

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/01/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

**Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de
origem marinha: uma abordagem química e biológica**

ARARAQUARA

2017

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

**Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de
origem marinha: uma abordagem química e biológica**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia A. S. Graminha

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C626L Clementino, Leandro da Costa
Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de
origem marinha: uma abordagem química e biológica /
Leandro da Costa Clementino. – Araraquara : [s.n.], 2017
113 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Marcia Aparecida Silva Graminha

1. Alga marinha. 2. Fungos endofíticos. 3. Leishmania.
4. Doenças negligenciadas. 5. Antártida. I. Título.

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

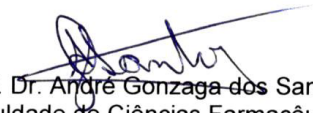
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Araraquara, 21 de julho de 2017.

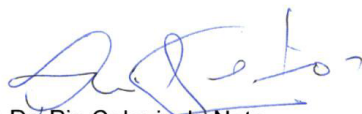
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Marcia Aparecida Silva Graminha (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
Instituto de Química / USP / São Paulo - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Leandro da Costa Clementino

Filiação: Maria de Lourdes da Costa Clementino e Severino Alves Clementino

Nascimento: 20/03/1992 - Campina Grande - PB

Endereço Profissional:

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip), Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP.

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campus Ville, S/N, Araraquara SP.

CEP: 14800-903

email: leandrocosta@iq.unesp.br

Formação Acadêmica:

2009 - 2014

Graduação: Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Instituição: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Sumé - PB.

2015 - 2017

Mestrado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Dissertação: Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de origem marinha: uma abordagem química e biológica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Graminha.

Bolsa: CAPES

Produção bibliográfica:

Trabalhos publicados no período

Co-autor no capítulo de Livro: Busca por fármacos para doenças negligenciadas, com ênfase em doença de Chagas e leishmanioses utilizando a biodiversidade algal.

In: Lourdes Campaner dos Santos, Maysa Furlan, Marcelo Rodrigues de Amorim. (Org.). Produtos Naturais Bioativos. 1^a ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, v.1, p. 143-196.

Trabalhos publicados em eventos

Leishmanicidal Activity of Extracts And Fractions of Antarctic Brown Algae. Trabalho apresentado durante a 46ª Reunião Anual da SBBq, no período de 27 a 30 de julho de 2017, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração

- a) 2nd Workshop on Drug Design and Neglected Tropical Diseases. Instituto de Física de São Carlos - USP. 2015.
- b) Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - CG - Preparação de Amostra. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, 2015.
- c) Treinamento *Thomson Reuters IP&S*, e *SciFinder* com carga horária de 2 horas cada, e *Base de dados Elsevier* com carga horária de 3 horas. Todos os treinamentos foram realizados no Instituto de Química-UNESP em Araraquara-SP, 2015.
- d) Fundamentos de Cromatografia Líquida aplicados a Indústria Farmacêutica, 16-17 de Abril e 14-15 de Maio, Associação Farmacêutica de Araraquara – AFAR, Araraquara, 2016.
- e) 46th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, July 27th to 30 th, 2017. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

Outras atividades acadêmicas relevantes

- a) Treinamento Pré-Antártico, carga horária: 168h. Comissão Interministerial para Recursos do Mar, CIRM, Rio de Janeiro, 2015.
- b) Coleta de macroalgas durante a Operação Antártica XXXV, Novembro-Dezembro 2016, à bordo do Navio Polar Almirante Maximiano, nas Ilhas Shetlands do Sul e Península Antártica, totalizando 43 dias de mar.

Dedicatória

Aos meus pais, Maria de Lourdes Clementino e Severino Clementino (*in memoriam*) que sempre foram minha fonte de inspiração, perseverança, aconchego e carinho;

Aos meus amados irmãos, Lourildo, Luciene, Luciano, Maria Luciana, Nazareno, Hélio e Maria Aparecia (Cida), por todo o carinho e incentivo que sempre depositaram em mim.

Dedico-lhes esta dissertação como forma de agradecimento e carinho por se fazerem sempre presentes em minha vida, apesar da distância, assim como apoiar as minhas decisões, por mais difíceis que sejam. Amo vocês, esta vitória é nossa!

*“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho
que se sonha junto é realidade.”*

Raul Seixas

*“É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu. É sobre ser
abrigo e também ter morada em outros corações.”*

Ana Vilela

Agradecimentos

À Deus por tudo que foi conduzido ao meu favor, por trilhar os melhores caminhos, regados de muito aprendizado e pessoas excepcionais, e por me fazer superar todas as dificuldades impostas durante esta jornada;

À minha família, tios, primos e avós (*in memoriam*) por sempre me apoiarem e estarem sempre ao meu lado, obrigado por serem meu alicerce, sem vocês tudo seria mais difícil;

À Professora Dr^a Marcia Graminha por ter confiado em mim desde o dia da prova de seleção para o mestrado. Agradeço por todo o investimento, pessoal e profissional, pelo incentivo, dedicação, paciência e pela convivência intensa nestes dois anos. Cresci muito. Sou grato por tudo que me proporcionou neste período e também por ter me escolhido para fazer parte de um projeto tão importante como o das macroalgas antárticas. Foi uma experiência única e espetacular que guardarei com muito carinho;

Ao Professor Dr^o Pio Colepícolo por todo o apoio prestado na execução deste projeto, pela oportunidade de ter ido a Antártica realizar coletas e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso;

Ao Professor Dr^o André Gonzaga pela colaboração e por sempre estar com as portas do seu laboratório abertas para os experimentos necessários com as algas. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e companheirismo durante este trabalho;

À Professora Dr^a Hosana Debonsi pela colaboração e pela amizade que começou no TPA e se estendeu após isso. Obrigado por sempre estar disposta a ajudar e por todo o trabalho realizado com os fungos endofíticos das algas antárticas;

À Professora Dr^a Marcia V. Kress e sua equipe pela colaboração na identificação do fungo endofítico;

Aos técnicos de Laboratório: Caio Perego, pelo auxílio com os extratos algais; Daniela Luz, pelo auxílio com o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos; Leonardo Vilela, pelo auxílio com os Espectros de Massa e processamento dos dados. Vocês foram fundamentais para a execução deste trabalho;

Aos alunos do Laboratório de Farmacognosia da FCF-UNESP, em especial Fernando Oda, por ter auxiliado em todo o desenvolvimento do trabalho, pelas análises de RMN e pela contribuição na discussão deste trabalho. Aos alunos do

Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho da FCFRP-USP, em especial o Gabriel Pavão, pelo auxílio com os extratos; Verônica Rego pelo auxílio com os extratos e fracionamento; Renata Spagolla pelo auxílio com o sub-fracionamento e Thaiz Rodriguez pelo auxílio da identificação do fungo. Além disso, sou grato pela amizade que fica, pelas conversas e o bom convívio na corrida vida da pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP, Amanda, Letícia, Thais, Angela, Mayara, Jessica, Kely, Túlio, Alex e Rhyanne por todo o apoio, momentos de descontração e convívio;

Aos colegas de TPA, as “Bias”, Hosana, Amanda, Renata, Marina, Paulo, e todos dos GB's, assim como os demais pesquisadores que tive a honra de conhecer e desfrutar de uma semana intensa, porém prazerosa e muito divertida;

Ao PROANTAR e Marinha do Brasil, por executarem este trabalho árduo no continente gelado, aos integrantes do GB Poseidon e Endurance, e à equipe da Missão XXXV, toda a Tripulação do NPo Almirante Maximiano “Tio Max” e do projeto Macroalgas, Prof^a Dr^a Franciane Pellizari, Amanda Porrua, Rafalle Frassini e Yoshimi Nagatani, obrigado pelo convívio, pelos dias de trabalho e por todo o companheirismo;

Aos integrantes do Projeto “Biodiversidade, monitoramento, estratégias de sobrevivência e prospecção de macroalgas extremófilas da Antártica marítima pelo material coletado em missões anteriores que foi cedido para os experimentos;

Aos amigos do “G11” que sempre estiveram comigo, desde a graduação, sempre apoiando e incentivando. À minha “Família de 3”, Ju e Rayza por sempre se fazerem presente, independente da distância, nossa amizade não acaba, pelo contrário só fortalece!;

Aos amigos que conheci em São Carlos, Thiago, José Roberto, Kaio, Camila e Alice que foram e são muito importantes, fazendo momentos difíceis tornarem-se mais leves;

Às amigas que se estenderam além do laboratório Letícia, Amanda, Thais, Mayara, Aline e Bel, obrigado por todos os momentos bons que vivemos, e pelos momentos difíceis que superamos juntos; vocês moram no meu coração!;

Às duas Nordestinas que me acompanham de perto, Rayza e Rhayanne, obrigado por estarem sempre comigo, me encorajar e falar a verdade sempre que preciso, por serem minha família longe de casa, amo vocês!;

À Rayza Morganna que é mais que uma companheira de curso, tornou-se uma companheira de vida, passamos por muita coisa juntos e espero que continuemos com essa sintonia em bons e maus momentos sempre contando um com o outro, obrigado por tudo morena!;

Ao amigo Pedro Ornela que tive a felicidade de conhecer no dia da seleção do Mestrado, desde então foram dois anos de parceria, regados com momentos de alegria, tristeza e estresse, mas com muito bom humor e apoio mútuo. Obrigado por tudo gurí, tamo junto sempre!;

Às meninas da faxina e da portaria do DAC, em especial, Rose, Fátima e Andrea, por sempre nos receber com um sorriso no rosto e uma boa conversa para começar bem o dia;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, assim como, aos funcionários deste Instituto e da STPG;

À CAPES, pela bolsa concedida, CNPQ, MCT-Proantar e FAPESP pelo auxílio financeiro;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As leishmanioses acometem mais de 12 milhões de pessoas no mundo, principalmente em países da América Latina, sobretudo populações com acesso precário à infraestrutura. A terapêutica atual empregada para estas doenças dispõe de poucas opções e com elevada toxicidade, portanto, torna-se necessária a busca por novos fármacos antileishmaniais, sendo as fontes naturais uma fonte inesgotável de metabólitos bioativos. Neste sentido, este projeto buscou substâncias presentes em macroalgas e fungos endofíticos associados provenientes do continente Antártico que possuam atividade leishmanicida. Coletas algais foram realizadas durante o verão austral na missão XXXIII pelo Proantar, sendo obtidos extratos e fungos endofíticos associados às algas *Ascoseira mirabilis* e *Cystosphaera jacquinotii*. Os extratos hexânicos e etanólicos das algas apresentaram atividade leishmanicida, sendo os extratos hexânicos de ambas, escolhidos para fracionamento e caracterização química. O fracionamento levou a quatro frações, as quais apresentaram atividade igual ou superior à observada no extrato. As frações F3 e F6 do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* foram analisadas por CLAE-EM, CLAE-DAD e RMN de ^1H e, posteriormente, sub-fracionadas. Verificamos a presença do diisobutiltalato como constituinte majoritário destas frações, sendo que a presença desta substância também foi observada na subfração AmF6.2, obtida a partir de F6, podendo ser esta responsável pela atividade leishmanicida observada. Foram isolados cinco fungos endofíticos, sendo dois associados à alga *A. mirabilis* e três, à alga *C. jacquinotii*. Estes microrganismos foram cultivados em meio sólido e seus extratos testados quanto à atividade leishmanicida. Um dos extratos apresentou bioatividade, sendo então, fracionado. As frações F5 e F6 que ainda apresentavam atividade, foram sub-fracionadas, sendo identificada a subfração FeF6.2 com a atividade antiparasitária. O fungo produtor de metabólitos bioativos leishmanicida AmpdbaMI2 foi identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, tratando-se do primeiro registro deste fungo associado à macroalga *A. mirabilis*.

Palavras chave: *Ascoseira mirabilis*. *Cystosphaera jacquinotii*. Fungos endofíticos. *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Leishmaniasis affects more than 12 million people worldwide mainly in countries of Latin America, especially in populations with precarious access to health and infrastructure. The current therapy for these diseases has few drug options, which present several drawbacks including high toxicity; thus, is mandatory the search for new antileishmanial drugs. For this, natural sources are promising due to their great diversity and huge number of potential bioactive metabolites. Therefore, this project aimed to identify antileishmanial substances present in antarctic macroalgae and their associated endophytic fungi. The algae here analysed were collected during the austral summer at Proantar mission XXXIII. Extracts from the species *Ascoseira mirabilis* and *Cystosphaera jacquinotii* were obtained as well as from their endophytic fungi. The hexanic and ethanolic extracts from the algae showed leishmanicidal activity. We have chosen the hexanic fraction to start further characterization of the analysed bioactive extracts. Fractionation of hexanic extract led to four fractions that presented superior or equal activity when compared to that observed in the extract. The most active fractions of *A. mirabilis*, F3 and F6, were analyzed by HPLC-MS, HPLC-DAD and ^1H NMR and then sub-fractionated. We observed the presence of diisobutyl phthalate as their major constituent, as well as in the sub-fraction AmF6.2 obtained from F6, which might be related to the observed leishmanicidal activity. Two endophytic fungi were obtained from *A. mirabilis* and three, from *C. jacquinotii*. The endophytic fungi were grown in solid medium and their extracts tested for leishmanicidal activity. Only one extract obtained from the fungi AmpdbaMI2 showed bioactivity and its fractions F5 and F6 and subfraction FeF6 kept its bioactivity. The fungus responsible for the antiparasitic activity was molecularly identified as belonging to the genus *Aspergillus*, which is the first record of this fungus associated to the macroalgae *A. mirabilis*.

Key words: *Ascoseira mirabilis*. *Cystosphaera jacquinotii*. Endophytic fungi. *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea e visceral no mundo.	19
Figura 2 - Número de casos confirmados da leishmaniose cutânea no Brasil entre os anos 2010 e 2015.....	20
Figura 3 - Número de casos confirmados da leishmaniose visceral no Brasil entre os anos 2010 e 2015.....	21
Figura 4 - Número de casos confirmados de co-morbidade LV e AIDs no Brasil entre os anos de 2009 e 2015.	22
Figura 5 - Manifestações clínicas das leishmanioses em humanos.	24
Figura 6 - Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> no inseto (flebotomíneo) e no hospedeiro vertebrado.	25
Figura 7 - Estruturas químicas dos fármacos empregados atualmente no tratamento das leishmanioses.....	27
Figura 8 - Estrutura dos compostos antiparasitários eleganona e 4-acetoxi-dolastano isolados das algas pardas <i>B.bifurcata</i> e <i>C.cerviconis</i>	33
Figura 9 - Macroalgas antárticas <i>Cystosphaera jacquinotii</i> (esquerda) e <i>Ascoseira mirabilis</i> (direita).	37
Figura 10 - Localização geográfica do local de coleta das algas <i>A. mirabilis</i> e <i>C. jacquinotii</i> nas Ilhas Shetlands do Sul, ilha Rei George, baía do Almirantado.	41
Figura 11 - Representação esquemática da extração sequencial de metabólitos das algas <i>A. mirabilis</i> e <i>C. jacquinotii</i> com solventes de polaridade crescente.	43
Figura 12 - Representação esquemática da obtenção de fungos endofíticos de <i>A. mirabilis</i> e <i>C. jacquinotii</i>	45
Figura 13 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular contra formas promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	51
Figura 14 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga <i>A.mirabilis</i> monitorado em $\lambda = 250$ nm.	58
Figura 15 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga <i>C. jacquinotii</i> monitorado em $\lambda = 250$ nm.	59
Figura 16 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga <i>A.mirabilis</i> monitorado em $\lambda = 250$ nm (preto), $\lambda = 280$ nm (vermelho) e $\lambda = 330$ nm (azul).	59
Figura 17 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga <i>C. jacquinotii</i> monitorado em $\lambda = 250$ nm (preto), $\lambda = 280$ nm (vermelho) e $\lambda = 330$ nm (azul).....	60
Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em CDCl_3 a 300 MHz.	60
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da alga <i>C. jacquinotii</i> em CDCl_3 a 300 MHz.	61
Figura 20 - Representação esquemática do fracionamento do extrato hexânico de <i>A. mirabilis</i>	62

Figura 21 - Representação esquemática do fracionamento do extrato hexânico de <i>C. jacquinotii</i>	63
Figura 22 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da fração 3 obtida por fracionamento do extrato hexânico alga <i>A. mirabilis</i> , monitorado em $\lambda = 250$ nm.	65
Figura 23 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da fração 6 obtida por fracionamento do extrato hexânico alga <i>A. mirabilis</i> , monitorado em $\lambda = 250$ nm.	65
Figura 24 - Cromatograma da fração 3, proveniente do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> , obtido por CLAE-EM.	66
Figura 25 - Cromatograma da fração 6, proveniente do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> , obtido por CLAE-EM.	66
Figura 26 - Estrutura química do diisobutilftalato.	67
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H da F3, obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em CDCl_3 a 300 MHz.	68
Figura 28 - Expansão dos sinais de RMN ^1H característicos do diisobutilftalato para a F3.	69
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H da F6, obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em CDCl_3 a 300 MHz.	69
Figura 30 - Expansão dos sinais de RMN ^1H característicos do diisobutilftalato para a F6.	70
Figura 31 - Cromatograma obtido em gradiente exploratório da subfração AmF6.2.	72
Figura 32 - Cromatograma expandido obtido em gradiente exploratório do padrão diisobutilftalato (cor margenta) e subfração AmF6.2 (cor preta).	72
Figura 33 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato diclorometano:metanol do fungo endofítico AmMI2pdaa, isolado da alga <i>A. mirabilis</i> , monitorado em $\lambda = 250$ nm (preto), $\lambda = 280$ nm (vermelho) e $\lambda = 330$ nm (azul).	75
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H do extrato diclorometano:metanol do fungo endofítico AmMI2pdaa isolado da alga <i>A. mirabilis</i> em $\text{DMSO}-d_6$ a 300 MHz.	76
Figura 35 - Representação esquemática do fracionamento e reagrupamento das frações do extrato hexânico do fungo endofítico associado à alga <i>A. mirabilis</i>	77
Figura 36 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da F5 obtida por fracionamento do extrato diclorometano:metanol do fungo endofítico AmMI2pdba, monitorado em $\lambda = 254$ nm.	79
Figura 37. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da F6 obtida por fracionamento do extrato diclorometano:metanol do fungo endofítico AmMI2pdba, monitorado em $\lambda = 254$ nm.	79
Figura 38 - Foto do Isolado AmMI2pdba.	81

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas em humanos.	23
Quadro 2 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, limitações associadas e possíveis mecanismos de ação.	29
Tabela 1 - Massa bruta e rendimentos obtidos para os extratos aquoso, etanólico e hexânico.	54
Tabela 2 - Fungos endofíticos isolados a partir das algas <i>C.jacquinitii</i> e <i>A.mirabilis</i>	55
Tabela 3 - Massa bruta e rendimento finais obtidos, após o cultivo em meio arroz e extração com diclorometano:metanol.	56
Tabela 4 - Atividade biológica dos extratos das algas <i>C. jacquinitii</i> e <i>A. mirabilis</i> frente à formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	57
Tabela 5 - Atividade biológica das Frações obtidas dos extratos hexânicos das algas <i>C. jacquinitii</i> e <i>A. mirabilis</i> , frente à formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	64
Tabela 6 - Dados espectrométricos de RMN de ¹ H referentes ao diisobutilftalato obtidos em metanol- <i>d</i> 4, para a F6 a 300 MHz.	68
Tabela 7 - Atividade biológica das sub-frações obtidas da F6 de <i>A.mirabilis</i> , frente à formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	71
Tabela 8 - Atividade biológica dos extratos diclorometano:metanol dos fungos endofíticos isolados das algas <i>C. jacquinitii</i> (Cj) e <i>A. mirabilis</i> (Am), frente à formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	74
Tabela 9 - Atividade biológica das frações obtidas do extrato do fungo AmMI2pdba isolado da alga <i>A. mirabilis</i> , frente à formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	78
Tabela 10 - Atividade biológica das subfrações obtidas das frações 5 e 6 do fungo endofítico AmMI2pdba, frente à formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos murinos.	80
Tabela 11 - Identificação molecular do fungo endofítico isolado da alga <i>A. mirabilis</i>	82
Tabela 12 - Possíveis compostos obtidos por CLAE-EM para a F3 obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> , encontradas nos bancos de dados HMDB, Metlin, SciFinder, LipdMass, Chebi, Pubchem e Chempider.	108
Tabela 13 - Possíveis compostos obtidos por CLAE-EM para a F6 obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> , encontradas nos bancos de dados HMDB, Metlin, SciFinder, LipdMass, Chebi, Pubchem e Chempider.	109

LISTA DE ABREVIações

Car - Campus de Araraquara
CC₅₀ - Concentração citotóxica que mata ou inibi 50% dos macrófagos
CDC - Center for Disease Control and Prevention
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CI_{50-AMA} - Concentração Inibitória necessária para matar ou inibir 50% de formas amastigotas
CI_{50-PRO} - Concentração Inibitória necessária para matar ou inibir 50% de formas promastigotas
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada
CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
Da - Dalton
DAD- Diode Array
DMSO - Dimetilsufóxido
DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas
HEPES - ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico
HIV - Virus da Imunodeficiência Humana
IS - Índice de Seletividade
LC - Leishmaniose Cutânea
LIT - Liver Infusion Tryptose
LMC - Leishmaniose Mucocutânea
LV - Leishmaniose Visceral
MTT - [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo]
PDA - Potato Dextrose Agar
PMS - Metassulfate Phenazin
PNs - Produtos Naturais
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹H - Ressonância Magnética Núcleo de Hidrogênio
d - Duplete
dd - Duplo duplete
m - Multiplete
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro Fetal Bovino
SINAN - Sistema de Informação de Agravos e Notificação
UV- Ultra violeta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doenças Negligenciadas	18
1.1.1 Leishmanioses	18
1.1.2 Tratamento	25
1.2 Produtos Naturais como fonte de novos compostos antileishmaniais	30
1.2.1 Algas	31
1.2.2 Fungos endofíticos associados à macroalgas	34
1.2.3 Investigação química de PNs	36
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Meios de Cultura	40
3.2 Cultivo de parasitos e células de mamífero	40
3.3 Preparo das amostras	40
3.4 Coleta das algas	41
3.5 Obtenção do extrato algal	42
3.6 Isolamento dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos	43
3.7 Identificação dos fungos endofíticos	46
3.8 Fracionamento dos extratos algais	47
3.9 Fracionamento dos extratos fúngicos	47
3.10 Análise dos extratos e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	48
3.11 Sub-fracionamento dos compostos algais e fúngicos	49
3.12 Análise dos extratos e frações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H	49
3.13 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM).....	49
3.14 Bioensaios para determinação da atividade leishmanicida e citotóxica dos extratos, frações e sub-frações das algas e fungos endofíticos associados	51
3.14.1 Ensaio de avaliação da atividade antipromastigota	51
3.14.2 Ensaio de avaliação da atividade citotóxica contra células de mamíferos	52

3.14.3 Ensaio da atividade anti-mastigota	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Obtenção dos extratos das algas <i>A. mirabilis</i> e <i>C. jacquiniotii</i>	54
4.2 Isolamento de fungos endofíticos e obtenção de seus extratos	55
4.3 Monitoramento bioguiado e fracionamento de extratos algais bioativos para atividade leishmanicida	56
4.3.1 Avaliação da bioatividade dos extratos algais	56
4.3.2 Análise química dos extratos bioativos	57
4.3.3 Fracionamento dos extratos e avaliação de bioatividade	61
4.3.4 Análise química das frações bioativas e sub-fracionamento para avaliação da bioatividade.....	65
4.4 Monitoramento bioguiado e fracionamento dos extratos fúngicos de extratos fúngicos bioativos para atividade leishmanicida.....	74
4.4.1 Avaliação da bioatividade dos extratos fúngicos	74
4.4.2 Análise química dos extratos bioativos	75
4.4.3 Fracionamento dos extratos e avaliação química e da bioatividade	76
4.4.4 Sub-fracionamento e avaliação da bioatividade	80
4.4.5 Identificação dos fungos produtores de metabólitos bioativos	81
5 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	96
ANEXO A.....	96
ANEXO B.....	101
ANEXO C.....	108
ANEXO D.....	111
ANEXO E.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Negligenciadas

As doenças negligenciadas são doenças infecciosas que recebem esse nome por atingir populações com pouco acesso às condições básicas de saúde, bem como pelo pouco interesse do setor farmacêutico para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (MONGUI et al., 2015). São caracterizadas por ocorrerem com frequência maior nos trópicos, sendo muitas vezes denominadas de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (HOTEZ et al., 2007).

Atualmente são classificadas como negligenciadas 17 doenças, dentre estas as leishmanioses que são um importante problema de saúde pública e que serão abordadas neste trabalho (MONGUI et al., 2015; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). Este conjunto de doenças como o próprio nome diz é negligenciado por parte do setor farmacêutico e o tratamento disponível, em alguns casos, é realizado com medicamentos desenvolvidos há décadas, que apresentam toxicidade e efeitos colaterais indesejados, o que dificulta o tratamento; além disso, há baixa eficácia, sendo relatado o surgimento de cepas resistentes as terapias atuais (GARCHITORENA et al., 2017; HOTEZ; AKSOY, 2017). Neste sentido é de extrema importância a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antileishmaniais. Desta forma, este projeto buscou a triagem e caracterização de novas substâncias bioativas para o combate das leishmanioses, mais precisamente contra a forma cutânea causada pela espécie *Leishmania amazonensis*, a partir de extratos, frações e substâncias isoladas de macroalgas e fungos endofíticos associados provenientes do continente Antártico.

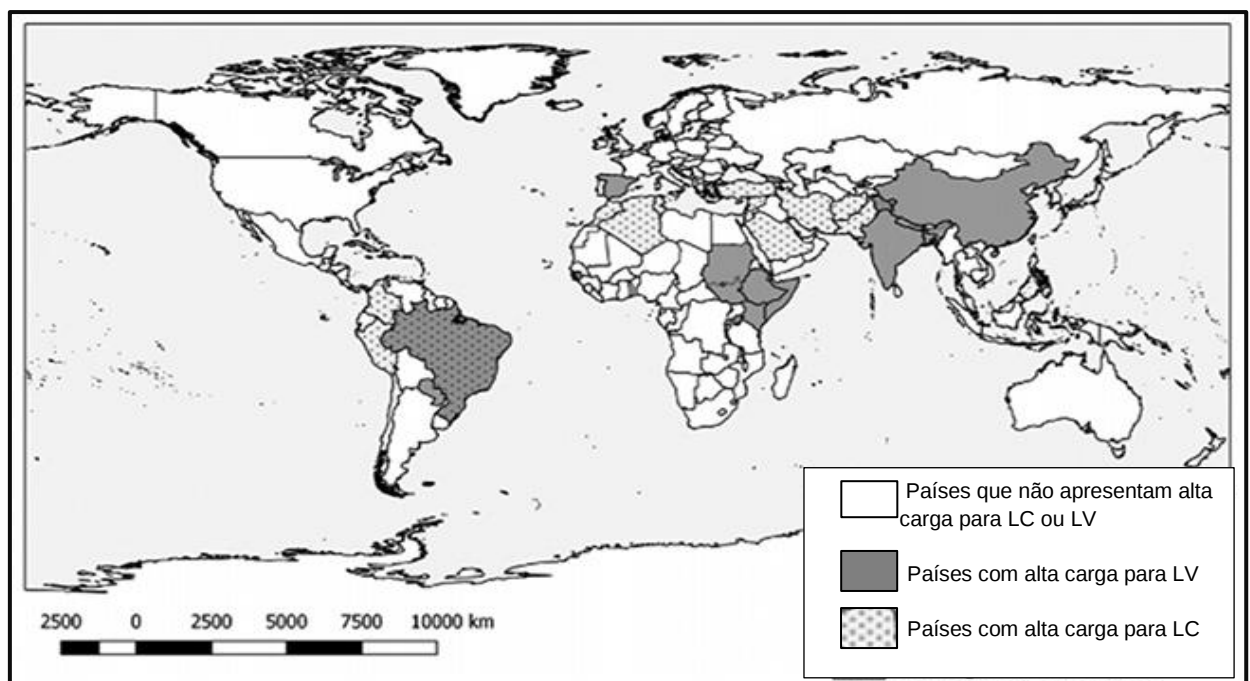
1.1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida do gênero *Leishmania*, transmitidas pelas fêmeas de insetos flebotomíneos (ALMEIDA, et al., 2003; WHO, 2015). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, o *Leishmania* e *Viannia*, ambos desenvolvem-se no intestino do inseto vetor enquanto

na forma promastigota, o que as diferencia é que as espécies de *L. Leishmania* são encontradas na parte anterior do tubo digestivo, enquanto que as espécies de *L. Viannia* se desenvolvem na parte posterior do tubo digestivo do inseto. Ao entrar em contato com o hospedeiro mamífero, cada espécie dos diferentes subgêneros desencadeia manifestações clínicas diversas (FRAGA et al., 2010).

Embora as leishmanioses ocorram principalmente na América Latina e África, estas doenças também afetam populações marginalizadas da Europa e Ásia, estando distribuídas em 98 países, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas no mundo e colocando em risco aproximadamente 350 milhões (ALVAR et al., 2012); estima-se de 900.000 a 1,3 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes anuais (LOHARIKAR et al., 2017). Nas Américas são detectados anualmente, em média, 60.000 casos de leishmaniose cutânea (LC) e 4.000 casos de leishmaniose visceral (LV) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea e visceral no mundo.



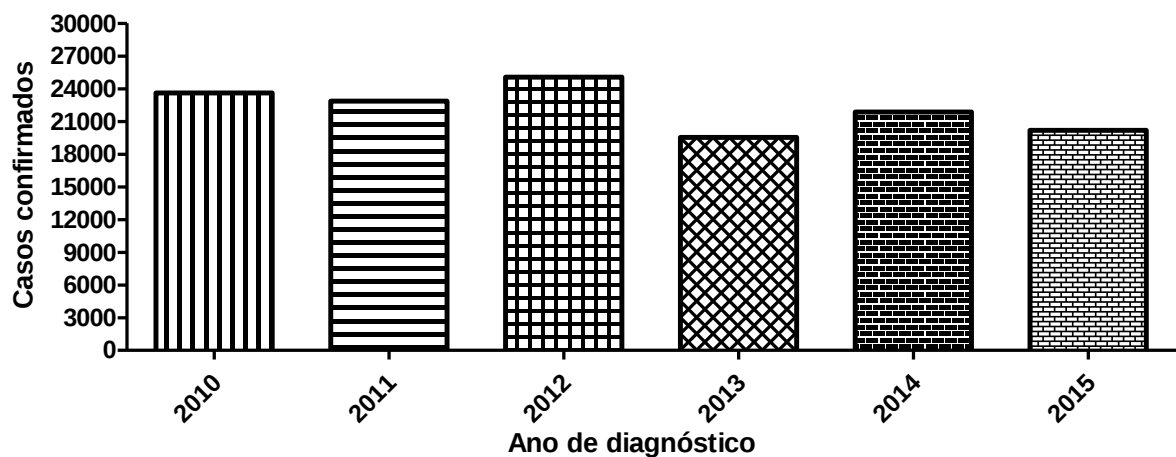
Fonte - Adaptado de Loharikar et al. (2017).

De acordo com Karagiannis-Voules e colaboradores (2013) foi constatado que no Brasil as estratégias para o controle da doença não foram modificadas durante os últimos 60 anos, o que explica o fato de a incidência no país ser tão alta até o ano de 2010 com taxa de incidência (por 10.000 habitantes) acima de 15 para LC e 0,6 para LV (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013). A partir de 2010 o Sistema

Informação de Agravos e Notificação (SINAN), órgão ligado ao Ministério da Saúde, implantou medidas mais efetivas, porém facultativas aos estados e municípios, para coleta de dados de morbidades. (SISTEMA..., 2016). No caso das leishmanioses o resultado foi satisfatório (Figuras 2 e 3), uma vez que o banco de dados é alimentado regularmente com casos notificados pelo país, facilitando o monitoramento e combate à doença.

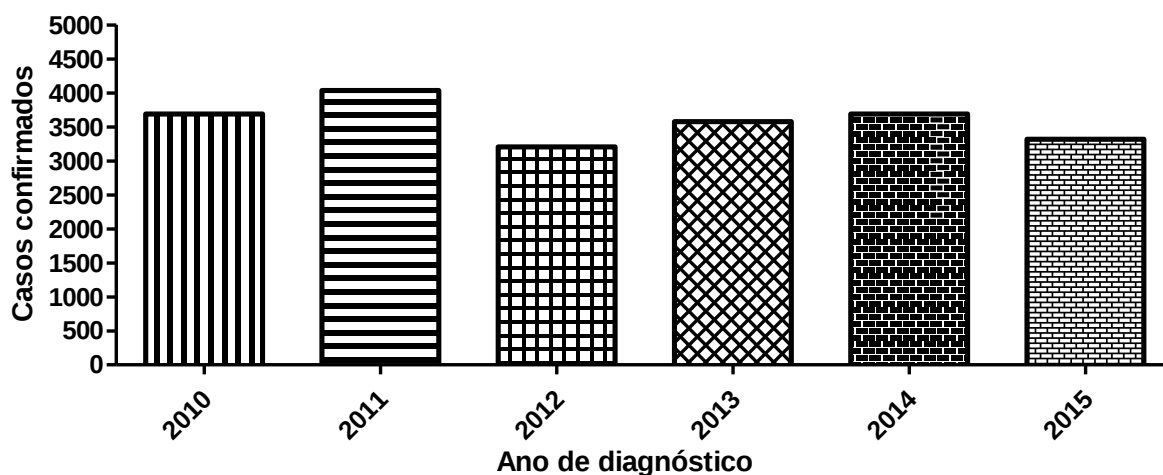
Os dados obtidos pelo SINAN mostram que antes de 2010 os casos confirmados para LC não passavam de 3000 e, após este ano, houve um aumento significativo para 27000 casos confirmados em 2012. Para a LV, após 2010, observou-se um aumento relevante no número de casos, com o maior registro em 2011.

Figura 2 - Número de casos confirmados da leishmaniose cutânea no Brasil entre os anos 2010 e 2015.



Fonte - Autor

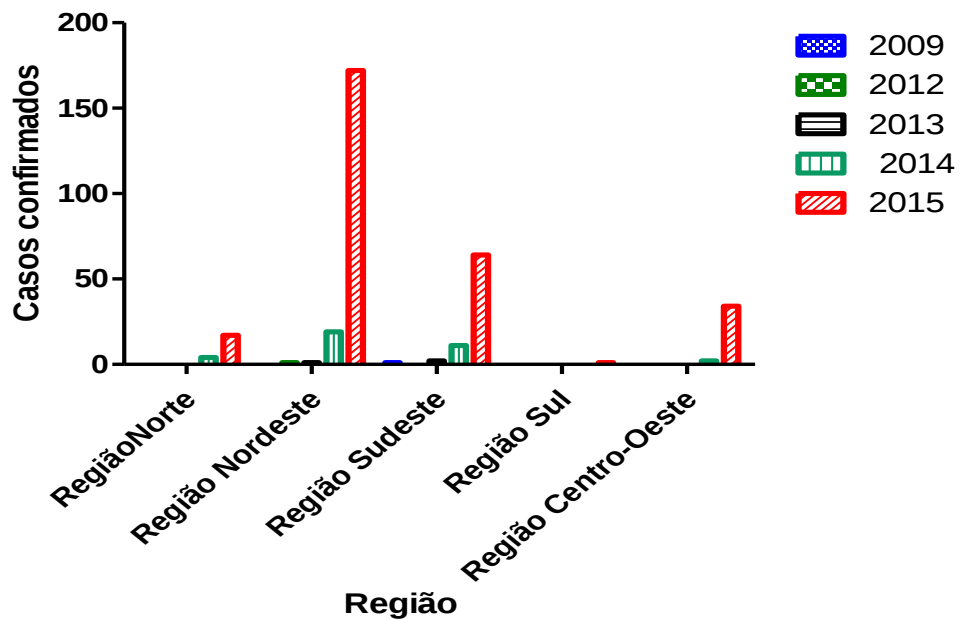
Figura 3 - Número de casos confirmados da leishmaniose visceral no Brasil entre os anos 2010 e 2015.



Fonte - Autor

Apesar de ser um importante problema de saúde pública em situações comuns de infecção, as leishmanioses ganham ainda mais atenção quando são relatadas em pacientes portadores do vírus HIV, o que pode aumentar a vulnerabilidade do paciente à doença, podendo aumentar o desafio para tratamento dos pacientes com as poucas opções terapêuticas disponíveis (LINDOSO, et al., 2016). São mais comumente relatados casos de co-infecção com LV e menos frequentes com a LC, porém há relatos de visceralização da LC em pacientes imunocomprometidos com HIV; em torno de 7% dos casos ocorrem na região do Mediterrâneo, com prevalência crescente nos últimos anos. Na Índia, por exemplo, aumentou de 0,88% nos anos 2000 para 2,18% em 2006. No Brasil a incidência aumentou de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012 (MARTINS-MELO et al., 2014; LINDOSO, et al., 2016). A Figura 4, mostra a evolução dos casos de co-morbidades LV e AIDS no Brasil, onde é possível observar um elevado número de casos na Região Nordeste, com mais de 100 casos confirmados em 2015. Não foram identificados casos de notificação para co-infecção LC + AIDS no banco de dados do SINAN.

Figura 4 - Número de casos confirmados de co-morbidade LV e AIDs no Brasil entre os anos de 2009 e 2015.



Fonte - Autor

As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas que variam em função da espécie de *Leishmania* envolvida, do estado imunológico do hospedeiro e presença de co-morbidades (PELISSARI et al., 2011; HANDLER et al., 2015). A LC é caracterizada por feridas ulcerativas expostas pelo corpo do paciente; na leishmaniose mucocutânea (LMC) são detectadas úlceras destrutivas nas mucosas do indivíduo infectado e, na LV, forma mais grave da doença, é observada hepatoesplenomegalia, podendo levar o indivíduo à morte se não tratada corretamente (Quadro 1; Figura 5) (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; WHO, 2015). No Brasil, é mais comum a manifestação cutânea da doença causada pelas espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; SINGH, SUNDAR, 2014).

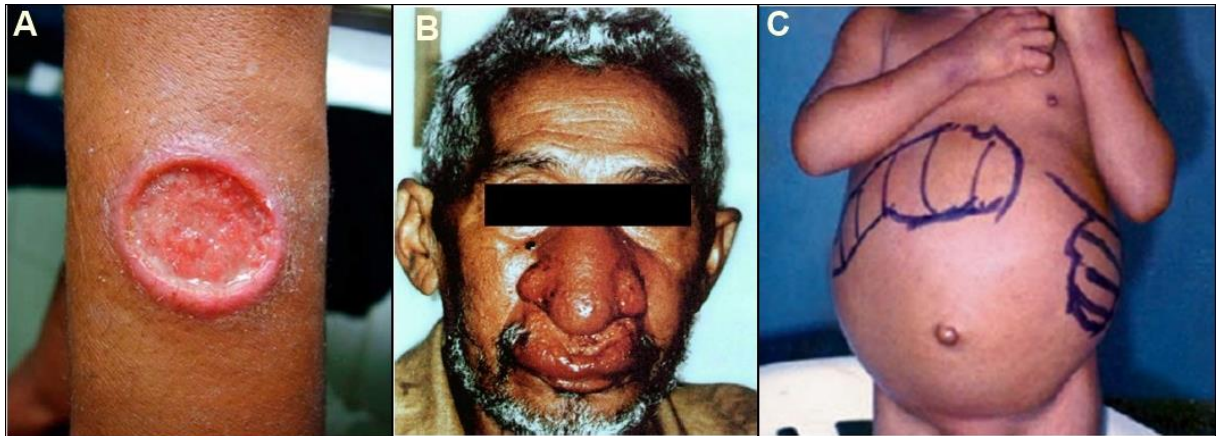
Quadro 1 - Espécies de *Leishmania* encontradas em humanos.

Subgênero	<i>L. Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	<i>L. Leishmania</i>
Velho mundo		<i>L. aethiópica</i>		
	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>		
		<i>L. major</i>	-	-
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. donovani</i>		
Novo mundo		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. killicki</i>	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. garnhami</i>	<i>L. lainsoni</i>	
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. colombiensis</i>	
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guayaniensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. major</i>
		<i>L. infantum</i>	<i>L. peruviana</i>	
Tropismo	Visceral	Cutânea	Cutânea	Mucocutânea

Fonte: Adaptado de Handler et al., 2015, Sundar e Chakravarty, 2015

Velho mundo: Países da Europa, África e Ásia. Novo Mundo: Países da América e Oceania.

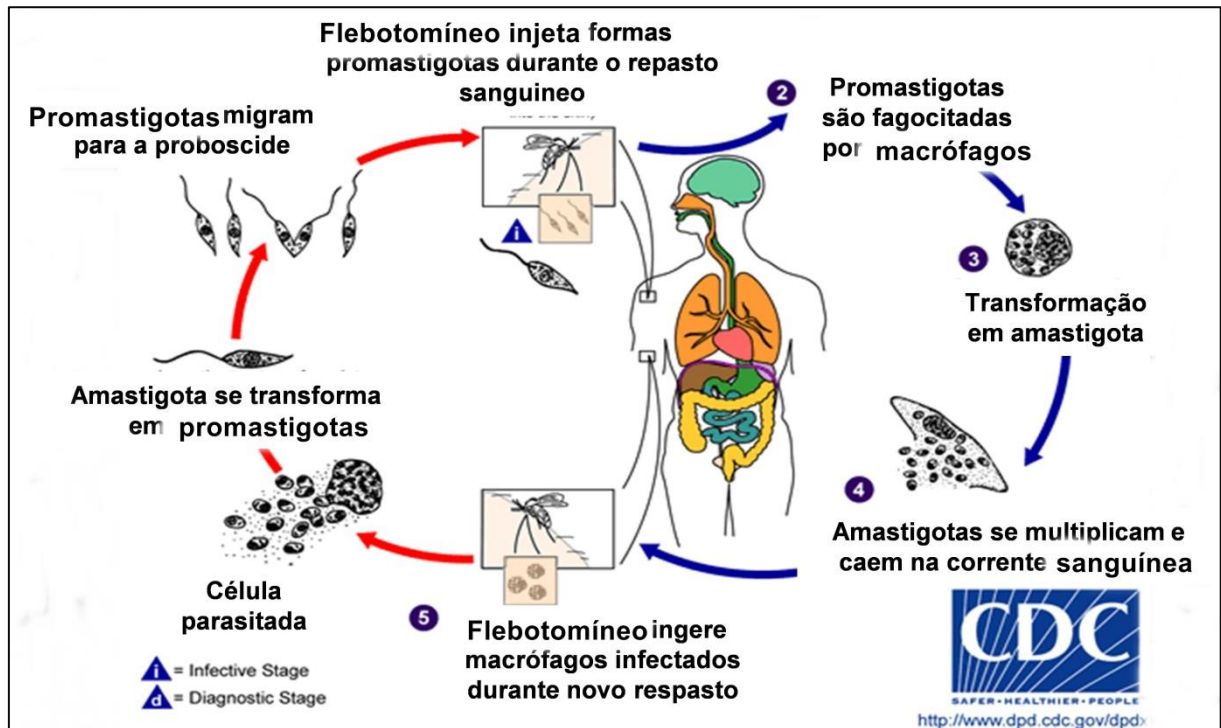
Figura 5 - Manifestações clínicas das leishmanioses em humanos.



Na Figura A é possível observar úlcera destrutiva com bordas elevadas na pele causada pela LC, na Figura B paciente úlceras destrutivas nas mucosas características da LMC e na Figura C, é observado paciente com LV apresentando hepatoesplenomegalia. Fonte: Teixeira et al., 2007.

A doença é transmitida por fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) que ao picar o hospedeiro mamífero, inoculam promastigotas, que são formas alongadas com flagelo externalizado (DESJEUX, 2004). Estas caem na corrente circulatória e, então, são fagocitadas por células de sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, diferenciando-se a amastigotas, que são formas arredondadas e com flagelo internalizado, as quais se multiplicam por divisão binária causando rompimento celular e infectando novas células (KAYE; SCOTT, 2011). Durante o repasto sanguíneo, o inseto, por sua vez, contamina-se ao ingerir células parasitadas por amastigotas, e dentro do tubo digestório do inseto se transformam em promastigotas, completando o ciclo de vida (Figura 6) (KILLICKKENDRICK, 1990).

Figura 6 - Ciclo de vida do parasito *Leishmania* no inseto (flebotomíneo) e no hospedeiro vertebrado.



Formas promastigotas de *Leishmania* diferenciam-se no inseto flebotomíneo em promastigotas metacíclicas infecciosas. Durante repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas metacíclicas, que são fagocitadas principalmente por macrófagos. Os promastigotas diferenciam-se em amastigotas aflagelados, as quais sofrem replicação dentro das células hospedeiras, que se rompem quando há amastigotas em excesso, espalhando a infecção para novas células fagocitárias. O ciclo de transmissão é completo quando os fagócitos infectados são capturados por outro flebotomíneo. Fonte: Adaptado de CDC (2017).

1.1.2 Tratamento

As terapias disponíveis para o tratamento das leishmanioses estão longe do ideal, uma vez que são pouco eficazes apresentando elevada toxicidade, e alto custo em alguns casos (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Além disso, ainda é bastante pontual o investimento e desenvolvimento de novos fármacos para as doenças negligenciadas, como as leishmanioses, devido à pouca atenção dada no âmbito do setor público e farmacêutico (ZUCCA; SCUTERA; SAVOIA, 2013).

O tratamento convencional dispõe de poucos fármacos, os quais são bastante tóxicos e de baixa tolerabilidade (Quadro 2). Os antimoniais pentavalentes (Figura 7) antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio são utilizados como medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (CROFT; OLLIARO, 2011). Foram desenvolvidos em 1912 por Gaspar Viana e estão disponíveis no mercado há mais de 70 anos, com mecanismos de ação ainda pouco

compreendidos e vários efeitos colaterais como cefaleia, febre, vômitos e náuseas, também possuem restrições à mulheres grávidas, idosos e indivíduos com doença cardíaca, doença renal ou alterações hepáticas (LINDOSO et al., 2012).

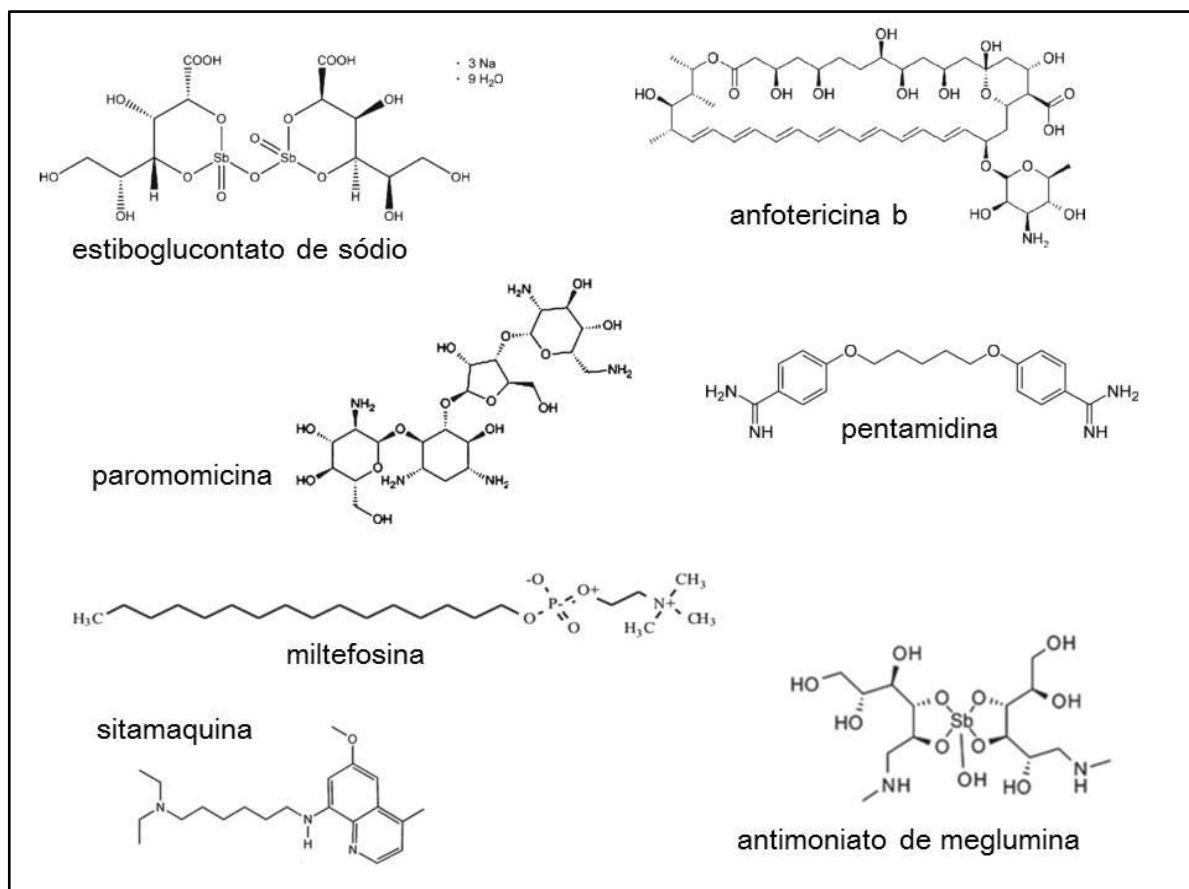
Os antimoniais pentavalentes atuam como pró-fármacos, devido à clivagem do composto pentavalente para trivalente no interior do macrófago. Estes interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos, entretanto, outros mecanismos ainda não compreendidos podem estar envolvidos (SINGH, SUNDAR, 2014). O tratamento recomendado é de 20 mg/Kg/dia com administração intravenosa ou intramuscular em um período de 3 a 4 semanas, com taxa de cura acima de 90% no Brasil, enquanto na Índia, Nepal e Bihar a taxa de falha fica em torno de 60% (LINDOSO et al., 2012; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Os fármacos de segunda escolha incluem a anfotericina B, paromomicina, pentamidina e miltefosina (Figura 7). Originalmente a anfotericina B é um antibiótico poliênico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, esta foi desenvolvida para combater doenças fúngicas, porém mostrou-se bastante eficaz contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; RATH et al., 2003). A anfotericina B convencional é bastante tóxica com vários efeitos colaterais como febre, vômitos, anemia e problemas cardíacos. No entanto, foram desenvolvidas formulações lipídicas para tentar minimizar os efeitos colaterais (NO, 2016).

Atualmente existem três formulações, a anfotericina B lipossomal, mais cara que a tradicional, porém com meia-vida circulante mais curta e menos tóxica; a dispersão coloidal de anfotericina e complexo lipídico de anfotericina B (ALMEIDA, L. et al., 2017; LINDOSO et al., 2012; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012)

O mecanismo de ação da anfotericina B e suas formulações lipídicas pode estar relacionado com a inibição da ligação da *Leishmania* ao macrófago, consequência da ligação do fármaco com o ergosterol, causando danos à membrana plasmática do parasito (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). O tratamento recomendado é de 1mg/Kg/dia com aplicação intravenosa ou intramuscular, o que exige internação do paciente (PELISSARI et al., 2011).

Figura 7 - Estruturas químicas dos fármacos empregados atualmente no tratamento das leishmanioses.



Fonte: Almeida et al., 2017; Santos et al., 2008.

A pentamidina foi sintetizada em 1930 e utilizada primariamente contra *Trypanosoma* spp.; seu uso vem diminuindo devido ao aumento do insucesso no tratamento, bem como devido sua toxicidade que pode causar diabetes melitus dependente de insulina (BRAY et al., 2003; NO, 2016). Seu mecanismo de ação está envolvido com modificações na síntese de DNA do parasito, alterando a morfologia do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial, sendo recomendada a dose de 4 mg/Kg/dia com administração intramuscular (GOTO; LINDOSO, 2010).

O antibiótico paromomicina vem sendo utilizado desde os anos 60, inicialmente contra LC, mais tarde em 2006 passou a ser utilizado no tratamento da LV. Este fármaco atua inibindo a síntese proteica, sendo administrado por via tópica (tratamento da LC) ou parenteral (tratamento da LV) na dose de 11mg a 15/Kg/dia (BARRETT; CROFT, 2012).

A miltefosina foi desenvolvida no final dos anos 80 com finalidade antineoplásica e foi o primeiro fármaco aprovado para uso oral no tratamento das leishmanioses. Ele atua interagindo com a membrana celular do parasito por modulação de receptores da superfície celular, metabolismo de inositol e ativação de fosfolipase, causando a morte celular do tipo apoptose no parasito (SEIFERT; CROFT, 2006; SINGH, SUNDAR, 2014).

Quadro 2 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, limitações associadas e possíveis mecanismos de ação.

Fármaco	Administração	Eficácia	Mecanismo de ação	Problemas associados
Antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®])	Parenteral	80-90% (50% Bihar, Índia)	É convertido para a forma Sb ^{III} no macrófago, é esta forma trivalente que inibe a tripanotona redutase e expõe o parasita ao estresse oxidativo do hospedeiro	Pancreatite, arritmias cardíacas, resistência adquirida no subcontinente indiano
Anfotericina B (Fungizone[®])	Intravenosa	>95%	Apresenta afinidade pelo ergosterol, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana causando a morte celular	Requer hospitalização, pode causar febre, dor, hipocalcemia e nefrotoxicidade
Anfotericina B lipossomal (AmBisome[®])	Intravenosa	>96%	Mecanismo de ação idêntico ao da anfotericina, porém o fármaco é liberado diretamente no macrófago	Alto custo, em torno de 3 vezes mais caro
Paromomicina	Tópica para LC e parenteral para LV	>95%	Inibe a síntese proteica em bactérias, em <i>L. donovani</i> diminui o potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas	Ototoxicidade, eritema, dor e falta de eficácia na África Central
Miltefosina	Oral	85-95%	Associado à biossíntese de fosfolípidos e ao metabolismo de alquil-lípidos em <i>Leishmania</i>	Potencialmente teratogênico, vômito e diarreia com toxicidade hepática e renal ocasional
Pentamidina	Intramuscular	70-80%	Interfere na síntese do DNA e modifica a morfologia do cinetoplasto	Efeitos secundários gastrointestinais, cardíacos, arritmias, hipotensão, pancreatite e diabetes mellitus dependente de insulina
Sítamaquina	Oral	-	Não conhecido	Efeitos renais adversos, dor abdominal e vômito

Fonte: Almeida et al., 2017; Singh; Sundar, 2014; Sundar; Chakravarty, 2010.

A combinação de fármacos para diminuir o tempo de tratamento, efeitos colaterais e eficácia, vêm sendo utilizada (BARRETT; CROFT, 2012). As iniciativas em curso concentram-se principalmente em dois esquemas terapêuticos: antimonial pentavalente associado à paromomicina ou anfotericina B, com a miltefosina (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017). No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de antimoniais pentavalentes e anfotericina B para o tratamento das leishmanioses, sendo o antimoniato de meglumina o fármaco de primeira escolha (BRASIL, 2007).

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

1.2 Produtos Naturais como fonte de novos compostos antileishmaniais

Várias frentes de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmaniais vem sendo adotadas, dentre elas, os produtos naturais (PNs). Estes mostram-se uma via promissora para esta finalidade, exibindo diferentes pesquisas publicadas com moléculas isoladas de vegetais e microrganismos (SANTOS, A. et al., 2010; SANTOS, V. et al., 2012; SANTOS, V. 2013; TORRES et al., 2014b; FUNARI et al., 2016). Os PNs são utilizados pelo homem há muito tempo para a cura de enfermidades com vários fármacos desenvolvidos e atualmente, em desenvolvimento a partir de produtos naturais, os quais são a principal fonte de novas moléculas bioativas para a indústria farmacêutica. Uma imensa variedade de metabólitos secundários, isolados de plantas, animais ou microrganismos são a base para fármacos contemporâneos contra as mais diversas enfermidades, dentre elas as doenças negligenciadas (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013)

De acordo com Gu e colaboradores (2013) e Harvey e colaboradores (2015) cerca de 30% dos medicamentos aprovados pela agência norte-americana que regula a aprovação de novos medicamentos *Food and Drug Administration* (FDA),

entre 1981 e 2010 foram baseados em pequenas moléculas de PNs ou derivados diretos. As coleções de PNs apresentam uma vasta gama de farmacóforos e um elevado grau de estereoquímica o que auxilia na especificidade e seletividade que estas substâncias apresentam para alvos celulares relacionados à doença em estudo (GU et al., 2013; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Um exemplo clássico de PN que serviu como molde para um dos medicamentos mais utilizados no mundo foi a morfina, isolada pela primeira vez em 1804 a partir do ópio obtido da planta *Papaver somniferum*, que inspirou uma nova classe de hipoanalgésicos com emprego mais seguro e efetivo (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2003).

Segundo Newman e Cragg (2016) em um levantamento realizado sobre os fármacos derivados de PNs de 1981 a 2014, foi constatado que boa parte das moléculas investigadas se tornaram novos fármacos, em alguns casos, como os compostos anticâncer, cerca de 49% dos fármacos disponíveis são não sintéticos, derivados diretamente de PNs. Para doenças parasitárias foi constatado nesse período 16 novas entidades químicas candidatas a novos fármacos e 15 fármacos disponíveis comercialmente são derivados diretamente ou foram sintetizados a partir de PNs, sendo o último lançado em 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Ao longo da história, uma grande variedade de medicamentos foi desenvolvida a partir de vegetais superiores, devido principalmente, a sua acessibilidade. Contudo, embora grande diversidade seja observada no ambiente terrestre é no ambiente marinho que se encontra a maior diversidade biológica, concentrando 34 dos 36 filos existentes, com cerca de 300.000 espécies de fauna e flora descritas (CARDOZO et al., 2007). Nos últimos 50 anos mais de 20.000 PNs foram descobertos, com as mais diversas aplicabilidades que vão desde antimicrobianos, a imunomoduladores e antidiabéticos, isso pode ser atribuído ao grande campo de exploração, que vão de algas, fungos até os próprios animais marinhos, tornando o ambiente marinho uma fonte de destaque em PNs (CARDOZO et al., 2007; MAYER et al., 2013).

1.2.1 Algas

Entre os organismos que compõem a flora marinha, as algas são descritas como organismos simples, uni ou pluricelulares, que contêm clorofila, divididas em

dois grandes grupos: as macroalgas, que se distribuem pela zona litorânea, incluindo as algas vermelhas (Rhodophyta), verdes (Chlorophyta) e marrons (Phaeophyta); e as microalgas, encontradas pela zona litorânea e próximas ao fundo oceânico (zona bentônica) (GRESSLER et al., 2011). Dentre as macroalgas, as algas pardas são as que possuem a maior descrição de metabólitos bioativos, os quais podemos citar, compostos fenólicos, ácidos graxos e terpenos (LAUS, 2001; PEREIRA; OLIVEIRA; SUDATTI, 2011).

As macroalgas diferem-se entre si por várias características, as Rhodophytas apresentam clorofila *a*, a qual é responsável por conferir a coloração verde, porém mascarada pela presença do pigmento ficobilina, conferindo a coloração vermelha a esta classe de algas. As algas Chlorophytas possuem como principais pigmentos as clorofilas *a* e *b* na mesma proporção encontrada em plantas superiores, que são responsáveis por sua cor característica, além de uma grande quantidade de carotenoides (O'CARRA; MURPHY; KILLILEA, 1980).

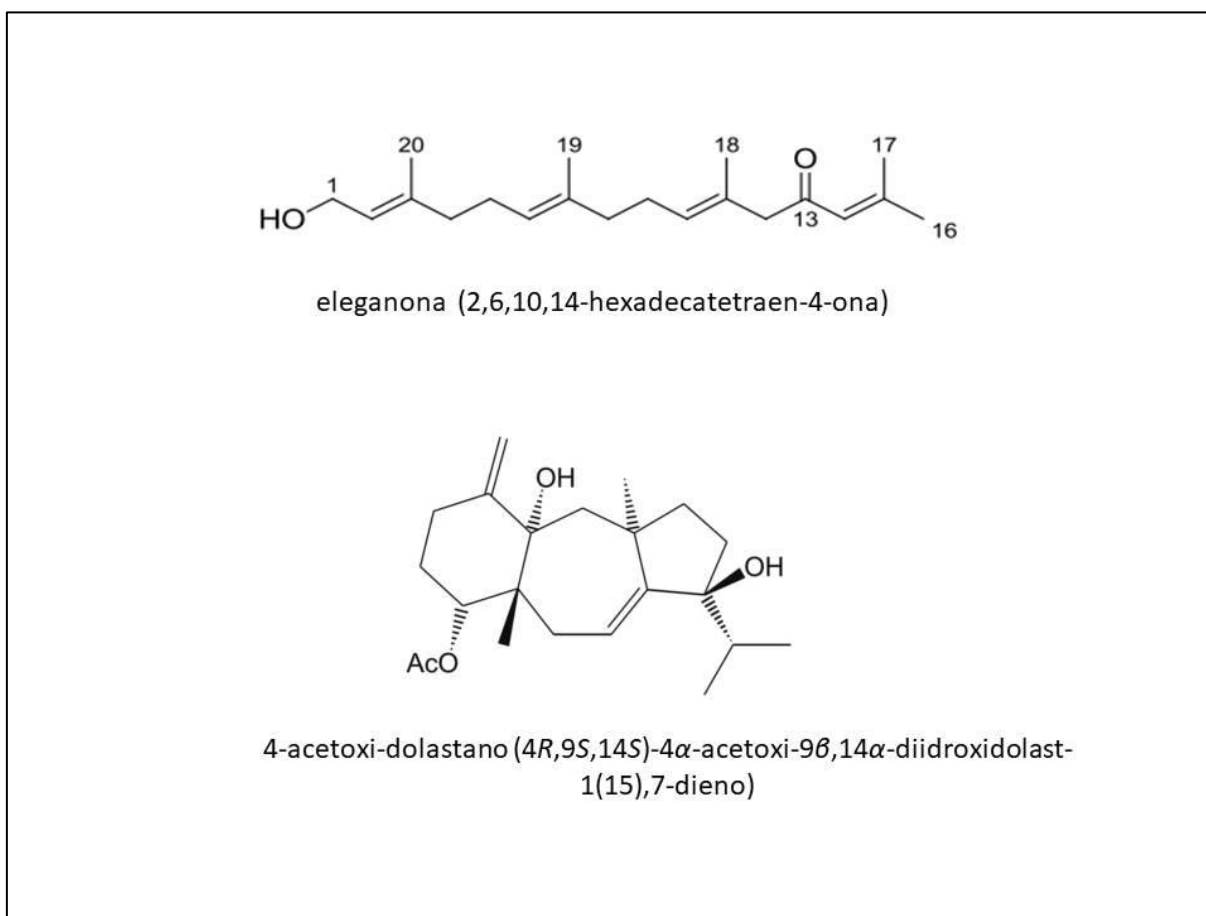
Por outro lado as algas Phaeophytas possuem coloração marrom, ou pardo-esverdeada, devido ao pigmento fucoxantina, que mascara a presença da clorofila *a*. Além das clorofilas *a* e *c1*, *c2*, esta classe possui xantofilas e carotenos como pigmentos; neste grupo encontram-se as maiores algas localizadas ao redor mundo, conhecidas como “laminárias” que podem chegar a 30 metros de comprimento (ARIZTIA; ANDERSEN; SOGIN, 1991).

Estes organismos são conhecidos pela sua vasta aplicação em diferentes setores da indústria, no setor alimentício, por exemplo, são utilizadas na produção de comidas, bebidas, matéria-prima para geleias entre outros; na agricultura, são empregadas para melhorar a germinação de plantas, e aumentar a resistência à bactérias e fungos; na produção de cosméticos estão presentes em uma série de produtos como hidratantes contendo minerais, aminoácidos e vitaminas que melhoram a nutrição da pele (CARDOZO et al., 2007; PLAZA; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2008; TORRES et al., 2014). Entretanto, é no setor farmacêutico que as algas apresentam importante papel, uma vez que uma série de compostos biologicamente ativos derivados do metabolismo secundário destes organismos, geram inúmeras moléculas bioativas que podem variar desde hidrocarbonetos de cadeia curta, cetonas simples, fenóis, acetogeninas até sofisticados terpenos

(TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991; CARVALHO; ROQUE, 2000; GAMBATO et al., 2014).

As algas pardas (Phaeophytas) em especial apresentam uma série de compostos quimicamente ativos com diversas bioatividades descritas como antiviral, anticâncer, antifúngico e nematocida (EL GAMAL, 2010). Contudo, como revisado por Torres e colaboradores (2014) esta classe de algas apresenta uma série de substâncias com atividade antiparasitária como, por exemplo, os diterpenos eleganolona (2,6,10,14-hexadecatetraen-4-ona), isolado de *Bifurcaria bifurcata*, o qual apresenta atividade contra *T. brucei rhodesiense* ($CI_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$) e contra *Plasmodium falciparum*, e 4-acetoxi-dolastano (4*R*,9*S*,14*S*)-4*α*-acetoxi-9*β*,14*α*-diidroxidolast-1(15),7-dieno), isolado da alga *Canistrocarpus cerviconis*, exibindo atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* ($CI_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$) (Figura 8), (SANTOS et al., 2011; GALLÉ et al, 2013; TORRES et al., 2014).

Figura 8 - Estrutura dos compostos antiparasitários eleganolona e 4-acetoxi-dolastano isolados das algas pardas *B.bifurcata* e *C.cerviconis*.



Fonte - Santos et al., 2011; Gallé et al., 2013.

As algas marinhas mostram-se ainda como organismos promissores na síntese de compostos biologicamente ativos, pois vivem em ambientes onde são submetidas a várias interações biológicas e condições abióticas extremas (YOKOYA, 2010). Neste sentido, as algas antárticas podem ser fontes promissoras de novas substâncias antileishmaniais, por estarem em um ambiente tão adverso como o ambiente marinho do continente Antártico. As macroalgas de ambientes extremófilos como as do continente Antártico ainda são estudadas de forma pontual, este continente é o quinto maior do planeta Terra, com uma área de aproximadamente 14 milhões de quilômetros quadrados, cercado completamente por partes dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Destaca-se a importância da alga parda *Himantotallus grandifolius* a qual é encontrada em ambientes antárticos e sub-antárticos, e já foi descrita por apresentar atividade anticâncer e anti-*Leishmania* (GAMBATO et al., 2014; TORRES, 2014).

1.2.2 Fungos endofíticos associados à macroalgas

Ainda em relação ao ambiente marinho, os fungos representam uma importante fonte de substâncias, devido a sua versatilidade em produção de metabólitos secundários. De acordo com Costa-Lotufo e colaboradores (2009), após o ano 2000, cerca de 45% das moléculas isoladas do ambiente marinho foram provenientes de microrganismos, com implicações importantes nos estudos envolvendo PNs, não só por sua versatilidade e diversidade química, mas também pela possibilidade de obtenção, em quantidade, de moléculas para estudos pré-clínicos (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Os fungos são organismos eucarióticos, aclorofilados, heterotróficos, sendo encontrados como sapróbios, parasitas, ou menos frequentemente como simbiotes. Possuem parede celular constituída por quitina e β -glicano, apresentam material de reserva energética na forma de glicogênio ou lipídeos, podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos, com reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos (MOREIRA; CRUSIUS, 2010). São importantes produtores de novas moléculas bioativas aplicadas no controle biológico de pragas, processos fermentativos industriais, como também no setor farmacêutico

como “moldes” para novos fármacos (AZEVEDO, 1998; BÄRLOCHER; BODDY, 2016)

Tratando-se dos fungos simbiontes, estes podem ser epifíticos (encontrados na superfície do organismo hospedeiro) ou endofíticos (dentro do organismo hospedeiro). As associações entre endofíticos e vegetais são simbióticas, podendo ser mutualística, quando os dois obtêm vantagens, ou parasitária quando apenas o endófito é beneficiado (YAN et al., 2015). A visão mutualística de interação é relatada como uma associação que não há danos aos hospedeiros, promovendo alterações fisiológicas ou até mesmo a produção substâncias de defesa, através do cruzamento de informações genéticas do endófito e seu hospedeiro durante a formação da associação, além disso, estes genes podem regular a produção de metabólitos secundários bioativos pelos endófitos, podendo levar a expressão de genes que conferem resistência às plantas hospedeiras (BULTMAN; BELL, 2003; BAILEY et al., 2006; ARAUJO et al., 2016)

Os fungos endofíticos são descritos como fonte produtora de moléculas com diversidade estrutural, produzindo por exemplo, policetídeos, esteroides, flavonoides entre outros; e dentre as diversas bioatividades encontradas, destacam-se a antimicrobiana, antioxidante e citotóxica (AZEVEDO, 1998; ARAUJO et al., 2016). Em relação à atividade antiparasitária de fungos endofíticos, há na literatura vários registros, principalmente de endófitos associados à plantas superiores, com atividade anti-*Leishmania*, anti-*Plasmodium* e anti-*Trypanosoma* (ZAIN et al., 2013), porém há poucos relatos sobre endofíticos associados à macroalgas.

Para macroalgas antárticas, os fungos endofíticos associados podem ser caracterizados por um alto grau de endemismo, uma vez que os relatos na literatura abordam principalmente microbioma de solo, gelo, lagos e associações com plantas, pouco há sobre fungos endofíticos de algas antárticas (GODINHO et al., 2013). O continente Antártico apresenta cadeias microbianas únicas, os microrganismos encontrados neste ambiente são capazes de sobreviver a condições extremas como desidratação, gelo-desgelo, escassez de nutrientes, baixas temperaturas, radiação, entre outras, logo os fungos endofíticos de macroalgas antárticas são espécies adaptadas à estas condições extremas (FELL; STATZELL, 1971).

Loque e colaboradores (2010) isolaram 75 fungos endofíticos, sendo 48 leveduriformes e 27 filamentosos, de três macroalgas a *Adenocystis utricularis*,

Palmaria decipiens e *Desmarestia anceps*. Constatou-se a existência de dez gêneros diferentes, sendo duas espécies endêmicas da Antártica. Em 2013, Godinho e colaboradores isolaram fungos endofíticos de oito macroalgas antárticas de todas as classes, vermelhas, pardas e verdes. Estes pesquisadores conseguiram isolar 198 fungos de 21 gêneros distintos. Em relação à atividade antiparasitária, há o relato de atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* de extratos etanólicos de fungos do gênero *Penicillium* isolados das algas antárticas *Monostroma hariatii* e *Palmaria decipiens*. A análise química destes extratos por RMN de ^1H , indicaram a presença de hidrogênios aromáticos, hidrogênios de metoxilas, além de hidrogênios olefínicos, metilênicos e metílicos que podem estar relacionados a ácidos graxos (GODINHO et al., 2013).

1.2.3 Investigação química de PNs

Para análise química de PNs são envolvidas diversas técnicas que se complementam no sentido de caracterizar as substâncias presentes no extratos, frações e substâncias isoladas, a seguir são descritas as técnicas utilizadas neste trabalho. A cromatografia é uma técnica utilizada para separar, identificar e quantificar determinada substância presente em uma mistura, inicialmente operada em forma gasosa (CG), conseguinte a cromatografia líquida (CL), que é o foco deste trabalho e posteriormente a cromatografia por fluido supercrítico (CFSC) (LANÇAS, 1993; VON MUHLEN; LANÇAS, 2004). A técnica se baseia na interação entre duas fases imiscíveis, uma estacionária e a outra móvel, onde os componentes de uma mistura percorrem a fase estacionária, através da fase móvel, sendo eluídos de acordo com a interação que desenvolvem ao longo da área superficial que percorrem, o que permite uma vasta combinação de fases móveis e estacionárias que permitam a melhor separação (VON MUHLEN; LANÇAS, 2004).

Os detectores utilizados nas várias técnicas cromatográficas instrumentais também são vários, os equipamentos podem ser acoplados à Espectrometria de massas (MS), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), detecção de absorção de radiação UV/Vis, detecção por ionização em chama (FID), detector termoiônico (TID), detector fotométrico de chama (FPD) e espectrometria de mobilidade iônica (IMS) (VON MUHLEN; LANÇAS, 2004). Dentre estes, na

Espectrometria de Massas (MS) a substância separada é ionizada e os íons gerados são separados na base da razão massa/carga, e o número de íons correspondentes de cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro, sendo os dados obtidos auxiliares na caracterização preditiva dos constituintes químicos das amostras (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A Ressonância Magnética Nuclear RMN fornece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado, podendo obter informações sobre cada tipo de núcleo (isótopo) estudado, sendo os mais comuns ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O e ^{19}F (PAVIA et al., 2010). Baseia-se na aplicação de um campo magnético sobre a amostra, onde os núcleos ativos à RMN absorvem radiação a uma frequência característica de cada isótopo, e esse sinal gerado é registrado na forma de um espectro que fornece dados sobre como cada isótopo está se comportando na amostra, auxiliando na elucidação estrutural de substâncias, ou indicando grupos funcionais presentes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Neste trabalho foram utilizadas as macroalgas *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg, alga pardo-esverdeada, com cerca de 3 metros de comprimento, encontrada na região de infralitoral na Ilha Rei George, e *Ascoseira mirabilis* Skottsberg, alga marrom (Figura 9), com cerca de 1,5 metros de comprimento, encontrada na região de infralitoral raso, em vários locais rochosos da Baía do Almirantado (FUJII, et al., 2014).

Figura 9 - Macroalgas antárticas *Cystosphaera jacquinotii* (esquerda) e *Ascoseira mirabilis* (direita).



Fonte - Fujii, et al. (2014).

Além disso, investigamos os fungos endofíticos associados às macroalgas *C. jacquinotii* e *A. mirabilis*, os quais ainda não foram descritos na literatura, reforçando o papel inovador do presente estudo.

5 CONCLUSÃO

Foram avaliados oito extratos obtidos das algas *A. mirabilis* e *C. jacquiniotii* provenientes do continente Antártico e cinco extratos obtidos de fungos endofíticos associados a estas algas contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como macrófagos murinos. Quatro extratos algais apresentaram atividade leishmanicida, embora menor que a atividade observada para os fármacos de referência e com elevada citotoxicidade. Já o único extrato bioativo fúngico apresentou atividade leishmanicida menor do que fármacos de referência, porém baixa citotoxicidade, com IS maior quando comparado aos fármacos controle.

O fungo foi identificado como sendo pertencente ao gênero *Aspergillus* seção flavi.

A partir dos extratos algais foram obtidas catorze frações sendo que nove apresentaram atividade anti-promastigota, duas referentes à alga *A. mirabilis* e sete à *C. jacquiniotii*, embora as frações tenham apresentado valores menores que os fármacos de referência. Com relação ao fungo *Aspergillus* sp., duas dentre as nove frações obtidas apresentaram atividade leishmanicida, também inferiores aos fármacos de referência.

A análise por CLAE-DAD dos extratos hexânicos algais, mostraram perfis complexos, com substâncias de média e baixa polaridade. Já os espectros de RMN de ^1H mostraram a predominância de hidrogênios metílicos e metilênicos correspondentes a hidrocarbonetos saturados. O cromatograma do extrato do fungo AmMI2pdba apresentou substâncias de média e alta polaridade e o RMN de ^1H mostrou também a presença de hidrogênios carbinólicos com menor intensidade de sinais.

As frações 3 e 6 da alga *A. mirabilis* foram analisadas por CLAE-DAD, RMN de ^1H e CLUE-EM, e foi verificado que as duas frações são bastante semelhantes, apresentando alguns picos em comum e através da CLUE-EM foi verificado um pico majoritário em comum, correspondente ao composto diisobutilftalato um contaminante comum em solventes de laboratório, porém com registros na literatura de que são encontrados naturalmente em macroalgas. Entretanto o RMN de ^1H apontou o metil (9E)-9-hexadecenoato como constituinte majoritário dessa fração.

A análise dos dados obtidos pela CLUE-EM mostraram a presença de outros valores de m/z correspondentes de outros ftalatos como o di-n-pentil ftalato, ácido

monohexiletil ftálico e dibutil ftalato, fornecendo mais indícios da presença destes compostos na alga em questão. A CLAE-MS também mostrou a presença, em menor quantidade, de compostos derivados da vitamina E, derivados de ácidos graxos e esteróis.

A análise da subfração AmF6.2 confirmou que o constituinte majoritário é o diisobutilftalato observado por apresentar o mesmo t_R do padrão utilizado na CLAE-DAD.

Apenas a sub-fração FeF6.2 do fungo AmMI2pdba apresentou atividade leishmanicida e seus constituintes químicos estão sendo investigados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. de; FUJIMURA, A. T.; CISTIA, M. L. D.; FONSECA-SANTOS, B.; IMAMURA, K. B.; MICHELS, P. A. M.; CHORILLI, M.; GRAMINHA, M. A. S. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis—a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 2, p. 117-133, 2017.
- ALMEIDA, M. C. de; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-870, 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W. L. C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, 2012.
doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- ANDREGUETTI, D. X. **Prospecção de bioativos farmacológicos em algas marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade**. 2015. 171 f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- ARAUJO, A. R.; CHAPLA, V. M.; BIASETO, C. R.; ZERAIK, M. L. Fungos endofíticos: fonte de novos metabólitos secundários bioativos. In: SANTOS, L. C. dos; FURLAN, M.; AMORIM, M. R. de (Org.). **Produtos naturais bioativos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. Cap. 7, p. 256-296.
- ARIZTIA, E. V.; ANDERSEN, R. A.; SOGIN, M. L. A new phylogeny for chromophyte algae using 16S-like rna sequences from *Mallomonas papillosa* (synurophyceae) and *Tribonema aequale* (xanthophyceae). **Journal of Phycology**, v. 27, n. 3, p. 428-436, 1991.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Ed. Embrapa, 1998. p. 117-137.
- BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; CROZIER, J.; SAMUELS, G. J.; CHOI, YOUNG, I.-K.; HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1449-1464, 2006.
- BÄRLOCHER, F.; BODDY, L. Aquatic fungal ecology – how does it differ from terrestrial? **Fungal Ecology**, v. 19, p. 5-13, 2016.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, DF, 2007. 181 p.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BULTMAN, T. L.; BELL, GREGORY D. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. **Oikos**, v. 103, n. 1, p. 182-190, 2003.

CARDOZO, K. H.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLA, P. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 60-78, 2007.

CARVALHO, L. R. de; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 757-754, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

CHEN, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga *Bangia atropurpurea*. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 1014-1018, 2004.

COSTA-LOTUFO, L.; WILKE, D.; JIMENEZ, P.; EPIFANIO, R. D. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIVAKARA, S.; AIYAZ, M.; MOORE, G.; VENKATARAMANA, M.; HARIPRASAD, P.; NAYAKA, S. C.; NIRANJANA, S. Analysis of genetic and aflatoxin diversity among *Aspergillus flavus* isolates collected from sorghum seeds. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1255-1264, 2015.

DUTRA, L. A.; ALMEIDA, L. de; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A. S.; SANTOS, J. L. dos. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, 2014.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.

FELL, J.; STATZELL, A. C. *Sympodiomyces* gen. n., a yeast-like organism from southern marine waters. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 37, n. 1, p. 359-367, 1971.

FLEWELLING, A. J.; JOHNSON, J. A.; GRAY, C. A. Isolation and bioassay screening of fungal endophytes from North Atlantic marine macroalgae. **Botanica Marina**, v. 56, n. 3, p. 287-297, 2013.

FLEWELLING, A. J.; CURRIE, J.; GRAY, C. A.; JOHNSON, J. A. Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. **Current Science**, v. 109, n. 1, p. 88-111, 2015.

FOTI, M.; PIATTELLI, M.; AMICO, V.; RUBERTO, G. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 26, n. 2, p. 159-164, 1994.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238-245, 2010.

FREARSON, J. A.; COLLIE, I. T. HTS and hit finding in academia—from chemical genomics to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23, p. 1150-1158, 2009.

FUJII, M. T. (Ed.). **Macroalgas marinhas da Antártica**. São Carlos: Cubo, 2014. 93 p.

FUNARI, C. S.; ALMEIDA, L. D.; PASSALACQUA, T. G.; MARTINEZ, I.; AMBROSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; SILVA, D. H. S.; GRAMINHA, M. A. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 411-416, 2016.

GALLÉ, J.-B.; ATTIOUA, B.; KAISER, M.; RUSIG, A.-M.; LOBSTEIN, A.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. Eleganolone, a diterpene from the French marine

alga *Bifurcaria bifurcata* inhibits growth of the human pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 599-610, 2013.

GAMBATO, G.; BARONI, É. G.; GARCIA, C. S.; FRASSINI, R.; FROZZA, C. O.; MOURA, S.; PEREIRA, C. M.; FUJII, M. T.; COLEPICCOLO, P.; LAMBERT, A. P. F. Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis-mediated cell death in tumor cells. **Advances in Biological Chemistry**, v. 4, p. 98-108, 2014.

GANTI, V.; KIM, K.; BHATTARAI, H.; SHIN, H. Isolation and characterisation of some antifouling agents from the brown alga *Sargassum confusum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 4, p. 309-315, 2006.

GARCHITORENA, A.; SOKOLOW, S.; ROCHE, B.; NGONGHALA, C.; JOCQUE, M.; LUND, A.; BARRY, M.; MORDECAI, E.; DAILY, G.; JONES, J. Disease ecology, health and the environment: a framework to account for ecological and socio-economic drivers in the control of neglected tropical diseases. **Philosophical Transactions of the Real Society B**, v. 372, n. 1722, 2017.
doi: 10.1098/rstb.2016.0128.

GARG, B.; BISHT, T.; LING, Y.-C. Sulfonated graphene as highly efficient and reusable acid carbocatalyst for the synthesis of ester plasticizers. **RSC Advances**, v. 4, n. 100, p. 57297-57307, 2014.

GAZIS, R.; REHNER, S.; CHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 14, p. 3001-3013, 2011.

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

GOMES, E. S.; SCHUCH, V.; LEMOS, E. G. D. M. Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1007-1034, 2013.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GORINSTEIN, S.; WEISZ, M.; ZEMSER, M.; TILIS, K.; STILLER, A.; FLAM, I.; GAT, Y. Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 115-120, 1993.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRESSLER, V. **Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliensis* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira**. 2010. 284 f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GRESSLER, V.; FUJII, M. T.; MARTINS, A. P.; COLEPICOLO, P.; MANCINI-FILHO, J.; PINTO, E. Biochemical composition of two red seaweed species grown on the Brazilian coast. **Journal of the Scien of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1687-1692, 2011.

GU, J.; GUI, Y.; CHEN, L.; YUAN, G.; LU, H.-Z.; XU, X. Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0062839.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897-908, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HOTEZ, P.; AKSOY, S. PLoS neglected tropical diseases: ten years of progress in neglected tropical disease control and elimination... more or less. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0005355.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Current concepts - control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

JARDIM, I. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; SCHOLTE, R. G.; GUIMARAES, L. H.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002213.

KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world leishmania infections: a practical review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KILLICKKENDRICK, R. The life-cycle of leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, p. 37-42, 1990.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 479-490, 2010.

KOŁODZIEJCZYK, P. P.; WANG, X.; MARIANCHUK, M.; LU, W.; AMAROWICZ, R. Phenolics in rapeseed: capillary electrophoresis as a novel analytical method for detection of sinapine, sinapic acid esters and ferulates. **The Regional Institute**. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/479.htm>> . Acesso em: 28 jun. 2017.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240 p.

LARGERON, M.; LOCKHART, B.; PFEIFFER, B.; FLEURY, M.-B. Synthesis and in vitro evaluation of new 8-amino-1, 4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 5043-5052, 1999.

LAUS, G. Biological activities of natural halogen compounds. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, p. 757-809, 2001.

LI, X.; ZHANG, J.; GAO, W.; WANG, H. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3673-3679, 2012.

LINDOSO, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T.; MOREIRA, C. H. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. **HIV AIDS (Auckl)**, v. 8, p. 147-156, 2016.

LINDOSO, J. L.; COSTA, J. M.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, 2012.

LOHARIKAR, A.; DUMOLARD, L.; CHU, S.; HYDE, T.; GOODMAN, T. Status of new vaccine introduction – worldwide, september 2016. **Weekly Epidemiological Record**, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9123.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2017.

LOQUE, C. P.; MEDEIROS, A. O.; PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641-648, 2010.

MACHADO, M. M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Univerdidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA M. da S.; ALENCAR, C. H.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; HEUKELBACH, J. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011. **Transactions of the Real Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 338-347, 2014.

MAYER, A. M.; RODRIGUEZ, A. D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013.

MEDINA, R. P.; SILVA, A. D.; ANDERSEN, R. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Botryane sesquiterpenes and binaphthalene tetrols from endophytic fungi associated to the marine red algae *Asparagopsis taxiformis*. **Planta Medica**, v. 81. doi:10.1055/s-0036-1596629.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2016.

MONGUI, A.; PEREZ-LLANOS, F. J.; YAMAMOTO, M. M.; LOZANO, M.; ZAMBRANO, M. M.; DEL PORTILLO, P.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; RESTREPO, S.; DEL PORTILLO, H. A.; JUNCA, H. Development of a genetic tool for functional screening of anti-malarial bioactive extracts in metagenomic libraries. **Malaria Journal**, v. 14, 2015. doi:10.1186/s12936-015-0748-6.

MOREIRA, C. G.; SCHOELEIN- CRUSIUS, I. H. **Fungos em ambientes aquáticos continentais**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. Disponível em: <<http://botanicaonline.com.br/geral/arquivos/Fungos%20-aqu%C3%A1ticos.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2017

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

NAMIKOSHI, M.; FUJIWARA, T.; NISHIKAWA, T.; UKAI, K. Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. **Marine Drugs**, v. 4, n. 4, p. 290-297, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p. 8-35, 2009.

O'CARRA, P.; MURPHY, R.; KILLILEA, S. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. **Biochemical Journal**, v. 187, n. 2, p. 303-309, 1980.

OLIVEIRA, A. L. L. de; FELÍCIO, R. de; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 6. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 692 p.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. D. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes: a first report. **Mycologia**, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. S. de; SUDATTI, D. B. Ecologia química marinha: origem, evolução e perspectivas no Brasil. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 412-435, 2011.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. de; MARZAL, P. C.; ANDRADE, H. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B. de; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009.

RUFINO, M. P. **Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *Senna spectabilis***. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SANTOS, A. O. dos; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, É. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v. 8, n. 11, p. 2733-2743, 2010.

SANTOS, A. O. dos; BRITTA, E. A.; BIANCO, E. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**, v. 9, n. 11, p. 2369-2383, 2011.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SANTOS, V. A. dos; REGASINI, L. O.; NOGUEIRA, C. R.; PASSERINI, G. D.; MARTINEZ, I.; BOLZANI, V. S.; GRAMINHA, M. A.; CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 991-995, 2012.

SANTOS, V. A. dos; LEITE, K. M.; SIQUEIRA, M. da C.; REGASINI, L. O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C. T.; GALUPPO, M. K.; STOLF, B. S.; PEREIRA, A. M.; CICARELLI, R. M.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M. A. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.

SARASAN, M.; PUTHUMANA, J.; JOB, N.; HAN, J.; LEE, J.; PHILIP, R. Marine algicolous endophytic fungi-A promising drug resource of the era. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1039-1052, 2017.

SASSAKI, B. **Avaliação do perfil químico e potencial antioxidante dos extratos de diferentes polaridades obtidos a partir de macroalgas marinhas presentes no litoral do estado de São Paulo (Brasil)**. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2015.

SASTRY, V.; RAO, G. Dioctyl phthalate, and antibacterial compound from the marine brown alga-*Sargassum wightii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 2, p. 185-186, 1995.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SIMÕES, J. C.; ARIGONY NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 4, p. 191-197, 2004.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. doi:10.3389/fimmu.2014.00296.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **O Sinan**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/o-sinan>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

STAPLES, C. A.; PARKERTON, T. F.; PETERSON, D. R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters. **Chemosphere**, v. 40, n. 8, p. 885-891, 2000.

SUNDAR, S.; CHARAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267-4277, 2010.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; SOUZA, W. **Atlas didático: ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ Consorcio Cerdej, 2013. 64 p.

TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v. 14, p. 83-90, 1991.

TORRES, F. A. **Leishmanioses e a busca de compostos de origem marinha: as macroalgas como matriz sustentável para estudos de atividade leishmanicida**. 2014. 265 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

TORRES, F. A.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M.; SOUZA, R. A. de; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 265-276, 2014.

ULIANA, S. R.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 10, p. 1-17, 2017. doi:10.1017/S0031182016002523.

VALADÃO, I. B. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados com a alga vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae)**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

VOGEL, A. I.; AFONSO, J. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 462 p.

VON MUHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, p. 747-753, 2004.

WALKER, R. D. Jr.; HAWKINS, J. E. The ultraviolet absorption spectra of some terpene hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 16, p. 4209-4210, 1952.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. Department of Control of Neglected Diseases. **Leishmaniasis**: strengthening cross-border collaboration for control in Central Asian and Middle Eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean regions. [Geneva], 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/173803/1/9789241508780_eng.pdf> Acesso em : 28 jun. 2017.

WYREPKOWSKI, C. C. **Estudo químico e atividade mutagênica e antirradicalar de *Caesalpinia ferrea***. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

YAN, J.; BROUGHTON, S.; YANG, S.; GANGE, A. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, v. 13, p. 53-59, 2015.

ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; AL-OTHMAN, M. R.; ALAFEEFY, A. M.; EL-MELIGY, R. M. Withdrawn: biological activity of fungal secondary metabolites. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2013. doi:10.1016/j.jscs.2013.02.007.

ZHANG, H.-J.; MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; QI, X.-H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. New chemotherapeutic strategies against malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 502-526, 2013.