOH. Para o particionado DCM foi possível observar que após a união das subfrações 30 a 48, o perfil de banda única permaneceu, o que indica que não houve mistura ou degradação em relação às subfrações observadas de forma individual. Procedeu-se então à análise da subfração por CLUE-ESI-EM. Para o particionado BuOH, observou-se a presença de 4 bandas, sendo uma na base, duas bandas intermediárias e uma banda superior. Assim, foi possível concluir que se trata de uma mistura de moléculas. A subfração reunida 30-48 BuOH seguiu para caracterização do seu perfil químico por CLUE-ESI-EM.

Figura 11 – Cromatografia de camada delgada da união das subfrações 30 a 48 obtidas da Coluna C18 a partir da fração Hex 60:40 AcOEt da *cromatografia flash* Isolera por extração líquido:líquido DCM e BuOH.



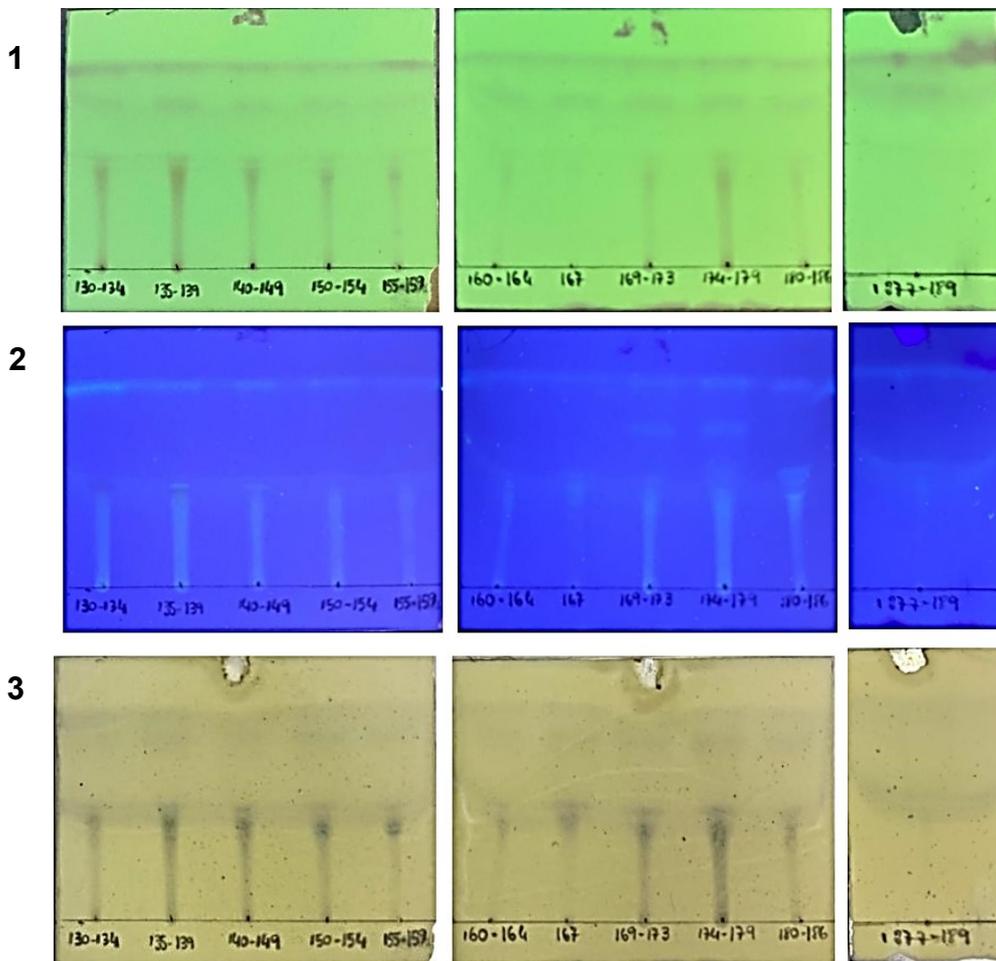
Fonte: Elaborado pela autora.

A - Extração líquido: líquido com DCM; B - Extração líquido: líquido BuOH; 1 – Luz UV 254 nm; 2 – Luz UV 365 nm; 3 – Revelador Vanilina Sulfúrica; Eluente - DCM 95: 5 MeOH.

As subfrações F130 a F191 (exceto a F190 que apresentou cristais) também tiveram a parte precipitada monitoradas por CCD. Para isso os precipitados foram solubilizados com DCM e aplicados nas CCD.

A partir da observação das CCD dos precipitados (Apêndice A, B e C), as subfrações foram unidas por similaridade. Destaca-se que para estas subfrações é possível observar a presença de mais de uma banda aparente, nos diferentes reveladores (UV 254, 365 nm e Vanilina Sulfúrica) utilizados, o que indica que o composto ou grupo, não estão isolados. Assim foram unidas as subfrações 130 a 134, 135 a 139, 140 a 149, 150 a 154, 155 a 159, 160 a 164, 169 a 173, 174 a 179, 180 a 186 e 187 a 189. A exceção foi a subfração 167, que não foi unida a outras por apresentar uma CCD diferente em relação às suas subfrações mais próximas observadas. Após, as subfrações com precipitados serem reunidas, novas CCD de monitoramento foram feitas, e pode-se observar que o perfil de bandas se manteve inalterado (Figura 12), e as amostras seguiram para caracterização do seu perfil químico por CLUE-ESI-EM, com exceção da união de 187 a 191 em que não foi observada presença de bandas.

Figura 12 - Cromatografia de Camada Delgada reunião das sub frações com precipitado obtidas da coluna C18, DCM 90: 10 MeOH



Fonte: Elaborado pela autora.

1 – UV 254 nm; 2 – UV 365 nm; 3 – Revelador Vanilina Sulfúrica

As subfrações iniciais de 1 a 129, foram monitoradas novamente após estarem mais concentradas, por evaporação dos solventes. As subfrações foram reunidas por similaridade aparente na CCD em 1 a 5, 6 a 10, 11 a 13, 14 a 20, 21 a 29, 77 a 79, 80 a 88, 89 a 91, 92 a 99, 101 a 102, 103 a 104, 105 mantida sozinha e 106 a 109. Para as subfrações 110 a 129, não foram observadas bandas, e não tiveram seus estudos continuados.

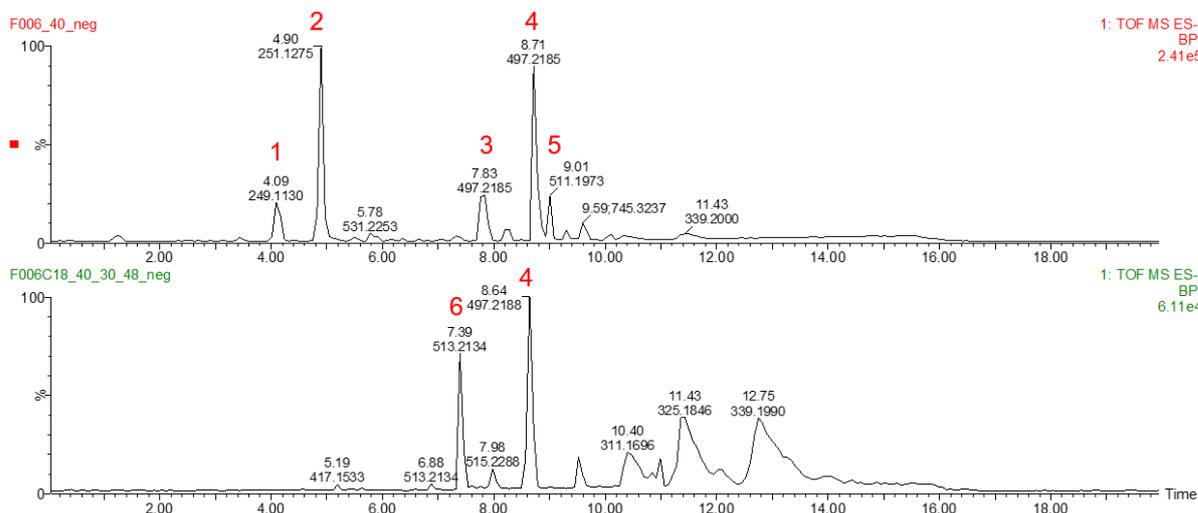
As demais subfrações continuaram apresentando o mesmo perfil observado anteriormente, indicando a presença de uma mistura. As subfrações reunidas seguiram para caracterização do seu perfil químico por CLUE-ESI-EM.

### 7.3.1 Perfil químico do extrato fúngico IASF2A10006 particionado e subfrações por CLUE-ESI-EM

A cromatografia líquida é uma das técnicas cromatográficas analíticas em coluna mais descritas na literatura para a análise de produtos naturais por suas especificidades. Além disso, é a mais utilizada pelos códigos oficiais farmacêuticos, como as Farmacopeias do Brasil, Estados Unidos e da Comunidade Europeia (ANVISA<sup>d</sup>, 2022; FDA<sup>b</sup>, 2022; EMA, 2020). Por meio da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-ESI-EM) é possível analisar uma amplitude grande de amostras em um menor período de tempo, além de fazer a quantificação dos compostos de interesse. Também permite a utilização de uma ampla gama de fases estacionárias como a fase reversa, onde são utilizadas partículas de sílica menores que 2  $\mu\text{m}$ , o que gera alta capacidade de resolução dos componentes presentes na mistura do extrato. Quando associada a determinados sistemas de solventes a técnica de CLUE permite a separação da mistura analisada, e quando acoplado ao espectrômetro de massas (EM) permite a identificação da mistura analisada. A ressonância magnética nuclear (RMN), após prévia purificação da mistura em coluna, possibilita a elucidação estrutural completa das moléculas sem a necessidade de amostras de referência para comparação (SIMÕES, 2017).

A análise por CLUE-ESI-MS foi utilizada para a fração pré purificada Hex 60: 40 AcOEt obtida da *Cromatografia flash* Isolera, e todas as subfrações obtidas da coluna de fase reversa C18. Após realizar as análises, o cromatograma da fração pré purificada apresentou dois picos majoritários e três picos com menor intensidade (Figura 13 e Tabela 13).

Figura 13 - Cromatograma adquirido no modo de ionização negativo da análise de CLUE-ESI-EM referente a fração pré purificada por  *cromatografia flash* Isolera e subfração da coluna de fase reversa C18 para o extrato fúngico de *Stemphylium* sp.



Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

Tabela 13 - Compostos caracterizados a partir da fração pré purificada no Isolera e subfrações purificadas em coluna C18 do extrato fúngico de *Stemphylium* sp. por análise de CLUE-ESI-EM.

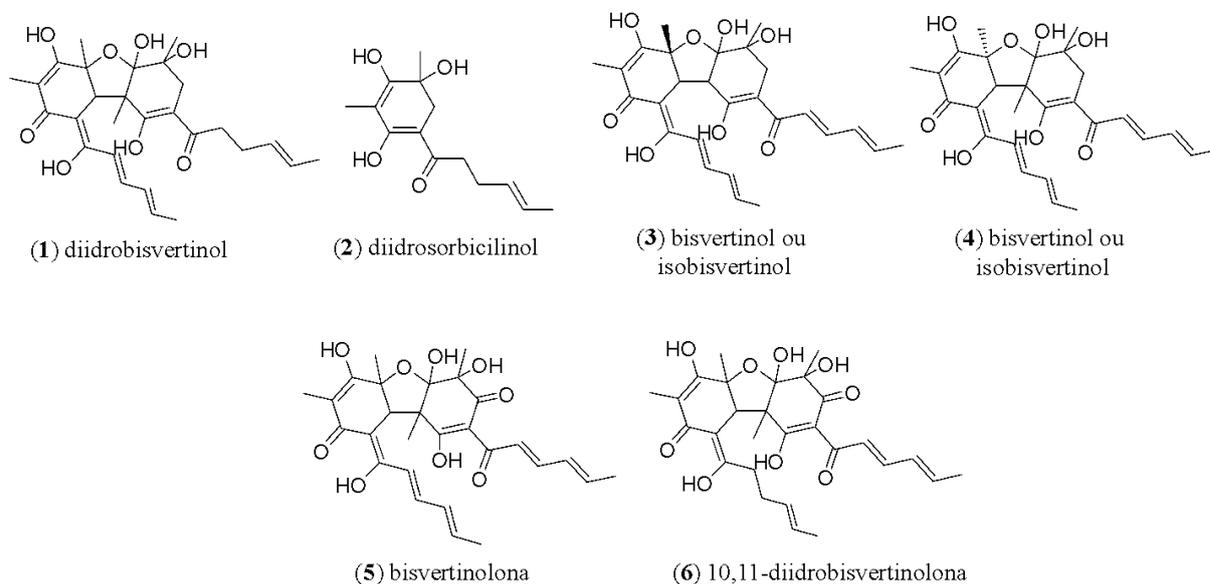
| n° pico | t <sub>R</sub> (min) | Fórmula Molecular   | Íon m/z (erro, ppm) | Íons fragmentos MS <sup>2</sup>                 | Composto proposto             | Subfração  |
|---------|----------------------|---|---------------------|---|-------------------------------|------------|
| 1       | 4,09                 | [C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup> | 499,2343 (2.2)      | 263,0924; 249,1130;                             | Diidrobisvertinol             | 1-5, 77-88 |
| 2       | 4,90                 | [C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> - H] <sup>-</sup> | 251,1275 (-3.2)     | 251,1275  | Diidrosorbicilinol            | 1-5        |
| 3       | 7,83                 | [C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup> | 497,2185 (2.0)      | 265,1092; 249,1130; 231,1017                    | Bisvertinol ou Isobisvertinol | 30-48 DCM  |
| 4       | 8,71                 | [C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup> | 497,2185 (2.0)      | 249,1130  | Bisvertinol ou isobisvertinol | 30-48 DCM  |
| 5       | 9,01                 | [C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup> | 511,1973 (1.0)      | 263,0924; 249,1137 251,1275; 207,0676;          | Bisvertinolona                | -          |
| 6       | 7,39                 | [C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup> | 513,2134 (3.1)      | 483,1663; 427,1756; 249,1137; 251,1275 231,1026 | 10,11- diidrobisvertinolona   | 30-48 DCM  |
| -       | 9,08                 | [C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup> | 513,2141 (3.1)      | -   | Isômero de 6                  | 80-88      |

Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

A partir dos padrões de fragmentação MS<sup>2</sup> obtidos e, em conjunto com as informações da literatura, foi identificado uma mistura de três isômeros diidrobisvertinol (**1**), diidrosorbicilinol (**2**), bisvertinol ou isobisvertinol (**3** e **4**), bisvertinolona (**5**) e 10,11-diidrobisvertinolona (**6**), pertencentes a classe química de polipeptídios da família de sorbicilínóides (Figura 14 e Tabela 13). Os fungos endofíticos podem produzir metabólitos secundários que se originam de peptídeos não ribossômicos (NRPs), policetídeos (PKSs) ou ambos. Alguns desses metabólitos têm aplicações farmacêuticas, como a penicilina, ciclosporina e estatinas, e outros são toxinas, como as aflatoxinas. Entre os metabólitos derivados de PKSs, há um grupo de compostos naturais denominados "sorbicilínóides" e "bisorbicilínóides", que também são chamados de "pigmento amarelo". Eles são encontrados principalmente em fungos dos gêneros *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp. e *Penicillium* sp., mas também em outros gêneros como *Aspergillus* sp., *Streptomyces* sp., *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Eurotiomycete* sp. Estes compostos são formados por uma (monômeros) ou duas (dímeros) unidades de sorbicilina, totalizando mais de 30 variantes. Os sorbicilínóides podem ser classificados em quatro classes, conforme suas características estruturais: monoméricos, bisorbicilínóides, trisorbicilínóides e sorbicilínóides híbridos. Os dímeros podem ser formados por uma reação de Diels-Alder, como o bisorbicilinol, ou por uma adição tipo-Michael, que gera estruturas tricíclicas ou maiores, como a bisvertinolona (LIN, et al. 2009; LI, et al. 2010; HARNED & VOLP, 2011; MENG, 2016; LI, et al. 2018, KAHLERT et al., 2020; HOU, 2022).

A isomeria segundo Pavanelli (2014) e Silva (2018) é o fenômeno que ocorre quando compostos diferentes compartilham a mesma fórmula molecular, assim, possuem a mesma massa molecular, mas apresentam estruturas diferentes, pois o arranjo dos átomos na molécula ocorre em sequência diferente. As isomerias se dividem em plana e espacial. Na isomeria plana os isômeros possuem a mesma fórmula molecular, mas com conectividades diferentes, então são chamados de isômeros constitucionais. Na isomeria espacial os isômeros possuem a mesma fórmula molecular e mesma conectividade, mas diferem na maneira como os átomos estão posicionados no espaço tridimensional, então são chamados de isômeros espaciais ou estereoisômeros.

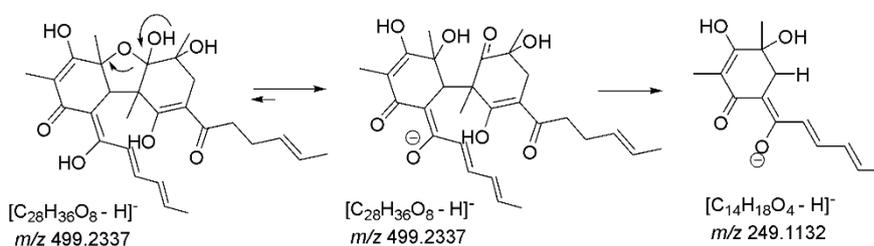
Figura 14 - Estrutura dos compostos identificados na fração Hex 60:40 AcOEt e suas subfrações obtidas em coluna de fase reversa C18 do fungo *Stemphylium* sp.



Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

No cromatograma da Figura 11, o pico **1** no tempo de retenção ( $t_R$ ) de 4,09 min tem como razão massa/carga ( $m/z$ ) 499,2343 [ $C_{28}H_{36}O_8 - H$ ]<sup>-</sup>, e para esta fórmula molecular foi sugerida a molécula diidrobisvertinol (**1**) (Figura 12). No pico **1** foi observado no cromatograma pelo seu pico de base (intensidade 100%) de  $m/z$  249,1130 correspondente a fórmula molecular [ $C_{14}H_{18}O_4 - H$ ]<sup>-</sup>, que este íon é um fragmento que corresponde a uma unidade monomérica de sorbicilinoide (Figura 15).

Figura 15 - Mecanismo de fragmentação para molécula diidrobisvertinol.



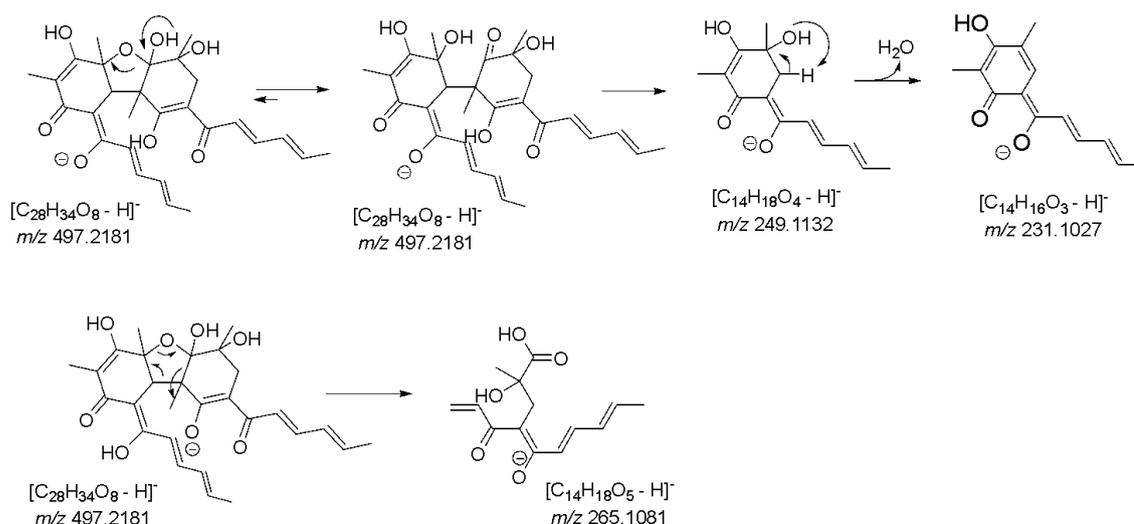
Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

Foi observado que o pico **2** no  $t_R$  de 4,90 min e com  $m/z$  251,1275 [ $C_{14}H_{20}O_4 - H$ ]<sup>-</sup> não gerou fragmentos para uma identificação consistente, no entanto, com base em busca na literatura esta fórmula molecular correspondeu a estrutura da molécula

diidrosorbicilinol (**2**) (Figura 12), um monômero sorbicilinoíde (DERNTL, 2017). Vale notar que o composto **2** apresenta uma insaturação a menos comparado ao íon fragmento ( $m/z$  249,1130) do composto **1**.

Para o pico **3** foi atribuído a molécula bisvertinol ou isobisvertinol (**3**) (Figura 16), um sorbicilinoíde dimérico (ZHANG, 2019). Investigando o seu espectro MS<sup>2</sup> foi observado que a molécula sofreu a perda do fragmento de  $m/z$  249,1130 [C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup>, uma unidade monomérica de sorbicilinoídes. Em seguida, ocorre a eliminação de água (18Da) para gerar o fragmento  $m/z$  231,1017 [C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> - H]<sup>-</sup>. Foi observado ainda o fragmento  $m/z$  265.1081 [C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> - H]<sup>-</sup>, formado pela abertura do anel de 5 membros da molécula (Figura 14).

Figura 16 - Mecanismo de fragmentação para molécula bisvertinol ou isobisvertinol.



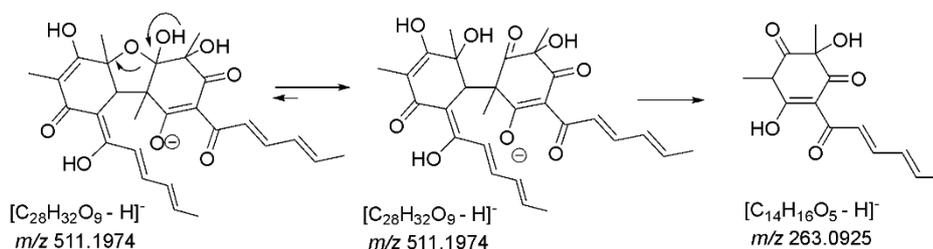
Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

O pico **4** no  $t_R$  de 8,71 min e com  $m/z$  497,2185 [C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub> - H]<sup>-</sup> corresponde a um isômero do pico **3**, visto que possuem a mesma razão massa/carga ( $m/z$ ) e fórmula molecular, no entanto aparecem em tempos de retenção diferente. O estudo do perfil de fragmentação mostrou ser semelhante ao pico **3**, portanto foi atribuído para pico **4** um isômero da molécula bisvertinol ou isobisvertinol (**4**) (Figura 12).

Para o pico **5** no  $t_R$  9,01 min e com  $m/z$  511,1973 [C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub> - H]<sup>-</sup>, foi atribuído a molécula bisvertinolona (**5**) (Figura 12), outro sorbicilinoíde dimérico (KAHLERT, 2020). Sua identificação foi baseada na literatura e na investigação do seu espectro MS<sup>2</sup>, onde foi observado o fragmento  $m/z$  263,0924 [C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub> - H]<sup>-</sup>, que corresponde

a uma unidade monomérica de sorbicilinoídes, gerado a partir da abertura do anel de 5 membros (Figura 17).

Figura 17 - Mecanismo de fragmentação da molécula bisvertinolona.

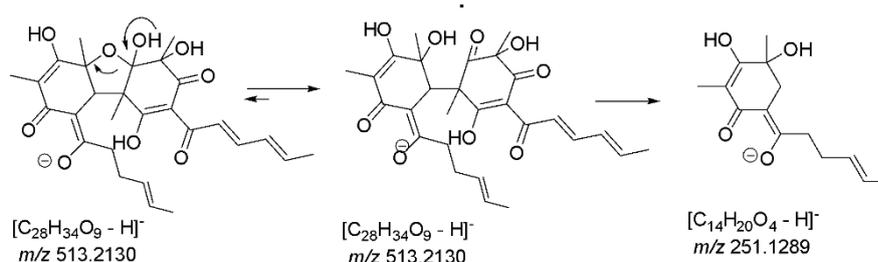


Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

Buscando purificar a fração pré purificada foi realizada a purificação em coluna de fase reversa C18, as subfrações obtidas foram reunidas de acordo com padrão apresentado na CCD e, em seguida, realizado as análises de CLUE-MS. Os cromatogramas obtidos mostraram que existia mais de um composto presente em cada subfração, logo não foi possível isolar este grupo de compostos, em razão principalmente de serem molecular e estruturalmente semelhantes.

No cromatograma da subfração 30-48 DCM, foi observado um pico **6** no tempo de retenção 7,39 min e com  $m/z$  513.2134  $[C_{28}H_{34}O_9 - H]^-$ , o qual não foi detectado antes do fracionamento na coluna de fase reversa. No seu espectro MS<sup>2</sup> foi detectado o fragmento  $m/z$  251,1275  $[C_{14}H_{20}O_4 - H]^-$ , correspondente a uma unidade monomérica de sorbicilinoide. Com base na literatura a identificação levou à proposta do composto 10,11-diidrobisvertinolona (**6**), outro sorbicilinoide dimérico (Figura 18) (LIN, 2009).

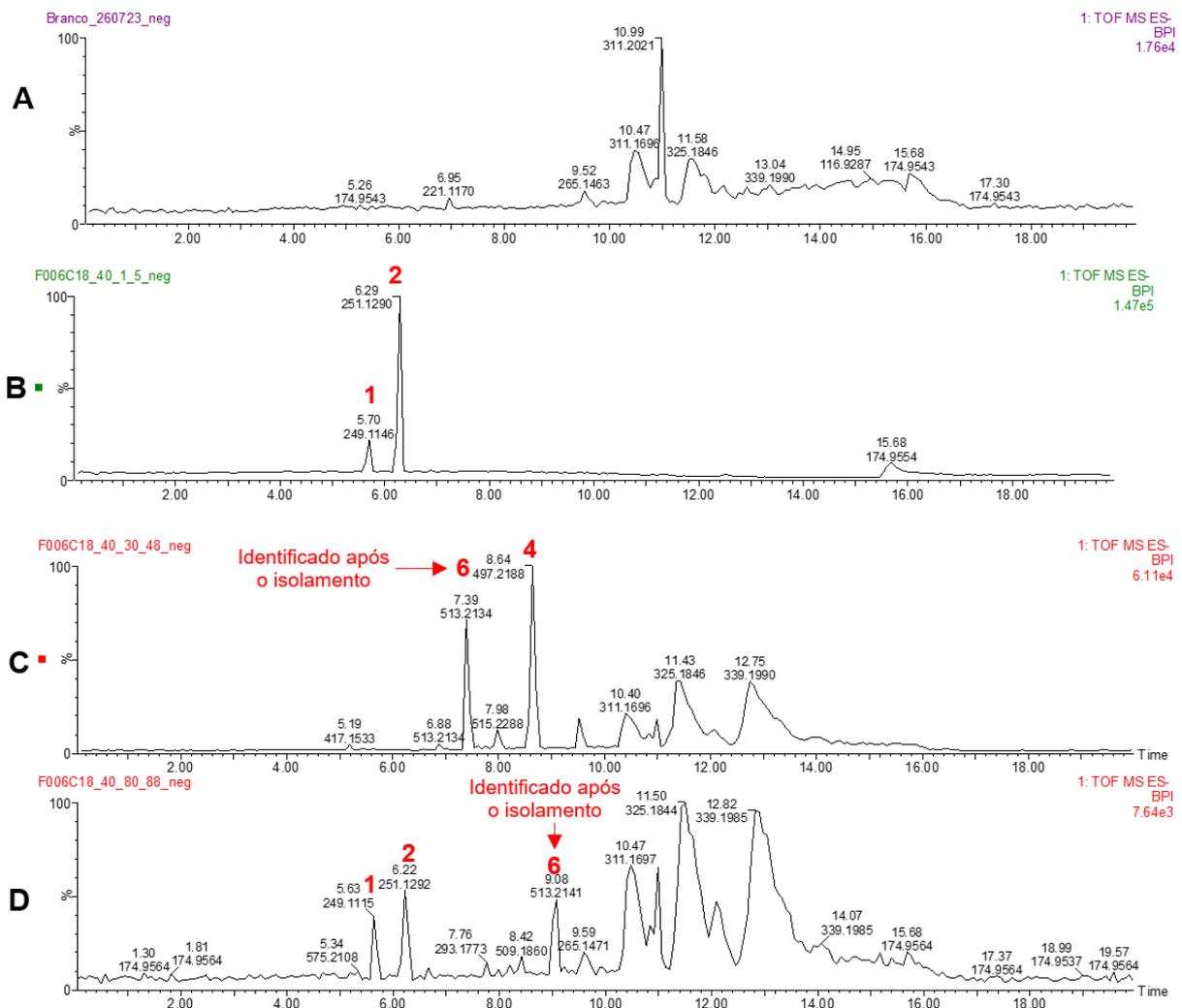
Figura 18 - Mecanismo de fragmentação da molécula 10,11- diidrobisvertinolona.



Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

As subfrações que apresentaram cromatogramas em que foi possível observar a presença de compostos majoritários foram 1-5, 6-10, 30-48 DCM, 77-79 e 80-88, obtidas do extrato fúngico IASF2A10006 são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Cromatograma adquirido no modo de ionização negativo da análise de CLUE-ESI-EM referente às subfrações 1-5, 30-48 DCM e 80-88 obtidas após purificação em coluna de fase reversa C18 a partir da fração Hex 60:40 AcOEt.



Fonte: Elaborado pela autora em colaboração.

Legenda: **A** Branco (solvente ACN); Subfrações **B** 1-5; **C** 30-48 DCM; **D** 80-88.

Para os compostos bisvertinol, bisvertinolona e 10,11-diidrobisvertinolona identificados, foi feita uma busca na plataforma SciFinder® (CAS, 2023), quanto às suas atividades biológicas descritas até o momento (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividades biológicas para os compostos majoritários identificados.  
(Continua)

| Composto                       | Atividade biológica  | Fungos produtores                    | Referência                  |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------|
| 10,11-diidrobisvertinolona     | Antibacteriana e $\alpha$ -glicosidase   | <i>Penicillium</i> sp.<br>SCSIO06871 | PANG et al. (2021)          |
| 10,11-diidrobisvertinolona     | Atividade anti-inflamatória ao inibir a produção de NO em células RAW264.7                                       | <i>Trichoderma reesei</i><br>4670    | ZHANG et al. (2019)         |
| Bisvertinol                    | Atividade antioxidante, antimicrobiano, inibição de HIV-1 RT   | <i>Trichoderma viride</i>            | ABDEL-LATEFF et al. (2014)  |
| Bisvertinol                    | Atividade inibitória de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  | <i>Trichoderma</i> sp.<br>FM652      | AHAMMAD et al. (2022)       |
| Bisvertinol                    | Atividade antifúngica  | <i>Hypocrea jecorina</i> H8          | LIU et al., (2022)          |
| Bisvertinol                    | Inibição do acúmulo de gotículas lipídicas nos macrófagos  | <i>Aspergillus</i> sp. FKI-1746      | KOYAMA et al. (2007)        |
| Bisvertinolona                 | Inibidor da biossíntese de $\beta$ -1,6-glucana  | <i>Acremonium strictum</i>           | MASANORI et al. (1994)      |
| Bisvertinolona                 | Ação antioxidante (DPPH)   | <i>Trichoderma</i> sp.               | ABE et al (1998; 2002)      |
| Bisvertinol,<br>Bisvertinolona | Não ativo contra o fungo <i>Mycena citricolor</i> anti-HIV ativo atividade citotóxica células leucêmicas L5178y, | <i>Trichoderma longibrachiatum</i>   | ANDRADE et al., (1992).     |
| Sorbicilatonas A (I) e B (II)  | carcinoma cervical HeLa Células S3 e células PC 12 de feocromocitoma.  | <i>Penicillium chrysogenum</i>       | BRINGMANN et al., (2005)    |
| Bisvertinol                    | Inibição do acúmulo de gotículas lipídicas nos macrófagos  | <i>Aspergillus</i> sp. FKI-1746      | KOYAMA et al. (2007)        |
| Bisvertinolona                 | Produtor de $\beta$ -lactâmicos  | <i>Penicillium chrysogenum</i>       | GUZMÁN-CHÁVEZ et al. (2017) |
| Bisvertinolona                 | Citotoxicidade célula leucemia HL-60   | <i>Trichoderma</i> sp.               | LIN et al. (2009)           |

Tabela 14 - Atividades biológicas para os compostos majoritários identificados.  
(Conclusão)

| Composto       | Atividade biológica  | Fungos produtores   | Referência             |
|----------------|--|---|------------------------|
| Bisvertinolona | atividades citotóxica, antibacteriana e antifúngica<br>Ensaio de citotoxicidade HeLa (linha celular de câncer cervical humano), BEL-7402 (linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano), HEK-293 | <i>Ustilagoidea virens</i><br>(teleomorfo: <i>Villosiclava virens</i> ) | MENG et al. (2019)     |
| Bisvertinolona | (linhagem celular de rim embrionário humano), HCT-116 (linhagem celular de câncer de cólon humano) e P388 (linha celular de leucemia)  | <i>Penicillium</i> sp.  | GUO et al. (2013)      |
| Bisvertinolona | produção de enzima celulase e sorbicilínóides  | <i>Trichoderma reesei</i>   | LI, et al. (2018)      |
| Bisvertinolona | inativação fotodinâmica de bactérias gram-positivas  | <i>Trichoderma reesei</i>   | YANG, et al. (2020)    |
| Bisvertinolona | Citotoxicidade células P388 e K562   | <i>Phialocephala</i> sp.  | LI, et al (2010)       |
| Bisvertinolona | Inibidores da biossíntese de $\beta$ -glucana  | <i>Phytophthora</i> sp.   | KONTANI, et al. (1990) |
| Bisvertinolona | Inibe a biossíntese de $\beta$ -1,6-glucana em fungos.   | <i>Trichoderma</i> sp.  | SUGAYA et al. (2019)   |
| Bisvertinolona | Atividade antifúngica  | <i>Trichoderma longibrachiatum</i>                                      | NGO et al. (2021)      |

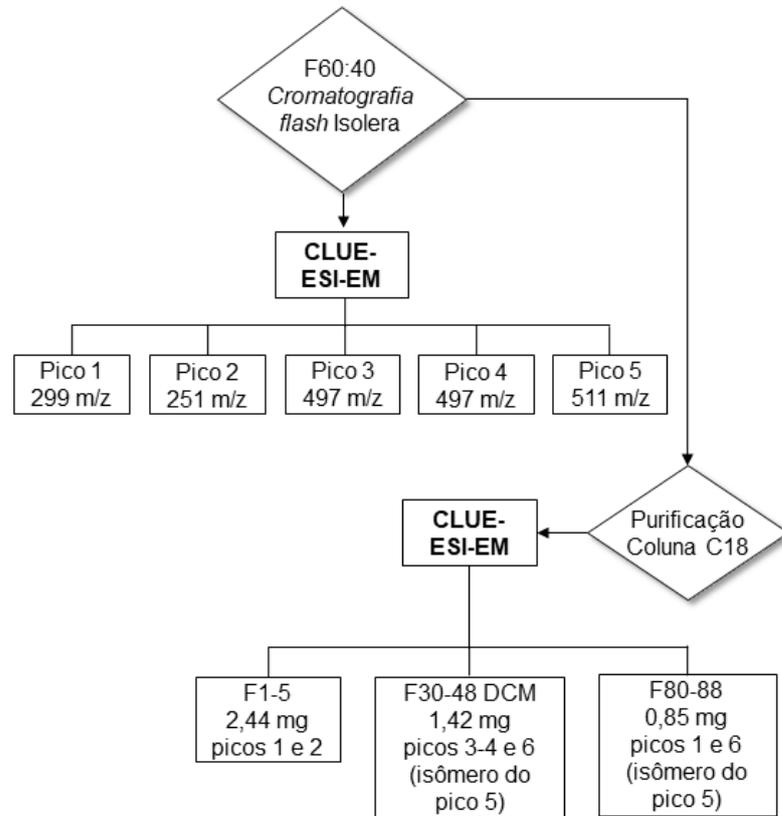
Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da pesquisa para as atividades biológicas, não foram identificados na literatura os compostos majoritários presentes no extrato fracionado para o fungo

*Stemphylium* sp. Liu et al. (2022) também identificaram sorbicilinóides como o bisvertinol e a 2,3-diidrosorbicilina de um fungo marinho *Hypocrea jecorina* H8, o que corrobora com a ideia de que fungos de diferentes gêneros podem produzir os mesmos metabólitos secundários, talvez por estarem expostos ao mesmo ambiente, como é o caso do fungo marinho do gênero *Stemphylium* sp. Segundo Frisvad e Andersen (2008) o composto químico que só é produzido por algumas espécies de fungos dentro de um gênero, uma ordem, ou mesmo filo chamado de metabólito secundário, vai formar o perfil químico de um fungo a depender também do substrato fornecido. A filogenia baseada em metabólitos secundários ainda não é viável, pois eles não são distribuídos uniformemente entre os fungos, no entanto, essa característica torna os metabólitos secundários úteis para classificar e identificar os fungos.

A partir do que foi observado no perfil químico da fração Hex 60:40 AcOEt obtida da pré purificação da *cromatografia flash* Isolera, é possível afirmar que as demais frações purificadas em coluna de fase reversa (C18) corroboram com os compostos majoritários observados em ambas frações: pré purificada e purificadas. Baseado nisso, as frações com cromatogramas e espectros mais limpos, que possuem os compostos majoritários observados e em maiores quantidades (mg), foram selecionados para ensaios biológicos (Figura 20).

Figura 20 – Seleção para os ensaios biológicos das subfrações obtidas em coluna de fase reversa C18 a partir da fração pré purificada Hex 60:40 AcOEt da *cromatografia flash* Isolera.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes de atividade biológica não puderam ser executados devido a algumas limitações como: a) dificuldade de obtenção dos compostos purificados, só conseguido muito recentemente; b) baixa quantidade de amostra obtida – mesmo que as frações com maiores massas tenham sido selecionadas para a purificação, só foi possível obter uma massa de 2,44 mg para a subfração com melhor rendimento; c) características físico-químicas das subfrações – por terem uma característica oleosa, se torna difícil a pesagem, uma vez que tendem a ficarem retidas nas paredes dos frascos. No entanto, estes ensaios já estão programados e serão executados para confirmação ou não de atividade antitripanosoma de compostos sorbicilínóides.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

Extratos totais produzidos a partir de fungos endofíticos *Arthrinium* sp. *Stemphylium* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* mostraram atividade antitripanosoma e citotóxica *in vitro* em células THP-1;

Nenhum dos extratos totais mostrou atividade antibacteriana nos modelos avaliados;

Os extratos particionados dos fungos *Stemphylium* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*, apresentaram baixa atividade antitripanosoma e elevada citotoxicidade *in vitro*;

O fracionamento bio guiado do extrato particionado ativo acetato de etila do fungo IASF2A10006 pertencente ao gênero *Stemphylium* sp., permitiu identificar cinco compostos majoritários - bisvertinol, bisvertinolona, diidrobisvertinol, diidrosorbicilinol e 10,11-diidrobisvertinolona – pertencentes a classe dos sorbicilinóides, pela primeira vez descritos para esta espécie de fungo endofítico;

Os compostos da classe dos sorbicilinóides, são possivelmente, as potenciais moléculas responsáveis pela atividade antitripanosoma observada.

### 8.1 PERSPECTIVAS

A caracterização química por CLUE-ESI-EM do extrato particionado AcOEt IIRF2A10022 obtido do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, poderá revelar a presença de compostos majoritários, além da sua purificação em coluna de fase reversa C18. Os testes de atividade biológica dos compostos isolados, poderá confirmar a atividade antitripanosoma destes compostos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEFF, A. et al. Trichopyrone and Other Constituents from the Marine Sponge-Derived Fungus *Trichoderma* sp. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 64, p. 186-192, 2014.
- ABE, N. et al. Novel DPPH Radical Scavengers, Bisorbicillinol and Demethyltrichodimerol, from a Fungus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 62, p. 661–666, 1998.
- ABE, N. et al. The biosynthesis of bisvertinolone: evidence for oxosorbicillinol as a direct precursor. **Chemical Communications**. v. 3, p. 204-205, 2002.
- ABPBIOSCIENCE. **AlamarBlue**. Disponível em: <http://abpbio.com/alarblue-1>  
Acesso em: 15 Jul. 2021.
- ACS - American Chemical Society. **Molecule of the Week Archive Paclitaxel**. Disponível em: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/p/paclitaxel.html>.  
Acesso em: 28 Ago. 2023.
- AHAMMAD et al. New and bioactive polyketides from Hawaiian marine-derived fungus *Trichoderma* sp. FM652. **Natural Product Research**. v. 36, p. 984–5990, 2022.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACHWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley e Sons, 1996. 869 p.
- ALVES, D. F. et. al. Diagnostic methods of Chagas disease: an update. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 53, 2018.
- AMORIM, A. F. V. **Química Métodos Cromatográficos**. Ceará: EdUECE. 1 Ed. 2019. p. 84.
- ANDRADE, R. et al. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 70, p. 2526-2535, 1992.
- ANVISA<sup>a</sup> – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gram negativos fermentadores**. Disponível em:  
[https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/MODULO2/importancia.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/importancia.htm) Acesso em: 15 Set. 2022.
- ANVISA<sup>b</sup> – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 1 ed. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004, p. 381.

ANVISA<sup>c</sup> – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência microbiana – mecanismos e impacto clínico.** Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm) Acesso em: 15 Set. 2022.

ANVISA<sup>d</sup> – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6<sup>a</sup> ed., 2019. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 609, de 9 de março de 2022.

ANVISA<sup>e</sup> - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Uso de antimicrobianos em populações especiais.** Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo4/doses\\_renal.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo4/doses_renal.htm). Acesso em: 20 Jun. 2023.

APPRILL, A. The Role of Symbioses in the Adaptation and Stress Responses of Marine Organisms. **Annual Review of Marine Science**, v. 12, p. 291-314, 2020.

ARGOLO, A. M. et. al. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil.** Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. p. 19.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 266-278, 2012.

ARULMOZHI, P. et.al. Extraction methods and computational approaches for evaluation of antimicrobial compounds from *Capparis zeylanica* L. **Analytical Biochemistry**. v. 572, p. 33-44, 2019.

BARBOSA, R. P.; VIANA, V. J. **Recursos Naturais e Biodiversidade: Preservação e Conservação dos Ecossistemas.** São Paulo: Editora Saraiva, 2014, p. 144.

BASTOS, I. M. A. S. **Caracterização dos fungos endofíticos de mangues de Florianópolis – SC.** 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina.

BELTRAN-HORTELANO, I. et. al. Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 58, p. 20, 2022.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL<sup>a</sup>. Ministério do Meio Ambiente. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Esec de Carijós.** Encarte 1. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/marinho/lista-de-ucs/esec-de-carijos>. Acesso em: 20 jun. 2022.

BRASIL<sup>b</sup>. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**, Brasília 03 de julho de 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/pesquisa/comites-e-comissoes/comite-de-etica-no-uso-de-animais-ceua-inca/legislacao-pertinente#:~:text=Resolu%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20CONCEA%20n%C2%B0,dos%20biot%C3%A9rios%20ou%20instala%C3%A7%C3%B5es%20animais.> Acesso em: 21 Ago. 2022.

BRINGMANN, G. et al. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. **Tetrahedron**. v. 61, p. 7252-7265, 2005.

BRIOSCHI, M. B. C. et. al. Models for cytotoxicity screening of antileishmanial drugs: what has been done so far? **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 60, p. 11, 2022.

BORGES, F. M. M.; ALVES, S. M.; BICUDO, T. C. **Química Geral e Orgânica: uma abordagem para Química Tecnológica**. Natal: EDUFRRN, 2011. p. 110.

BUCKNER F.S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A.C. VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 40, p. 2592-2597, 1996.

BVS<sup>a</sup> – Biblioteca Virtual em Saúde/Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**. Disponível em <https://bvsmms.saude.gov.br/doenca-de-chagas-10/> Acesso em: 10 de Ago. 2022.

BVS<sup>b</sup> – Biblioteca Virtual em Saúde/Ministério da Saúde. **Uso de antibióticos – orientações**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/uso-correto-de-antibioticos/#:~:text=Antibi%C3%B3ticos%20s%C3%A3o%20subst%C3%A2ncias%20capazes%20de,no%20tratamento%20de%20infec%C3%A7%C3%B5es%20bacterianas.> Acesso em: 15 Set. 2022.

CADAMURO, R. D. Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. **Journal of Fungi**. v. 7, p. 19, 2021.

CAMPOS, F. F. et. al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 110, p. 10, 2015.

CANUTO, K. M. et. al. **Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012, p. 35.

CAS - American Chemical Society. **SciFinder Discovery Platform**. Disponível em: <https://scifinder-n.cas.org/> Acesso em: 14 Ago. 2023.

CDC<sup>a</sup> – Centers for Disease Control and Prevention. **American Trypanosomiasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html> Acesso em: 07 Ago. 2022.

CDC<sup>b</sup> – Centers for Disease Control and Prevention. **2019 AR Threats**. Disponível em: [https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbiggest\\_threats.html](https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbiggest_threats.html) Acesso em: 13 Ago. 2022.

CESAD - Centro de Educação Superior a Distância da Universidade Federal de Sergipe. **Extração**. Disponível em: [https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/18482916022012Quimica\\_Organica\\_Experimental\\_Aula\\_2.pdf](https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/18482916022012Quimica_Organica_Experimental_Aula_2.pdf) Acesso em: 01 Ago. 2022.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 159-218, 1909.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2 ed. Guanabara Koogan, 2013, p. 2080.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Endophytic and epiphytic microbes as "sources" of bioactive agents. **Frontiers in chemistry**. p. 34, 2015.

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

CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100**: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne- PA, USA, 2018.

DERNTL, C. et al. *In Vivo* Study of the Sorbicillinoid Gene Cluster in *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-12, 2017.

DEWANJEE, S. et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **J Pharm Anal**. p. 75-84, 2015.

DIÁRIO CATARINENSE. **Bendito Mar de Lama**. Disponível em: [https://www.clicrbs.com.br/sites/swf/DC\\_mangue/index.html](https://www.clicrbs.com.br/sites/swf/DC_mangue/index.html). Acesso em: 25 abr. 2022.

DIAS, A. D. et. al. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**. v. 2, p. 303–336, 2012.

DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**. v. 166, p. 30–33, 2020.

DNDi - Drugs for Neglected Diseases Initiative. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 20, p. 22–35, 2015.

EMA - European Medicines Agency. **European Pharmacopoeia**. Strasbourg, Council of Europe, 10th ed., 2020.

FDA<sup>a</sup> - Federal Drug Administration. **HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION**: These highlights do not include all the information needed to use LAMPIT safely and effectively. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2022/213464s003lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213464s003lbl.pdf)  
Acesso em: 07 Ago. 2022.

FDA<sup>b</sup> - Federal Drug Administration. **The United States Pharmacopeia**. National formulary. Rockville: United States, 2022.

FEDERICO, M. P. et al. Noções sobre parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos e sua utilização na prática médica. **Revista Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. v. 15, p. 201-205, 2017.

FERREIRA, A. M. et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**. v. 27 p. 354-362, 2019.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia Contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020, p. 336.

FERREIRA, E. I. et al. **Fundamentos de química farmacêutica medicinal**. São Paulo: Editora Manole, 2022, p. 714.

FILHO, L. G. A. S. et. al. **Deteção da atividade antibacteriana *in vitro* de compostos naturais à base de plantas**: metodologia científica. Terezina: Embrapa. 2019, p. 14.

FIOCRUZ<sup>a</sup> - Fundação Oswaldo Cruz. **Portal da Doença de Chagas: Tratamento**. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/> Acesso em: 31 Ago. 2023.

FIOCRUZ<sup>b</sup> - Fundação Oswaldo Cruz. **Portal da Doença de Chagas: Doença**. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/doenca/> Acesso em: 04 Ago. 2022.

FIOCRUZ<sup>c</sup> - Fundação Oswaldo Cruz. **Portal da Doença de Chagas: Ciclo Evolutivo**. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/> Acesso em: 07 Ago. 2022.

FIOCRUZ<sup>d</sup> - Fundação Oswaldo Cruz. **Portal da Doença de Chagas: Patologia Geral**. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/patologia/> Acesso em: 21 Ago. 2022

FOKAM TAGNE, M. A. et. al. Effects of *Oxalis barrelieri* L. (Oxalidaceae) aqueous extract on diarrhea induced by *Shigella dysenteriae* type 1 in rats. **Health Science Reports**. v. 1, 2018.

FREITAS, A.C.O. **Análise bioguiada da atividade anti-*Leishmania* e anti-*Candida* de extratos totais e fracionados de fungos endofíticos isolados de plantas de mangue da Ilha de Santa Catarina**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. 97 p.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**. v. 112, p. 231-240, 2008.

GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet**. v. 400, p. 2221-48, 2022.

GHAH, I.; GHAH, S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. **Infection And Drug Resistance**. v. 11, p.523-530, 2018.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Paraná: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, p. 289.

GARCIA-RUBIO, R. et al. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2020.

GUO, W. et al. Sorbicillamines A–E, Nitrogen-Containing Sorbicillinoids from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23–2. **Journal of Natural Products**. v. 76, p. 2106–2112, 2013.

GOZARI, M. et al. Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 27, 2021.

GUZMÁN-CHÁVEZ, F. et al. Mechanism and regulation of sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. **Microbial Biotechnology**. v. 10, p. 958-968, 2017.

HAMILTON, C. J. et al. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **Biochem. J.**, v. 369, p. 529-537, 2003.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 3 ed. London: Chapman & Hall. 1998. p. 302.

HARNED, A. M.; VOLP, K. A. The sorbicillinoid family of natural products: Isolation, biosynthesis, and synthetic studies. **Natural Product Reports**. v. 28, p. 1775-1870, 2011.

HILDEBET, W. BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed.: Springer, 2009, p. 384.

HOU, X. et al. Recent Advances in Sorbicillinoids from Fungi and Their Bioactivities (Covering 2016–2021). **Journal of Fungi**. v. 8, p. 1-19, 2022.

ICC – Instituto Carlos Chagas. Laboratórios de pesquisa. Disponível em: <https://www.icc.fiocruz.br/?portfolio=laboratorio-2> Acesso em: 05 Set. 2023.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Atlas dos Manguezais do Brasil**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018, p. 178.

II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. ASPECTOS GENERALES DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, CON ESPECIAL ATENCIÓN A BRASIL. **Epidemiol. Serv. Saude**, v. 27, p. 1-81, 2015.

JOEL, E. L.; BHIMBA, B. V. Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 49, p. 189-194, 2013.

KAHLERT, L. et al. Diels–Alder Reactions During the Biosynthesis of Sorbicillinoids. **Angewandte Chemie International**. v. 59, p. 5409-5850, 2020.

KAMAT, S. et al. Chapter 10 - Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. **Microbial Biomolecules**. p. 181-209, 2023.

KONTANI, M. et al. Inhibitors of  $\beta$ -glucan biosynthesis in fungal metabolites. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**. v. 30, 103, 1990.

KOYAMA, N. et al. Fungal Isobisvertinol, a New Inhibitor of Lipid Droplet Accumulation in Mouse Macrophages. **Organic Letters**. v. 9, p. 381-545, 2007.

LAMPIT – BAYER. **Important Safety Information**. Disponível em: <https://www.lampit.com/> Acesso em: 07 Ago. 2022.

LENZI, J. et al. Antiprotozoal Activity of Mycelial Extracts of Several Medicinal Agaricomycetes Mushrooms against *Giardia duodenalis*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. p. 37-46, 2022.

LI, C. et al. Constitutive hyperproduction of sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. **Biotechnology for Biofuels**. v. 11, p. 16, 2018.

LI, D. et al. Three new sorbicillin trimers, trisorbicillinones B, C, and D, from a deep ocean sediment derived fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. **Tetrahedron**. v. 66, p. 5101-5106, 2010.

LI, J. et al. Anthraquinone derivatives from a coral associated fungus *Stemphylium lycopersici*. **Natural Product Research**. v. 34, p. 2116-2123, 2020.

LIN, D. et al. Cytotoxic Sorbicillinoids and Bisorbicillinoids from a Marine-Derived Fungus *Trichoderma* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**.v. 57, p. 220-223, 2008.

LIU, S. et al. New Sorbicillinoids with Tea Pathogenic Fungus Inhibitory Effect from Marine-Derived Fungus *Hypocrea jecorina* H8. **Marine drugs**. v. 20, p. 12, 2022.

LIU, Z. et al. (+)- and (–)-Ascomlactone A: a pair of novel dimeric polyketides from a mangrove endophytic fungus *Ascomycota* sp. SK2YWS-L. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 15, p.10276-10280, 2017.

MACHADO, M. G. M. et al. **Farmacotécnica e Tecnologia de Medicamentos Líquidos e Semissólidos**. Porto Alegre: SAGAH, 2021, p. 294.

MAGALHÃES, L. M. D. et. al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. **The Lancet Microbe**. Published online: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2). p. 12, 2022.

MAHMUD, N. S. M. et. al. Cytotoxicity, antioxidant, antimicrobial studies and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Justicia gendarussa*. **Annals of Agricultural Sciences**. v. 65, p. 225-232, 2020.

MALICKA, M. et al. Plant association with dark septate endophytes: When the going gets tough (and stressful), the tough fungi get going. **Chemosphere**. v. 302, p. 1-8, 2022.

MASANORI, K. et al. First  $\beta$ -1,6-glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute stereochemistry. **Tetrahedron Letters**. v. 35, p. 2577-80, 1994.

MAZLAN, N. W. et. al. Metabolomics-Guided Isolation of Anti-Trypanosomal Compounds from Endophytic Fungi of the Mangrove plant *Avicennia lanata*. **Curr. Med. Chem**. v. 27, p. 1815-1835, 2019.

MEDINA, R. at al. The secondary metabolites profile of *Stemphylium lycopersici*, the causal agent of tomato grey leaf spot, is complex and includes host and non-host specific toxins2020 **Australasian Plant Pathology**. v. 50, p. 105–115, 2021.

MELO, G. D. et. al. Prodrugs as new therapies against Chagas disease: in vivo synergy between *Trypanosoma cruzi* proline racemase inhibitors and benzimidazole. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 28, p. 84-89, 2022.

MENG, J. et al. Sorbicillinoids from fungi and their bioactivities. **Molecules**. v. 22, p. 1-19, 2016.

MENG, J. et al. Sorbicillinoids from the fungus *Ustilaginoidea virens* and their phytotoxic, cytotoxic, and antimicrobial activities. **Frontiers in Chemistry**. v. 7, p. 15, 2019.

MONTEIRO, S. C. **Farmacobotânica**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 154.

MORAES, E. C. F.; SZNELWAR, R. B.; FERNICOLA, N. A. G. G. **Manual de Toxicologia Analítica**. São Paulo: Rocca, 2005.

MOHAMED, H. et al. Deep learning strategies for active secondary metabolites biosynthesis from fungi: Harnessing artificial manipulation and application.

**Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 38, 2021.

MOUSSA, M. et al. Tetrahydroanthraquinone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*. **Tetrahedron Letters**. v. 57, p. 4074-4078, 2016.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**: document M26-A Pennsylvania: NCCLS, 1999, p. 32.

NGO, M. T. et al. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Sorbicillinoids Produced by *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of fungi**. v. 7, p. 348, 2021.

NOGUEIRA, A. V.; FILHO, G. N. S. **Microbiologia**. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2015, p. 211.

NOGUEIRA, H. S. et al. ANTIBACTERIANOS: PRINCIPAIS CLASSES, MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA. **UNIMONTES CIENTÍFICA**. v. 12, p. 96-108, 2016.

OBSERVA - Observatório de Áreas Protegidas nos Estudos Acadêmicos. **Parque Municipal do Manguezal do Itacorubi**. 2018. Disponível em: <https://observa.ufsc.br/2018/04/24/parque-municipal-do-manguezal-do-itacorubi/>. Acesso em: 25 de abr. 2022.

OLIVEIRA, J.; REYGAERT, W. C. **Gram-Negative Bacteria**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>. Acesso em: 21 Jun 2023.

OLIVEIRA, V. G. **Processos Biotecnológicos Industriais** - Produção de Bens de Consumo com o uso de Fungos e Bactérias. 1 ed. São Paulo: Érica, 2015, p. 120.

OMURA, S. **Macrolide Antibiotics**: Chemistry, Biology, and Practice. 2 ed. London: Academic Press, 2002, p. 635.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. **Doenças tropicais negligenciadas: OPAS pede fim dos atrasos no tratamento nas Américas**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/28-1-2022-doencas-tropicais-negligenciadas-opas-pede-fim-dos-atrasos-no-tratamento-nas> Acesso em: 14 jul. 2022.

OPAS/OMS - Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. **Resistência antimicrobiana**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 23 Ago. 2022.

ORFALI, R. et al. Cytotoxic secondary metabolites from mangrove-rhizosphere-associated fungus *Emericella* sp. strain SWR1718. **Journal of King Saud University – Science**, v. 32, p. 2656-2661, 2020.

OVERGAARD, M. L. et al. Quick guide to secondary metabolites from *Apiospora* and *Arthrinium*. **Fungal Biology Reviews**. v. 43, p. 14, 2023.

PANDEY, S. et al. Plant probiotics – Endophytes pivotal to plant health. **Microbiological Research**. v. 263, p. 1-16, 2022.

PANG, X. et al. Structurally various sorbicillinoids from the deep-sea sediment derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO06871. **Bioorganic Chemistry**. v. 107, p. 11, 2021.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning. 2 ed. 2016, p. 734.

PARDO, S. N. F. et. al. Assessment of the biotechnological potential of endophytic fungi. **Brazilian Journal of Development**. v. 8, n. 5, p. 33120-33140, 2022.

PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**. 4. ed. Campinas: Millennium, 2013. 515 p. 143.

PAVANELLI, L. C. **Química orgânica funções e isometria**. 1 ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2014.

PEIRÓ, D. F. et.al. **Manguezais: estrutura, dinâmica e biodiversidade**. Bióicos Biologia Marinha. Disponível em: <https://www.bioicos.org.br/post/manguezais-estrutura-dinamica-e-biodiversidade>. Acesso em: 20 de jun. 2022.

PELÁEZ, F. et. al. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycol. Res**. v. 102, p. 755-761, 1998.

PEREIRA, S. C. L. et. al. Resistência a antibióticos e presença de plasmídeos em enterobactérias e *Staphylococcus aureus* isoladas do setor de dietética de um hospital público. **O Mundo da Saúde**. v. 39, p. 147-156, 2015.

PERERA, D. S. Extracellular extracts of antagonistic fungi, *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma viride*, as larvicides against dengue vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Acta Tropica**. v. 238, p. 1-4, 2023.

PEREZ-MOLINA, et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease Tratamiento tripanocida de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica** (English ed.). v. 39, p. 458-470, 2021.

PMF<sup>a</sup> – Prefeitura Municipal de Florianópolis. **Unidades de Conservação em Florianópolis**. Disponível em: Acesso em: <http://www.pmf.sc.gov.br/entidades/floram/index.php?cms=unidades+de+conservacao+em+florianopolis&menu=7&submenuid=800>. Acesso em: 26 de abr. 2022.

PMF<sup>b</sup> – Prefeitura Municipal de Florianópolis. **Parque Municipal do Manguezal do Itacorubi: 17 Anos**. 2019. Disponível em:

[http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/imagens/18\\_12\\_2019\\_19\\_08\\_d5e2c49d0c9755e746ed3af7f4e9266c.jpg](http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/imagens/18_12_2019_19_08_d5e2c49d0c9755e746ed3af7f4e9266c.jpg). Acesso em: 25 de abr. 2022.

RAI, S.; PRASAD, R. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Trichoderma* for Biotechnological Applications: Current Insights and Future Prospects**. Elsevier, 2023, p. 1-28.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Editora Blucher, 2015, p. 622.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Guanabara Koogan, 2008, p. 3015.

RODRÍGUEZ-CORRALES, A. J.; JOSAN, S. J. Resazurin Live Cell Assay: Setup and Fine-Tuning for Reliable Cytotoxicity Results. **Proteomics for Drug Discovery**. p. 207–219, 2017.

ROMANHA, A. J. et. al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 105(2), p. 233–238, 2010.

RUPPÉ, É. et. al. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**. v. 5, 2015.

ROSA, L. H. **Neotropical Endophytic Fungi: Diversity, Ecology, and Biotechnological Applications**. Minas Gerais: Springer, 2021, p. 395.

SBMT – Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **OMS lança novo roteiro 2021-2030 para as Doenças Tropicais Negligenciadas**. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/oms-lanca-novo-roteiro-2021-2030-para-as-doencas-tropicais-negligenciadas/> Acesso em: 15 Jul. 2022.

SCHMIDELL, W. et. al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. V. 2. São Paulo: Blucher. 2001. p. 560.

SEBAK, M. et al. Chemical diversity, medicinal potentialities, biosynthesis, and pharmacokinetics of anthraquinones and their congeners derived from marine fungi: a comprehensive update. **Royal Society of Chemistry**. v. 12, p. 24887–24921, 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 International Chemie**. v. 57, p. 14650 –14653, 2018.

SILVA, R. S. F. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018, p. 408.

SIMÕES, C. M O. et al. **Farmacognosia**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 464.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020, p. 688.

SOUZA, C. C. et al. Silver and copper-benzimidazole derivatives as potential antiparasitic metallodrugs: Synthesis, characterization, and biological evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 239. p. 112047, 2023.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 60, p. 25-32, 2008.

STRICKER, et al. Risk assessment of secondary metabolites produced by fungi in the genus *Stemphylium*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 67, p. 445-450, 2021.

SUGAYA, K. et al. Bisorbicillinol inhibits Lyn tyrosine kinase for allergic response on RBL-2H3 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 29, 832-835, 2019.

SUGUMARAN, A. et al. Marine biome-derived secondary metabolites, a class of promising antineoplastic agents: A systematic review on their classification, mechanism of action and future perspectives. **Science of The Total Environment**. v. 836, 2022.

TAKAHASHI, A. J. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual Química**. v. 9, p. 2351-2382, 2017.

TBCA - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2023. Acesso em: 07 de mar. 2023. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

TRIFONOV, L. S. et al. Bisvertinols: a new group of dimeric vertinoids from. **Tetrahedron**. v. 42, p. 3157-3179, 1986.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 940.

USP – Universidade de São Paulo. **Ecologia: O Ecossistema Manguezal**. Disponível em:

[http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=70&Itemid=409#:~:text=LOCALIZA%C3%87%C3%83O%20DOS%20MANGUEZAIS%20NO%20BRASIL&text=No%20Brasil%2C%20existem%20cerca%20de,Santa%20Catarina%2C%20no%20litoral%20brasileiro](http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=70&Itemid=409#:~:text=LOCALIZA%C3%87%C3%83O%20DOS%20MANGUEZAIS%20NO%20BRASIL&text=No%20Brasil%2C%20existem%20cerca%20de,Santa%20Catarina%2C%20no%20litoral%20brasileiro). Acesso em: 13 Ago. 2022.

VIEGAS, C. J. et. al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, 326-337, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed. 2013, p. 1484.

VOGEL, H. G. **Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays**. New York: Springer. 3 ed. 2008, p. 2071.

WCG<sup>a</sup> – CenterWatch. **Benznidazole Tablets**. Disponível em: [https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/3226-benznidazole-tablets#:~:text=Mechanism%20of%20Action,\(NTR\)%20enzyme%20of%20T](https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/3226-benznidazole-tablets#:~:text=Mechanism%20of%20Action,(NTR)%20enzyme%20of%20T). Acesso em: 11 Ago. 2022.

WCG<sup>b</sup> – CenterWatch. **Lampit (nifurtimox)**. Disponível em: <https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/4643-lampit-nifurtimox> Acesso em: 11 Ago. 2022.

WEF – World Economic Forum. **Health and healthcare: How we can win the war against antibiotic resistance**. Disponível em: <https://www.weforum.org/agenda/2019/01/how-to-win-the-war-against-antibiotic-resistant-bacteria/> Acesso em: 23 Ago. 2022.

WHO – World Health Organization. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) Acesso em: 11 Ago. 2022.

WOUDENBERG, J.H.C. et al. *Stemphylium* revisited. **Studies in Mycology**. v. 87, p. 77–103, 2017.

WWF - World Wildlife Fund. **Mangue**. 2022. Disponível em: [https://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/reducao\\_de\\_impactos2/programa\\_marinho/mangues/#:~:text=Mangue%20ou%20mangal%20%C3%A9%20uma,ra%C3%ADzes%20expostas%20e%20solo%20lamenta](https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/reducao_de_impactos2/programa_marinho/mangues/#:~:text=Mangue%20ou%20mangal%20%C3%A9%20uma,ra%C3%ADzes%20expostas%20e%20solo%20lamenta). Acesso em: 26 abr. 2022.

XUE-MING, Z. et al. Bioactive Anthraquinone Derivatives from the Mangrove-Derived Fungus *Stemphylium* sp. 33231. **Journal of Natural Products**. v. 77, p. 2021 – 2028, 2014.

YANG, Z. et al. Novel Type of Water-Soluble Photosensitizer from *Trichoderma reesei* for Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Bacteria. **Langmuir**. v. 36, p. 13125-13370, 2020.

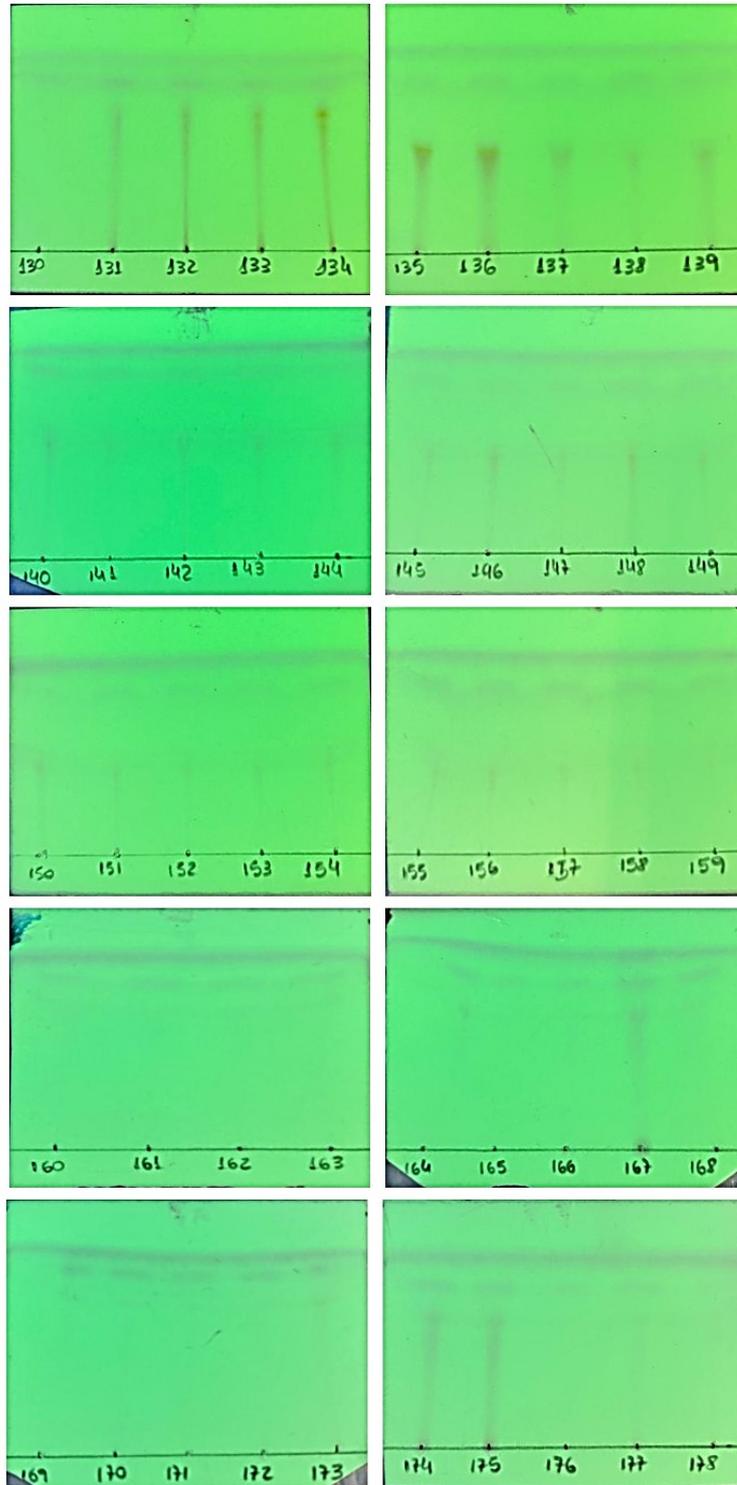
YILMAZ, C.; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**. v. 133, p. 43-62, 2017.

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

ZHAO, Z. et al. Five polyketides isolated from the marine-derived fungus *Arthrinium* sp. **Natural Product Research**. v. 35, p. 2470–2475, 2021.

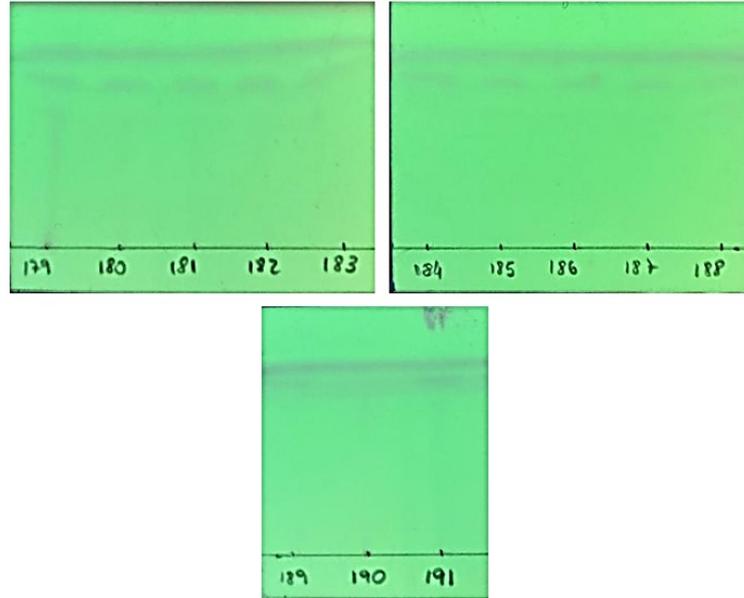
**APÊNDICE A - CCD sob luz UV 254 nm com sistema de eluição DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

(continua)



**APÊNDICE A - CCD sob luz UV 254 nm com sistema de eluição DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

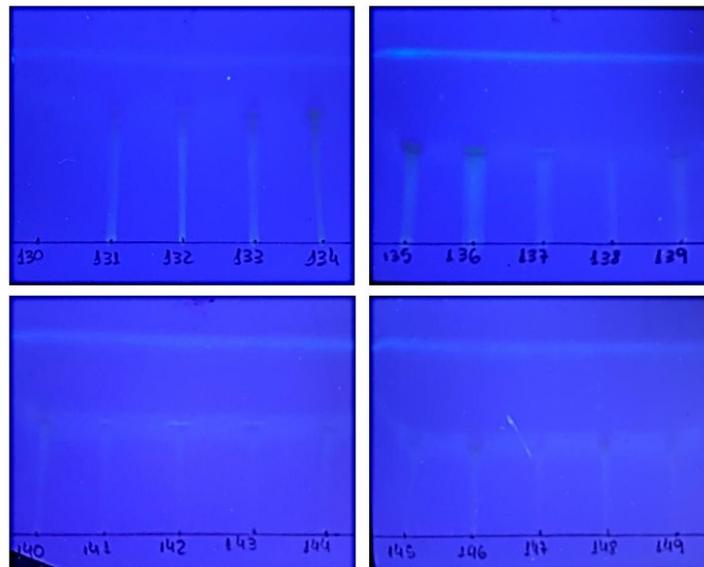
(conclusão)



Fonte: Elaborado pela autora.

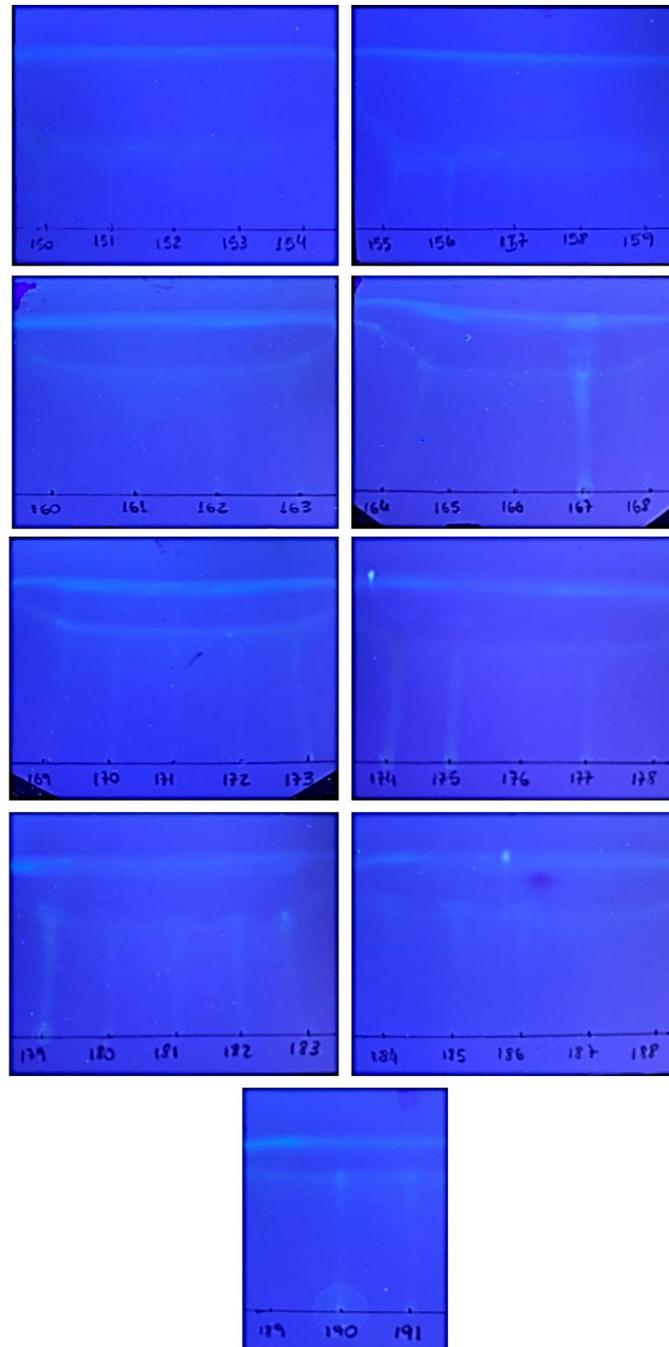
**APÊNDICE B - CCD sob luz UV 365 nm com sistema de eluição DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

(continua)



**APÊNDICE B - CCD sob luz UV 365 nm com sistema de eluição DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

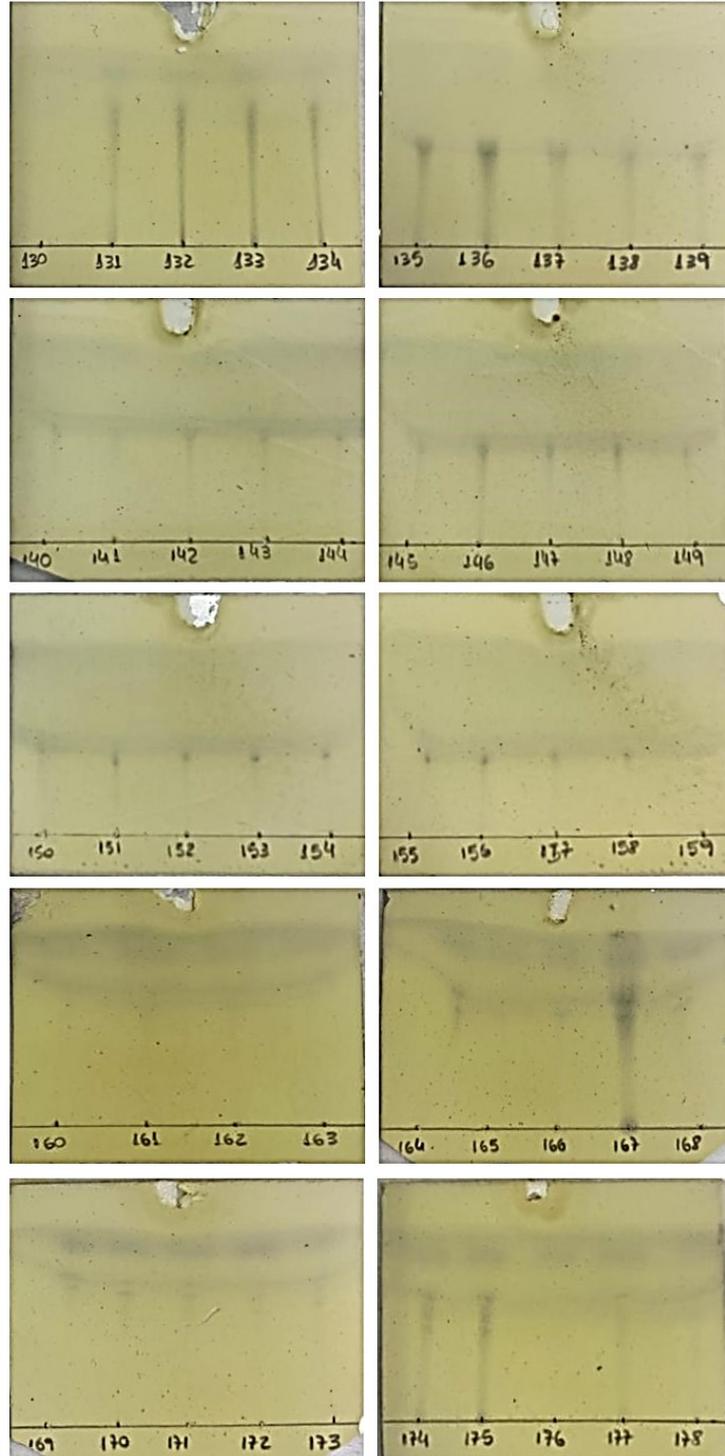
(conclusão)



Fonte: Elaborado pela autora.

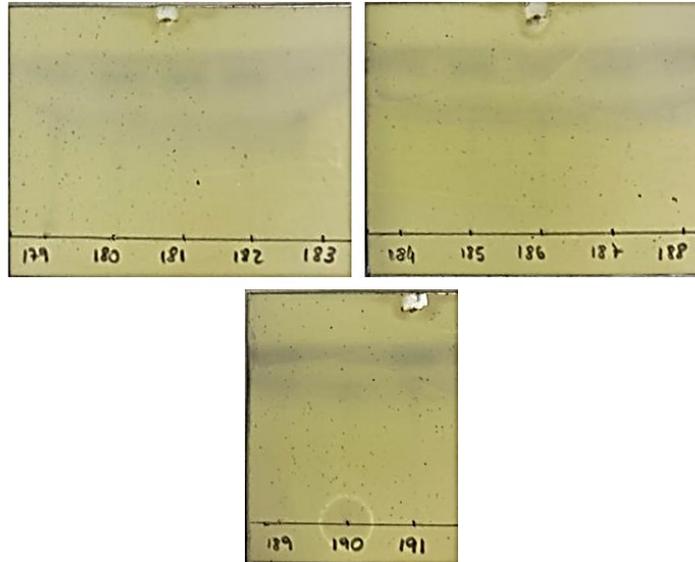
**APÊNDICE C - CCD com revelador vanilina sulfúrica no sistema de eluição  
DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a  
partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

(continua)



**APÊNDICE C - CCD com revelador vanilina sulfúrica no sistema de eluição  
DCM 90: 10 MeOH das sub frações com precipitado obtidas em coluna C18, a  
partir da fração HEX 40:70 AcOEt.**

(conclusão)



Fonte: Elaborado pela autora.