

**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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia A. S. Graminha

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Clementino, Leandro da Costa  
C626L 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

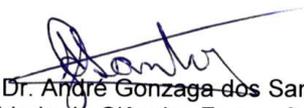
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 21 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>o</sup> 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<sup>o</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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  $^1\text{H}$  e, posteriormente, sub-fractionadas. Verificamos a presença do diisobutilftalato 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-fractionadas, sendo identificada a subfração FeF6.2 com a atividade antiparasitária. O fungo produtor de metabólitos bioativos leishmanicida AmpdbaM12 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 <sup>1</sup>H 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 fungus 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 $^1\text{H}$ do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em $\text{CDCl}_3$ a 300 MHz. ....	60
Figura 19 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico da alga <i>C. jacquinotii</i> em $\text{CDCl}_3$ 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 $^1\text{H}$ da F3, obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em $\text{CDCl}_3$ a 300 MHz.	68
Figura 28 - Expansão dos sinais de RMN $^1\text{H}$ característicos do diisobutilftalato para a F3.	69
Figura 29 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da F6, obtida do extrato hexânico da alga <i>A. mirabilis</i> em $\text{CDCl}_3$ a 300 MHz.	69
Figura 30 - Expansão dos sinais de RMN $^1\text{H}$ 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 $^1\text{H}$ 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.jacquintii</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. jacquintii</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. jacquintii</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 <sup>1</sup> 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. jacquintii</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  
CC<sub>50</sub> - 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<sub>50-AMA</sub> - Concentração Inibitória necessária para matar ou inibir 50% de formas amastigotas  
CI<sub>50-PRO</sub> - 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 - àcido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfónico  
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 <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
*d* - Duplete  
*dd* - Duplo duplete  
*m* - Multiplete  
RPMI - Roswell Park Memorial Institue medium  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SINAN - Sistema de Informação de Agravos e Notificação  
UV- Ultra violeta

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Doenças Negligenciadas</b> .....	<b>18</b>
1.1.1 Leishmanioses .....	18
1.1.2 Tratamento .....	25
<b>1.2 Produtos Naturais como fonte de novos compostos antileishmaniais</b> ....	<b>30</b>
1.2.1 Algas .....	31
1.2.2 Fungos endofíticos associados à macroalgas .....	34
1.2.3 Investigação química de PNs .....	36
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Meios de Cultura</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2 Cultivo de parasitos e células de mamífero</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3 Preparo das amostras</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4 Coleta das algas</b> .....	<b>41</b>
<b>3.5 Obtenção do extrato algal</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6 Isolamento dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos</b> .....	<b>43</b>
<b>3.7 Identificação dos fungos endofíticos</b> .....	<b>46</b>
<b>3.8 Fracionamento dos extratos algais</b> .....	<b>47</b>
<b>3.9 Fracionamento dos extratos fúngicos</b> .....	<b>47</b>
<b>3.10 Análise dos extratos e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	<b>48</b>
<b>3.11 Sub-fracionamento dos compostos algais e fúngicos</b> .....	<b>49</b>
<b>3.12 Análise dos extratos e frações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H</b> .....	<b>49</b>
<b>3.13 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM)</b> .....	<b>49</b>
<b>3.14 Bioensaios para determinação da atividade leishmanicida e citotóxica dos extratos, frações e sub-frações das algas e fungos endofíticos associados</b> .....	<b>51</b>
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
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
4.1 Obtenção dos extratos das algas <i>A. mirabilis</i> e <i>C. jacquilotii</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
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
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.

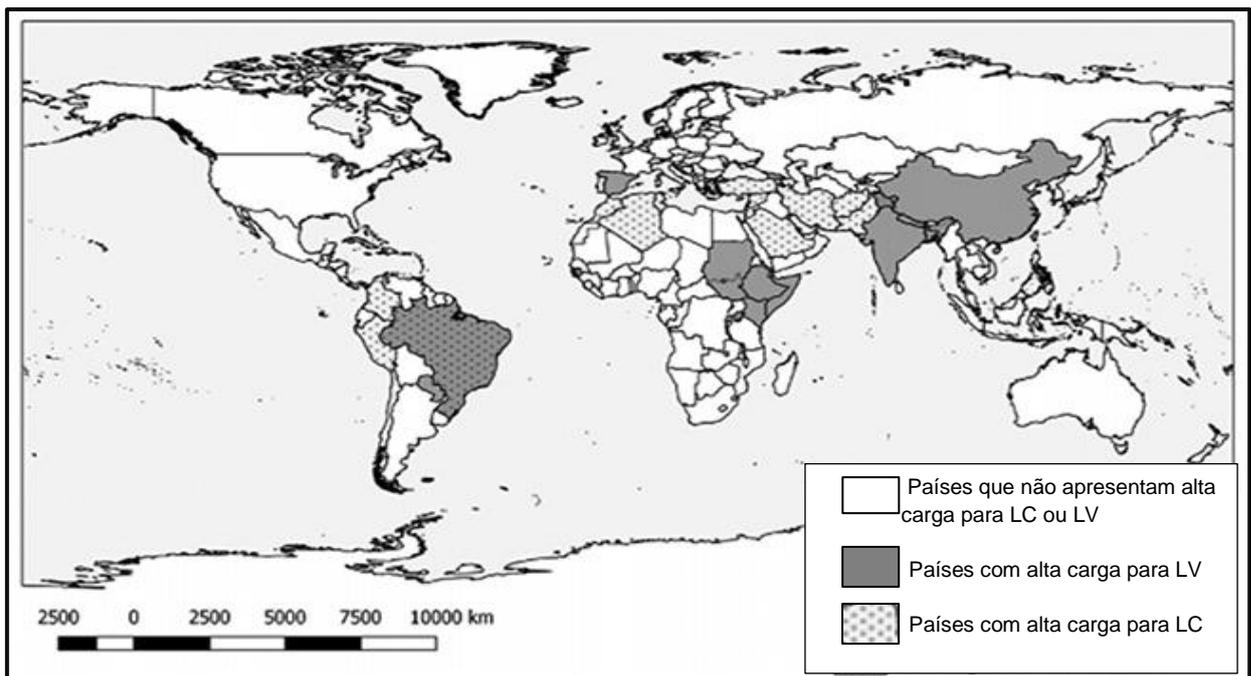
### 1.1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários flagelados da família Trypanossomatidae, 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.



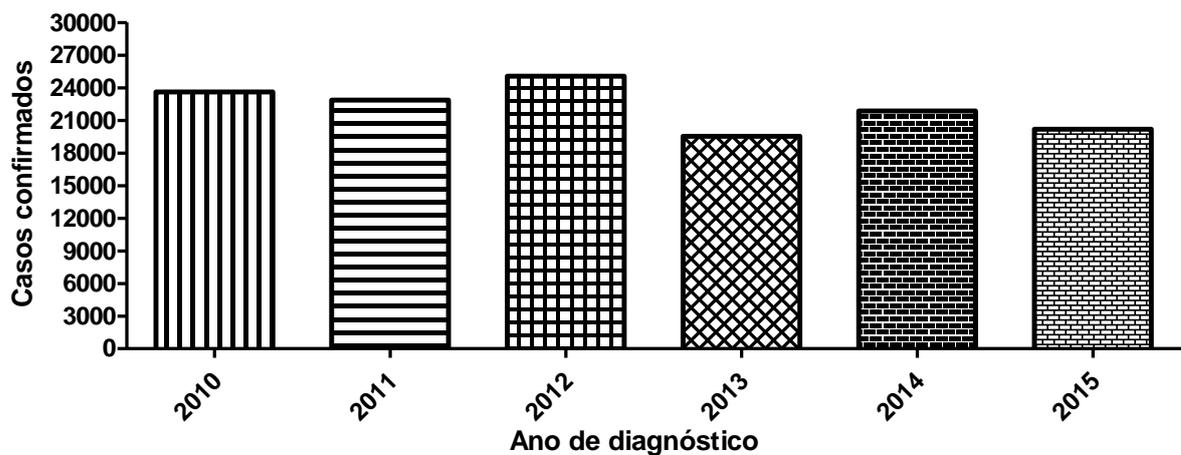
Fonte - Adaptado de Loharikar et al. (2017).

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.

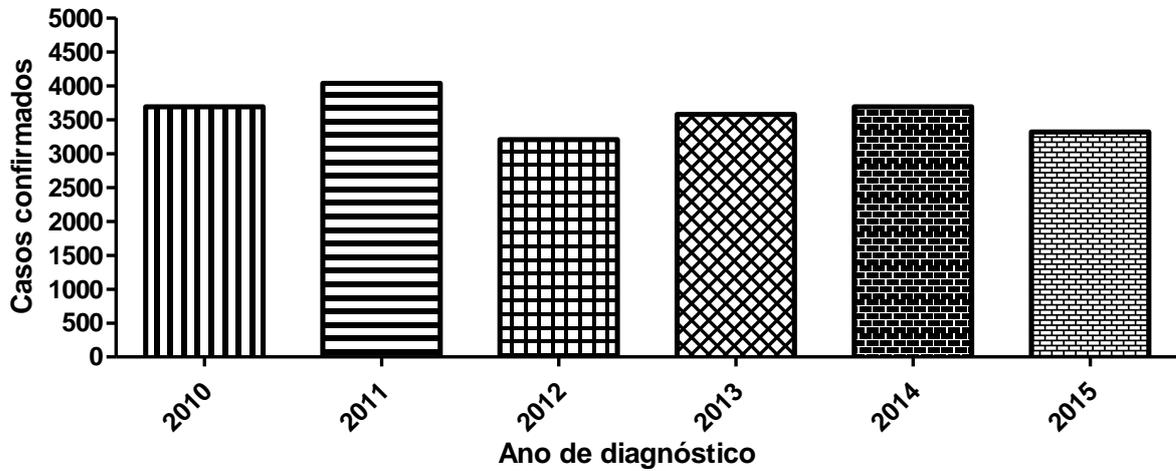
Os dados obtidos pelo SINAN mostram que antes de 2010 os casos confirmados para LC não passavam de 3000 e, após este ano, houve um aumento significativo para 27000 casos confirmados em 2012. Para a LV, após 2010, observou-se um aumento relevante no número de casos, com o maior registro em 2011.

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



Fonte - Autor

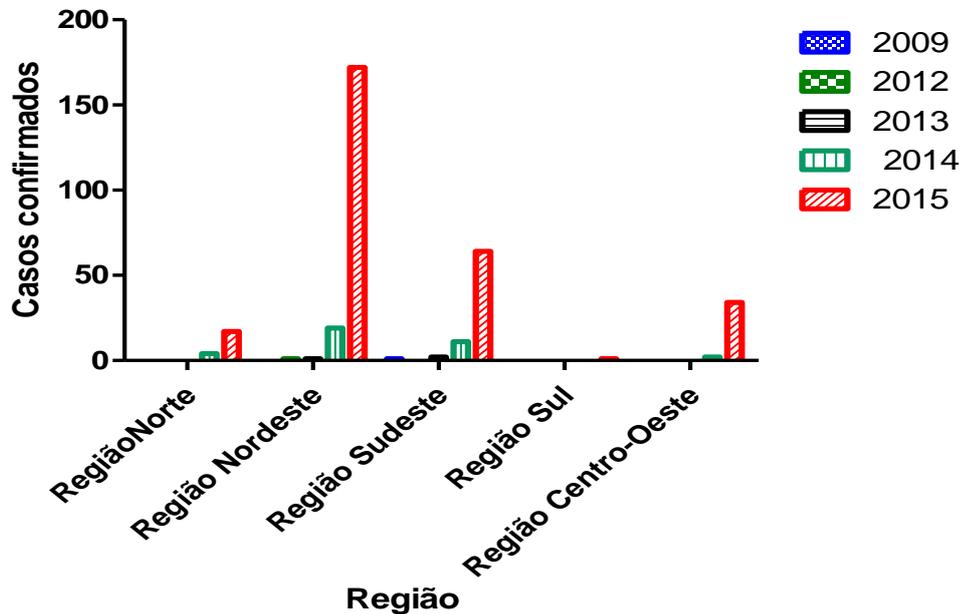
Figura 3 - Número de casos confirmados da leishmaniose visceral no Brasil entre os anos 2010 e 2015.



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 (PELLISSARI 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).

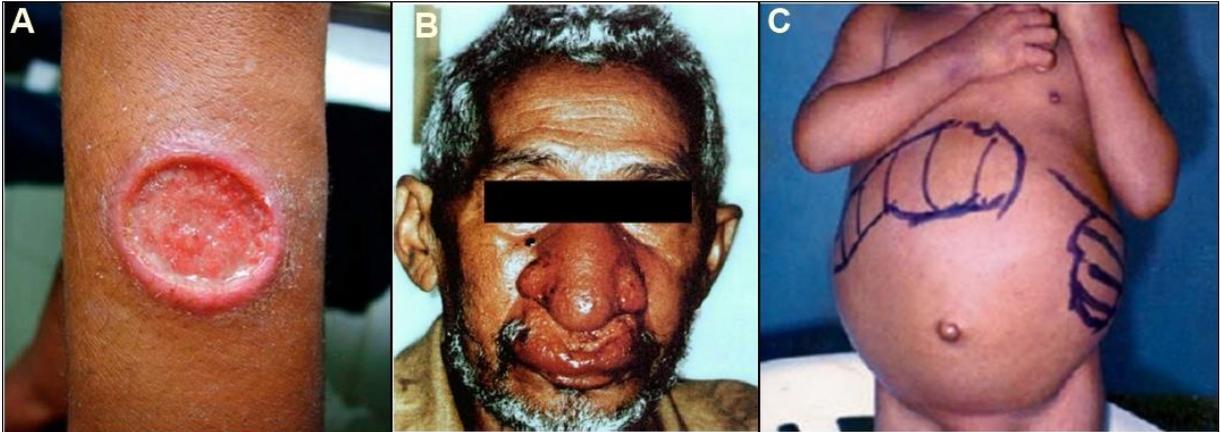
Quadro 1 - Espécies de *Leishmania* encontradas em humanos.

<b>Subgênero</b>	<b><i>L. Leishmania</i></b>	<b><i>L. Leishmania</i></b>	<b><i>L. Viannia</i></b>	<b><i>L. Leishmania</i></b>
<b>Velho mundo</b>		<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>		
<b>Novo mundo</b>		<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>	
<b>Tropismo</b>	<b>Visceral</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Mucocutânea</b>

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.

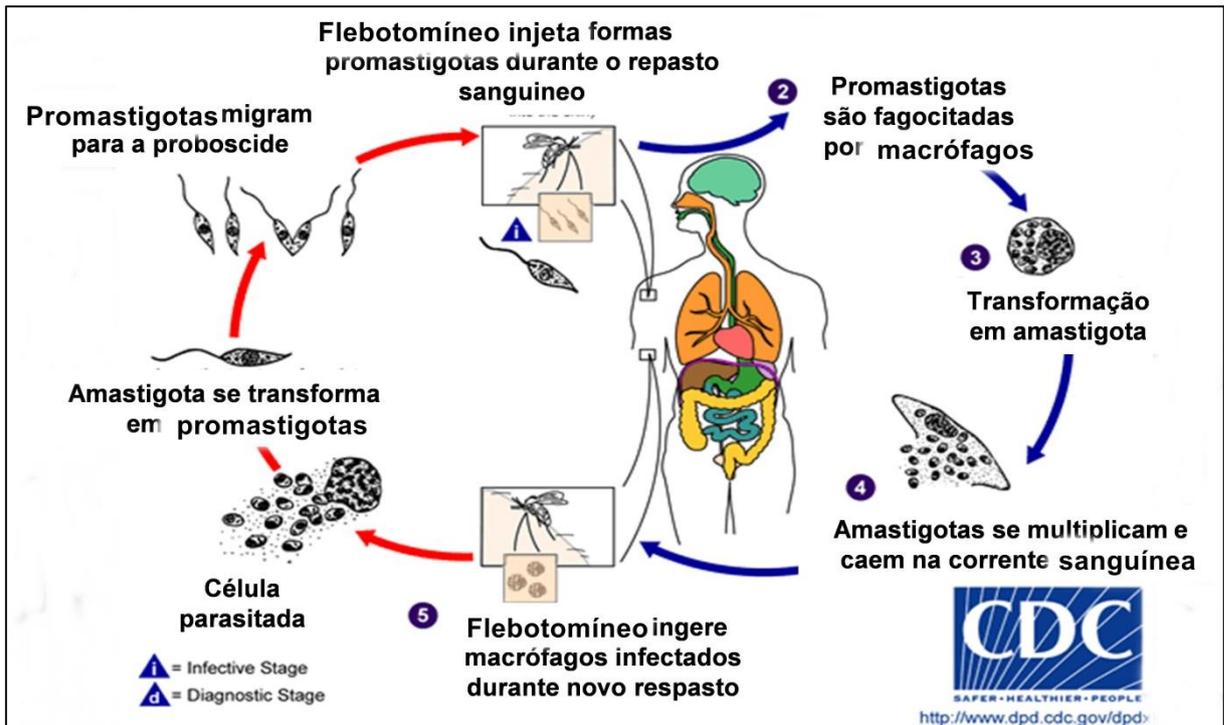
Figura 5 - Manifestações clínicas das leishmanioses em humanos.



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 aflageladas, 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).

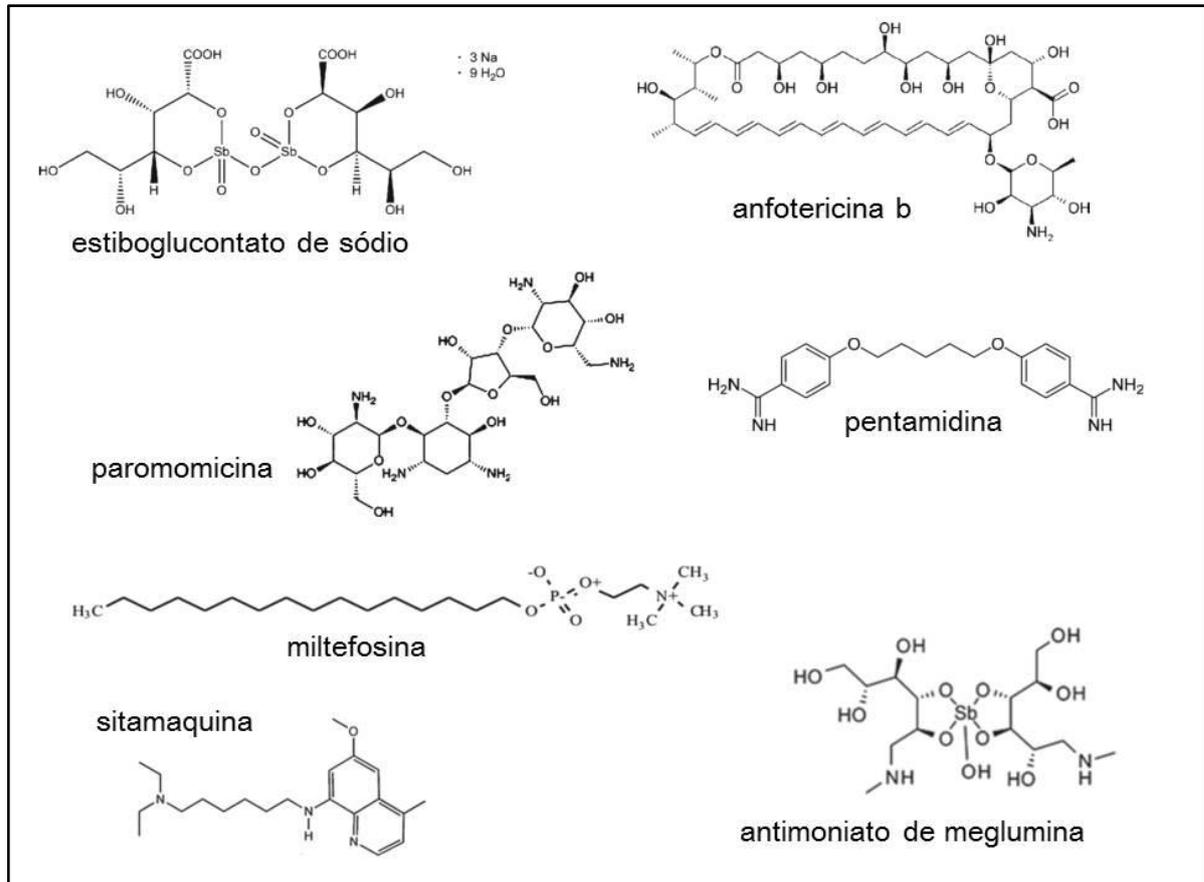
Os antimoniais pentavalentes atuam como pró-fármacos, devido à clivagem do composto pentavalente para trivalente no interior do macrófago. Estes interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos, entretanto, outros mecanismos ainda não 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.

<b>Fármaco</b>	<b>Administração</b>	<b>Eficácia</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Problemas associados</b>
<b>Antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) e antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>)</b>	Parenteral	80-90% (50% Bihar, Índia)	É convertido para a forma Sb <sup>III</sup> 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
<b>Anfotericina B (Fungizone<sup>®</sup>)</b>	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
<b>Anfotericina B lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>)</b>	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
<b>Paromomicina</b>	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
<b>Miltefosina</b>	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
<b>Pentamidina</b>	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
<b>Sítamaquina</b>	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)

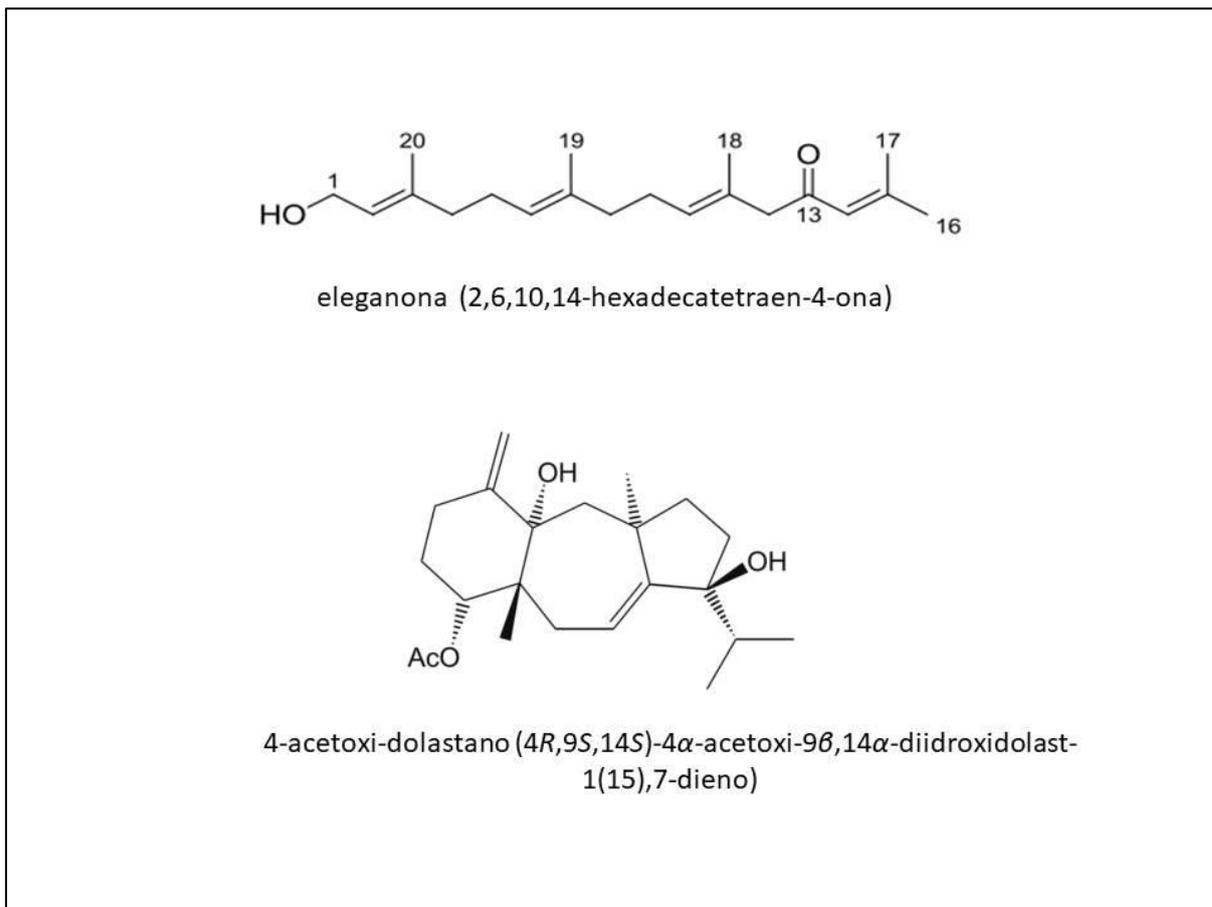
Por outro lado as algas Phaeophytas possuem coloração marrom, ou pardo-esverdeada, devido ao pigmento fucoxantina, que mascara a presença da clorofila *a*. Além das clorofilas *a* e *c1*, *c2*, esta classe possui xantofilas e carotenos como pigmentos; neste grupo encontram-se as maiores algas localizadas 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 $\alpha$ -acetoxi-9 $\beta$ ,14 $\alpha$ -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 simbiontes. Possuem parede celular constituída por quitina e  $\beta$ -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 hariotii* e *Palmaria decipiens*. A análise química destes extratos por RMN de  $^1\text{H}$ , 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  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  e  $^{19}\text{F}$  (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 jacquinothii* (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 jacquinothii* (esquerda) e *Ascoseira mirabilis* (direita).



Fonte - Fujii, et al. (2014).

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

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi à busca bioguiada de compostos com atividade leishmanicida provenientes das macroalgas antárticas *A. mirabilis* e *C. jacquinotii* e de seus fungos endofíticos.

Objetivos específicos:

- Avaliação da atividade biológica de extratos, frações e subfrações obtidos das algas e de seus fungos endofíticos, para determinação da atividade leishmanicida ( $CI_{50}$ ) frente às formas promastigotas ( $CI_{50-PRO}$ ) e amastigotas intracelulares ( $CI_{50-AMA}$ ) de *L. amazonensis* e citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) em macrófagos peritoneais;
- Identificação molecular dos fungos endofíticos bioativos;
- Análise química dos extratos, frações e subfrações bioativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Ressonância Magnética Nuclear e/ou Espectrometria de Massas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Meios de Cultura

LIT completo (*Liver Infusion Tryptose*): 5,0 g de Liver Infusion Broth (BD 226920), 5,0 g de triptose (BD 211713), 4,0 g de NaCl (85,55 mM), 8,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7,04 mM), 0,4 g de KCl (107,3 mM), 2,0 g de glicose (22,2 mM), 0,025 g de hemina (0,15 mM), água deionizada q.s.p – 900mL. O meio foi esterilizado por autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento acrescentou-se, assepticamente, 100 mL de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

RPMI completo (*Roswell Park Memorial Institute medium*)(Gibco<sup>®</sup>): uma ampola de meio RPMI 1640 em pó (Gibco<sup>®</sup>), foi dissolvida em água deionizada, mantida sob agitação constante. Adicionou-se 2,0 g de bicarbonato de sódio (23,8 mM) e 2,38 g de tampão HEPES (9,9 mM) e água deionizada q.s.p – 900mL. Acertou-se o pH para 7,2 e em seguida o meio foi filtrado utilizando filtro com membrana de 0,22 µm (Kasvi<sup>®</sup>). Por fim, adicionou-se 100 mL de SFB e os antibióticos estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

#### 3.2 Cultivo de parasitos e células de mamífero

Foram utilizados promastigotas de *L. amazonensis*, linhagem MPRO/BR/1972/M1841-LV-79, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Beatriz Stoff da Universidade de São Paulo – USP. Os parasitos foram cultivados em meio de cultura LIT, à 27°C em estufa BOD. Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss (Protocolo CEUA/FCF/CAr: 42/2016) após exposição à solução de tioglicolato de sódio 3%, por meio de lavagem com tampão fosfato estéril (pH 7,2). Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo e mantidas à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, como descrito por Dos Santos e colaboradores (2013) (DOS SANTOS et al., 2013).

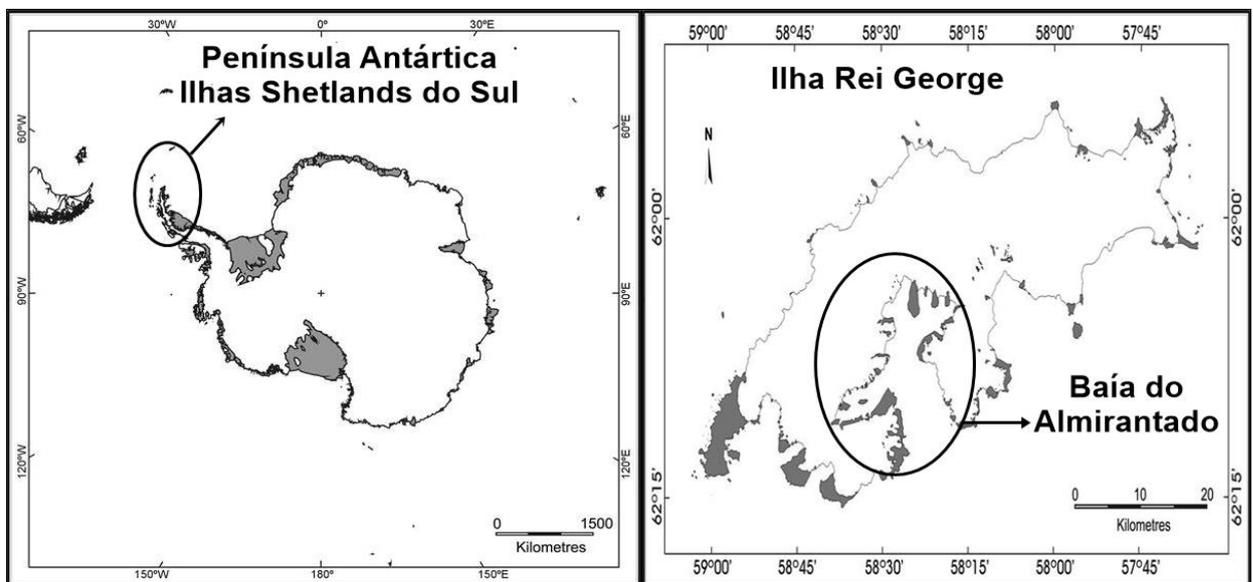
#### 3.3 Preparo das amostras

Os extratos, frações e subfrações isolados das algas e fungos endofíticos foram solubilizados a partir de uma solução de dimetilsulfóxido 100% (DMSO) de forma que a concentração final foi 3% por poço na placa de experimentação.

### 3.4 Coleta das algas

As algas *C. jacquinotii* e *A. mirabilis* foram coletadas na missão XXXIII através do Programa Antártico Brasileiro (período de Novembro a Março de 2014/2015 e 2015/2016 respectivamente) por integrantes do projeto "Biodiversidade, monitoramento, estratégias de sobrevivência e prospecção de macroalgas extremófilas da Antártica Marítima", MCTI/CNPq/FNDCT, Ação Transversal n° 64/2013, coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Pio Colepicolo Neto. As algas são provenientes da Baía do Almirantado, Ilha Rei George 61° 50' e 62° 15' S, 57° 30' e 59° 00' W (Figura 10). As algas foram etiquetadas, congeladas e enviadas ao Instituto de Botânica de São Paulo aonde foram identificadas e seus exemplares catalogados.

Figura 10 - Localização geográfica do local de coleta das algas *A. mirabilis* e *C. jacquinotii* nas Ilhas Shetlands do Sul, ilha Rei George, baía do Almirantado.

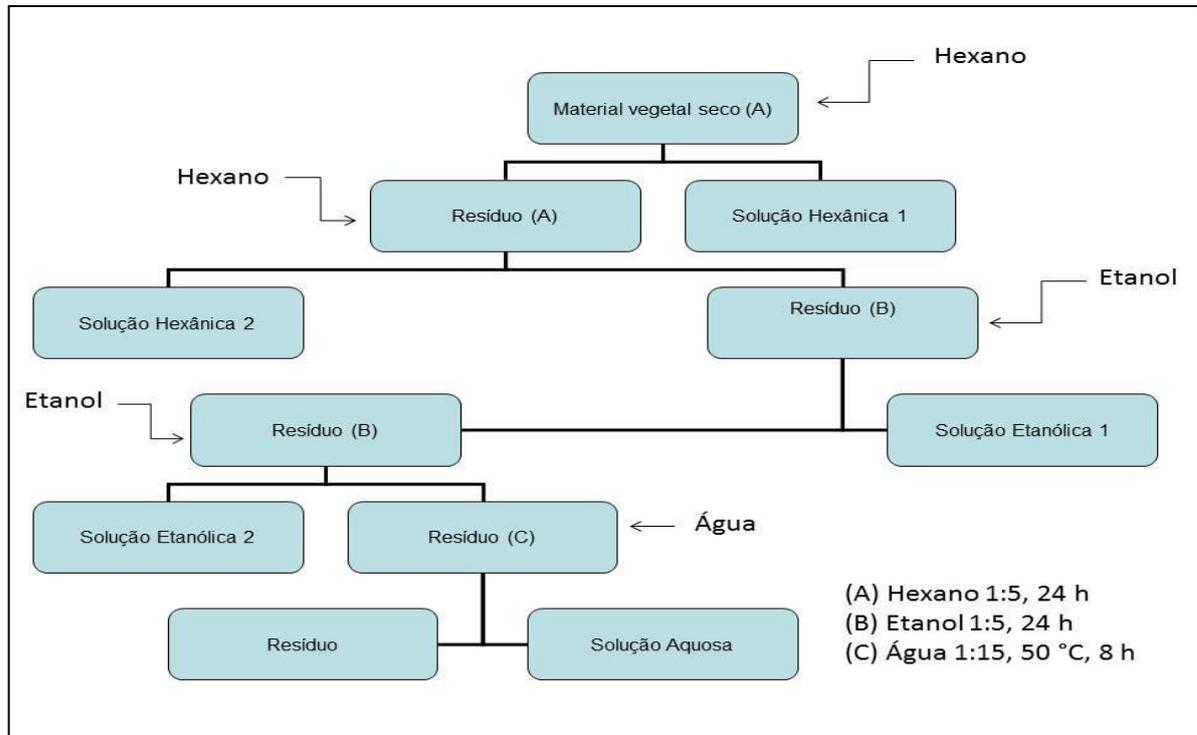


Fonte - Adaptado de Simões; Aigony-Neto; Bremer, 2004.

### 3.5 Obtenção do extrato algal

Toda a manipulação das algas e extratos algais, foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da FCF – UNESP, sob orientação do Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> André Gonzaga dos Santos. Para a obtenção do extrato bruto, as algas foram lavadas em água corrente, secas em estufa (Fanem<sup>®</sup>) com circulação forçada de ar a 40 °C durante 96 horas, em seguida, trituradas em moinho de facas até a obtenção de um material homogêneo com aspecto de pó com massa total utilizada de 440 g da alga *A. mirabilis* e 310 g da *C. jacquinoitii*. A partir da massa obtida, seguiu a extração sequencial por maceração com agitação ocasional (Figura 11), onde ao material vegetal seco (A), foi adicionado hexano (1:5 g/mL) deixado 24 horas, gerando a solução hexânica 1; ao resíduo (A) foi adicionado hexano (1:5 g/mL) deixado 24 horas gerando a solução hexânica 2. Ao resíduo (B) foi adicionado etanol (1:5 g/mL), deixado 24 horas, gerando a solução etanólica 1; ao resíduo (B), foi adicionado etanol (1:5 g/mL), deixado 24 horas, gerando a solução etanólica 2. Ao resíduo (C) foi adicionado água (1:15 g/mL) à 50 °C durante 8 horas, gerando a solução aquosa. As soluções hexânicas 1 e 2, foram reunidas gerando o extrato hexânico, assim como as soluções etanólicas 1 e 2, gerando o extrato etanólico. Os extratos foram secos em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura adequada.

Figura 11 - Representação esquemática da extração sequencial de metabólitos das algas *A. mirabilis* e *C. jacquintii* com solventes de polaridade crescente.



A extração sequencial ocorreu da seguinte forma: Ao material vegetal seco (A), foi adicionado hexano (1:5) e deixado 24 horas, gerando a solução hexânica 1; ao resíduo (A) foi adicionado hexano (1:5) e deixado 24 horas gerando a solução hexânica 2. Ao resíduo (B) foi adicionado etanol (1:5), deixado por 24 horas, gerando a solução etanólica 1; ao resíduo (B), foi adicionado etanol (1:5), deixado por 24 horas, gerando a solução etanólica 2. Ao resíduo (C) foi adicionado água (1:15) à 50 °C durante 8 horas, gerando a solução aquosa. As soluções hexânicas 1 e 2, foram reunidas gerando o extrato hexânico, assim como as soluções etanólicas 1 e 2, gerando o extrato etanólico. Os extratos foram secos em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura adequada.

### 3.6 Isolamento dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos

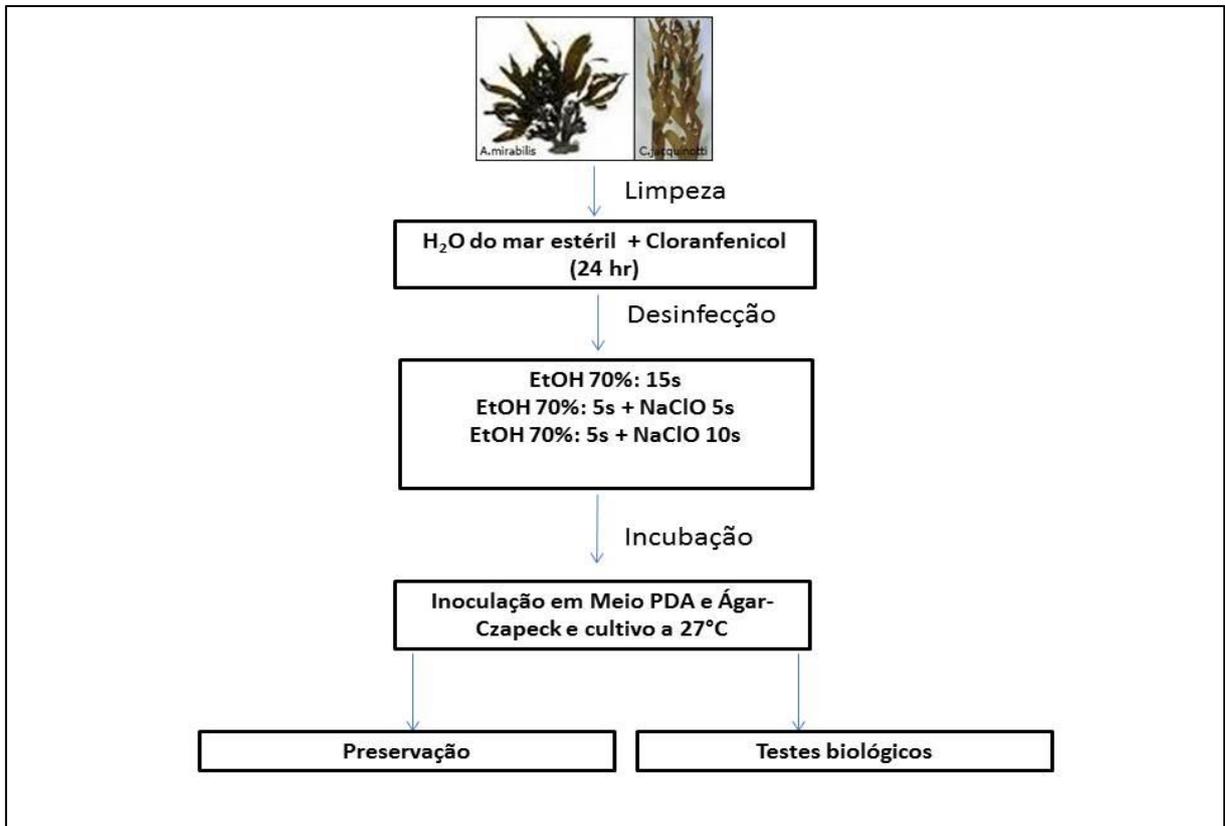
Todos os procedimentos de isolamento, cultivo e manipulação dos extratos e frações dos fungos endofíticos, foram realizados no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hosana Deboni e auxílio da Técnica de Laboratório Daniela Engracia Luz. Para o isolamento dos fungos endofíticos, foi seguida a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (1993) e Valadão (2012), com algumas modificações. As algas foram mantidas em água do mar, previamente esterilizada com 5% de cloranfenicol. Após 24 horas o material biológico foi desinfetado utilizando-se três métodos distintos para garantir apenas o crescimento de fungos endofíticos, como segue:

1. Método 1 (MI): lavagem com etanol 70% durante 15 segundos;

2. Método 2 (MII): lavagem com etanol 70% por 5 segundos, seguido de hipoclorito de sódio por 5 segundos;
3. Método 3 (MIII): etanol 70% durante 5 segundos, seguido de hipoclorito 10 segundos.

Após a desinfecção, as algas foram novamente lavadas com água do mar esterilizada e em seguida, foram seccionadas em fragmentos de 1x2 mm aproximadamente e inoculadas nos meios de cultura PDA Himedia<sup>®</sup> e Ágar-Czapek Himedia<sup>®</sup>. As placas de cultivo foram mantidas por aproximadamente nove dias a 27°C, e verificadas diariamente quanto à formação de colônias, a fim de observar o melhor meio para crescimento fúngico (Figura 12). Os fungos obtidos foram repicados nos meios de cultura que cresceram, até a obtenção de colônias puras (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; VALADÃO, 2012).

Figura 12 - Representação esquemática da obtenção de fungos endofíticos de *A. mirabilis* e *C. jacquinotii*.



As algas foram tratadas em água do mar esterilizada na presença cloranfenicol a 5%, seguida por desinfecção em três diferentes soluções de lavagens contendo etanol e/ou hipoclorito de sódio (MI, MII e MII), com posterior inóculo de seções de 1x2mm em meios de cultura adequados. Após o crescimento e isolamento de colônias puras, estas foram preservadas, ou cultivadas para obtenção de extratos para testes biológicos.

Os isolados estão preservados imersos em água do mar esterilizada e também em frascos inclinados contendo meio PDA, acrescidos de vaselina; ambos os métodos de preservação estão mantidos à 25 °C. Para obtenção do extrato fúngico bruto, realizou-se ativação dos fungos isolados em meio PDA por sete dias e seguiu um cultivo em escala de bancada, em triplicata para cada isolado. Para isto, três discos contendo o fungo foram retirados da placa de cultivo e com o auxílio de um *transfertube*<sup>®</sup> transferidos para frascos de vidro de 500 mL contendo 90 g de arroz parboilizado, previamente esterilizado por autoclavagem a 121 °C, 1 atm por 40 min, e incubado à 25 °C, durante 21 dias. Utilizou-se como controle, frascos contendo apenas arroz parboilizado esterilizado, para verificação da eficiência da descontaminação do meio sólido e para comprovar que os metabólitos produzidos são realmente dos fungos e não alguma interação com o substrato que proporcionou a atividade. Após 28 dias, o extrato foi obtido do mosto fermentado que foi deixado

em 100 mL de diclorometano:metanol (2:1) durante 24 h, depois macerado com posterior filtração e nova extração após mais 24 h no solvente citado. Os extratos foram secos em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura adequada.

### 3.7 Identificação dos fungos endofíticos

A identificação dos fungos isolados foi realizada por análise molecular no laboratório da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia V. Kress, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP-USP, seguindo metodologia previamente descrita por White e colaboradores (1990) através da amplificação por PCR e sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Sequence* (ITS) do DNA ribossomal de cada isolado fúngico.

Para a PCR foram utilizados 0,5 µM dos *primers* ITS1 (sequência 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (sequência 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990); 0,2 mM de dNTPs, 1X de tampão apropriado para enzima (buffer GC), 100 ng de DNA genômico dos fungos e 1 U de enzima *Phusion High-Fidelity* DNA Polimerase (Thermo Scientific<sup>®</sup>) em um volume final de 20 µL de reação. Em seguida, o produto de cada PCR foi separado em gel de agarose 1%. Os amplicons foram excisados do gel, purificados, cada banda contendo o produto da PCR foi excisada do gel e purificada com o kit de purificação de DNA de gel de agarose, *Gel Band*, de acordo com as normas do fabricante (Promega<sup>®</sup>, EUA). Em seguida cada amostra foi quantificada por espectrofotometria e a integridade observada em eletroforese de gel de agarose 1%.

A reação de sequenciamento do DNA de cada isolado fúngico foi realizada a partir da amplificação por PCR das regiões de interesse utilizando os *primers* descritos anteriormente. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP - Campus SP) com o aparelho ABI3730 DNA *Analyser* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro<sup>®</sup> Software (ChromasPro 1.7.6, Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD, Australia) e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

### 3.8 Fracionamento dos extratos algais

O fracionamento foi realizado a partir dos extratos que apresentaram bioatividade, para isso, os extratos foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD). Para os experimentos com CCD foram utilizadas placas de vidro de 29x5 cm, com 0,25 mm de espessura de sílica gel (Sorblin<sup>®</sup>) com 5-15 µm de diâmetro, como também placas prontas de sílica gel 60 G F<sub>254</sub> (Sigma<sup>®</sup>) com 8-12 µm de diâmetro e 200 µm de espessura. Foram pesados 5 mg de cada extrato, solubilizados em 1 mL de acetato de etila e aplicados cerca de 4 µL com o auxílio de um capilar na placa cromatográfica. As placas foram eluídas com diferentes fases móveis (hexano:acetato de etila (95:05); hexano:acetato de etila (1:1); acetato de etila (100%); acetato de etila:etanol (90:10), etanol 100%), secas em capela de exaustão, borrifadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% e inseridas em estufa a 110°C por 10 minutos observando a revelação. Após esta etapa, o fracionamento seguiu por extração em fase sólida.

O fracionamento consistiu na realização de uma extração em fase sólida (EFS) utilizando uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro empacotada com 10 cm de altura de sílica gel (60-200 mesh), 60Å, Sigma<sup>®</sup>. A quantidade de amostra utilizada foi calculada na proporção de 1:25 partes de sílica, totalizando 1,68 g de extrato e a eluição foi realizada com 3x a quantidade do volume morto, neste caso 150 mL, nas condições definidas no item anterior por CCD. A amostra foi permeada a sílica com solvente apropriado antes da eluição, em seguida, o volume de 150 mL para cada fase móvel definida foi inserido na coluna, e coletadas alíquotas de 50 mL. O eluído gerado foi reunido de acordo com sua similaridade observada por CCD, gerando as frações que seguiram para os testes biológicos.

### 3.9 Fracionamento dos extratos fúngicos

Para o fracionamento dos extratos fúngicos que apresentaram bioatividade, foi realizada previamente CCD utilizando placas prontas de sílica gel 60 G F<sub>254</sub> (Sigma<sup>®</sup>) com 8-12 µm de diâmetro e 200 µm de espessura. As condições de eluição foram: hexano:acetato de etila (40:60); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1) e metanol. O fracionamento foi realizado por cromatografia em coluna, utilizando uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro empacotada com 30 cm de altura de sílica gel

(60-200 mesh), 60Å, Sigma<sup>®</sup>. A quantidade de amostra utilizada foi calculada na proporção de 1:30 partes de sílica, utilizando 2,0 g de extrato. A eluição foi realizada em um gradiente crescente de polaridade, com 50 mL da fase móvel para cada condição, nas condições definidas anteriormente por CCD, sendo que para a última condição, foi adicionado 1% de hidróxido de amônio. As frações geradas foram reunidas de acordo com a similaridade observada por CCD.

### **3.10 Análise dos extratos e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Para a caracterização por CLAE, foi realizado um *clean-up* das amostras no intuito de remover interferentes da análise, pois além dos metabólitos secundários de interesse, os extratos contêm outros constituintes como fibras, proteínas e lipídeos, bem como este procedimento permite a obtenção de um extrato homogêneo e padronizado para a análise por CLAE (JARDIM, 2010).

Para isso, 10 mg de cada extrato foi diluído em metanol:água com volume final de 2 mL, em seguida foi montada uma coluna de vidro de 1,2 cm de diâmetro, preenchida com 1,5 cm de altura de sílica C18 (43-60 µm) Discovery Supelco<sup>®</sup>. A coluna foi condicionada com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL da fase móvel (metanol:água 98:02), a eluição foi realizada de tal forma que o volume final para cada extrato eluído foi de 5 mL. Após as amostras foram secas em capela de exaustão seguido de dessecador contendo sílica gel.

Para obtenção dos perfis cromatográficos as amostras foram analisadas por cromatografia em fase reversa, utilizando o equipamento para CLAE SHIMADZU<sup>®</sup>, modelo Prominence, composto por duas bombas, degaseificador, sistema de injeção automática e com detector com arranjo de fotodiodo e solventes grau HPLC. As amostras foram solubilizadas em 0,5 mL de metanol e filtradas em membrana de PVDF 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna C18 Shimadzu<sup>®</sup> (150 x 4,6mm, partícula de 5 µm) com pré-coluna Shimpack-Shimadzu<sup>®</sup> (10 x 4,6mm, partícula de 5 µm) temperatura do forno a 27°C, foi realizada varredura de 190 a 800nm, em detector UV-Vis DAD, o software utilizado foi LC Solutions<sup>®</sup>. A eluição foi realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0-2 min 5% B; 2-60 min 5-100% B; 60-65 min 100% B, com injeção de 40 µL de amostra.

### 3.11 Sub-fracionamento dos compostos algais e fúngicos

As frações que apresentaram melhor atividade leishmanicida foram sub-fractionadas por CLAE semipreparativa SHIMADZU®, utilizando coluna C18 (250 x 10 mm, partícula de 5 µm), com detector UV-Vis DAD Shimadzu® (SPD-M10 Avp), com sistema de integração computadorizado com software Cass-VP 5.02. Para isso foram estabelecidos métodos analíticos para as frações algais e fúngicas composto por água ultrapura (Fase A) e metanol (Fase B), em gradientes distintos para cada fração. Para a fração FeF5 e FeF6 do fungo endofítico, utilizou-se o seguinte gradiente de concentração: 0 min 18% B para FeF5 e 23,5% B para FeF6; 20 min 45,2% FeF5 B e 52,5% FeF6 B; 25 min 100% B FeF5 e FeF6; 27 min 100% B FeF5 e FeF6; 30 min 23,5% B FeF5 e FeF6, com fluxo de 5 mL/min e injeção de 1 mL de amostra. Para o sub-fracionamento das frações algais o método utilizado foi isocrático, com 88,5% da fase B durante 20 minutos, com fluxo de 2 mL/min com injeção de 1 mL de amostra.

### 3.12 Análise dos extratos e frações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H

Para a caracterização dos extratos e frações por RMN, foram utilizados de 10 a 15 mg de amostra diluídas nos solventes deuterados clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>), metanol (CD<sub>3</sub>OD) e DMSO (DMSO-*d*6), filtrados e inseridos em tubos específicos para RMN. As análises foram realizadas em Espectrômetro Bruker® 7,0 Tesla, operando em gradiente de pulso a 300 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H. Como referência interna foram os sinais do resíduo de solvente não deuterado nos solventes deuterados - CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH e DMSO.

### 3.13 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM)

As análises por Espectrometria de Massas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, no Instituto de Química Universidade de São Paulo, com a colaboração do Profº Drº Pio Colepicolo e do Drº Leonardo Villela. As frações mais promissoras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas, com ionização por eletrospray e

detecção em espectrômetro de massas por tempo de voo. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido ultra rápido modelo UFLC (Shimadzu<sup>®</sup>) composto por um degaseificador DGU-20A3R, duas bombas LC-20AD, um auto-injetor SIL-20A HT, um forno de coluna CTO-20A e controladora CBM-20A. O sistema de detecção de massas de tempo de voo (“*time of flight*” – TOF) utilizado foi o Bruker microTOF com ionização por eletrospray. As separações foram realizadas em coluna C18 Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex, 150 x 3 mm, 2,6µm, 100Å, temperatura do forno 30°C, utilizando como fase móvel A água ultrapura/0,1% de ácido fórmico e acetonitrila como fase móvel B. O gradiente de eluição empregado nas análises foi o seguinte: (% de fase B): 0 – 2 min (35%), fluxo 0,8 mL/min; 2 – 30 min (80%), fluxo 0,8 mL/min; 30,5 – 35 min (80%), fluxo 1,0 mL/min; 37 min (35%), fluxo 0,8 mL/min; 40 min (35%), fluxo 0,8 mL/min, com injeção de 10 µL de amostra a cada corrida.

O espectrômetro de massas foi configurado de modo a fazer uma varredura de  $m/z$  compreendidas entre 50 e 1000 em modo positivo seguindo os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 3200 V; diferença do potencial -500 V; pressão do gás de nebulização 5,0 Bar; temperatura de secagem 240 °C; e fluxo de gás de secagem 10 L/min.

Os cromatogramas foram gerados a partir do sinal obtido pelo modo TIC “*total ion chromatogram*”, no qual os picos correspondem ao somatório de todas as relações massa carga  $m/z$  analisadas em um determinado tempo, relacionado ao tempo de retenção, demonstrado em minutos. Os dados foram confrontados com os bancos: *Metlin* (<https://metlin.scripps.edu/>); *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); *Chemspider* ([www.chemspider.com/](http://www.chemspider.com/)); *Chebi* (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>); HMDB (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>), *Lipdmass* (<http://www.lipidmaps.org/>), MMCD (<http://mmcd.nmr.fam.wisc.edu/>) e *SciFinder* (<https://scifinder.cas.org>).

### 3.14 Bioensaios para determinação da atividade leishmanicida e citotóxica dos extratos, frações e sub-frações das algas e fungos endofíticos associados

#### 3.14.1 Ensaio de avaliação da atividade antipromastigota

A avaliação da atividade antipromastigota dos extratos algais, fungicos, frações, subfrações e compostos isolados, foi realizada utilizando-se a espécie *L. amazonensis*. Os parasitos foram cultivados em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (TPP®) à 28 °C em meio de cultura LIT durante aproximadamente cinco dias até atingir a fase logarítmica tardia de crescimento e, em seguida, o ensaio foi realizado em placas de 96 poços (TPP®) de acordo com a Figura 13.

Figura 13 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração decrescente de diluição ↓	A	97 µL de <i>Leishmania</i> + 3 µL do Extrato			97 µL de Meio de cultura + 3 µL do Extrato			97 µL de <i>Leishmania</i> + 3 µL de pentamidina ou anfotericina b			97 µL de Meio de cultura + 3 µL de pentamidina ou anfotericina b		
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H	100 µL <i>Leishmania</i>			100 µL Meio de Cultura			100 µL <i>Leishmania</i>			100 µL Meio de Cultura		

Para cada poço foram utilizados 97 µL da suspensão de parasitos (concentração de  $1 \times 10^7$  parasito/mL) e 3 µL dos extratos em diluições seriadas de 1:2, partindo-se de uma concentração inicial de 500 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se parasitos incubados na presença de anfotericina B ou pentamidina em diluições seriadas de 1:2, partindo-se de 100 µg/mL de cada fármaco; o controle negativo constituiu-se em suspensão de parasitos na ausência dos extratos/frações.

Após a montagem das placas, as substâncias foram diluídas DMSO 3%, e incubadas em estufa a 28 °C durante 72 horas, seguido por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer para os extratos e frações. Para os compostos puros, após este período seguiu o teste colorimétrico com MTT/PMS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide/Phenazine Methosulfate), adicionando 10 µL por poço de MTT 6 mM /PMS 0,7 mM, o qual é reduzido a cristais de formazana por enzimas mitocondriais de células viáveis. As células foram incubadas durante 75 minutos, seguido da adição de 100 µL de SDS 10%/HCl 1 M, por 30 minutos, a fim de se solubilizar os cristais de formazana gerados. Finalmente,

a leitura da placa foi realizada no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro UV-visível (DOS SANTOS et al., 2013).

A porcentagem de parasitos mortos expressos em porcentagem de citotoxicidade foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GÓMEZ-BARRIO, 2000).

$$\%C = \left[ \frac{(G_C - G_P)}{G_C} \right] \times 100$$

Onde:

$$G_C = A_C - A_m$$

Sendo que,  $G_C$  representa o número de parasitos/mL nos poços controles com ausência de substância;  $A_C$  o valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitos; e  $A_m$  o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito.

$$G_P = A_p - A_{pm}$$

Sendo que,  $G_P$  representa o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias;  $A_p$  o valor da absorbância nos testes e  $A_{pm}$ , o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito.

Os resultados foram calculados por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat e os resultados foram expressos as forma de concentração inibitória para 50% dos parasitas ( $CI_{50-PRO}$ ). Os dados foram apresentados como média e desvio padrão, a partir de duas replicatas independentes.

### 3.14.2 Ensaio de avaliação da atividade citotóxica contra células de mamíferos

A avaliação da atividade citotóxica, foi feita de acordo com Dutra e colaboradores (2014), foram extraídos macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos machos, com idade entre 4 a 6 semanas, raça swiss, tal procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade, sob o protocolo CEUA/FCF/CAr: 42/2016.

Os macrófagos obtidos foram cultivados em meio RPMI e após a contagem diferencial apenas de células macrofágicas em câmara de Neubauer e ajuste para  $5 \times 10^5$  macrófagos/mL, 100  $\mu$ L da suspensão celular foram inoculados para adesão em placas de 96 poços a 37 °C em estufa com 5%  $CO_2$  por 4 horas. Posteriormente

a aderência das células, o meio foi renovado e os extratos, frações, subfrações e compostos puros das algas e fungos endofíticos, como também dos fármacos de referência foram adicionados e incubados por 24 horas na mesma condição descrita no passo anterior. Após este período, a determinação de macrófagos viáveis foi realizada por coloração com MTT/PMS, conforme descrito no tópico anterior. Finalmente, a leitura da placa foi realizada no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram expressos em forma de  $CC_{50}$ , realizados por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat (DUTRA et al., 2014).

Adicionalmente foi calculado o Índice de Seletividade (IS)  $IS = CC_{50} / CI_{50-AMA}$ , que indica o índice de segurança da substância em análise, índices maiores que 10 sugerem que o composto seja seguro (LARGERON et al., 1999; KATSUNO et al., 2015).

### 3.14.3 Ensaio da atividade antiamastigota

Após a adesão de macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$  células/mL), distribuídos em lamínulas circulares em placas de 24 poços, estes foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* no final da fase exponencial do crescimento, à razão 5:1 e mantidos a 37°C em 5%  $CO_2$  por 4h. Ao final, os parasitos não fagocitados foram removidos por lavagem, e então os compostos, solubilizados em meio fresco em concentrações variáveis de 1.56-100ug/mL, foram adicionados e a placa foi mantida a 37°C, 5% de  $CO_2$  por 24h (DUTRA et al., 2014). Por fim, o meio foi removido e as lamínulas fixadas com metanol e coradas com Giemsa<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos como a concentração inibitória para 50% das formas amastigotas intracelulares ( $CI_{50-AMA}$ ) determinados por regressão não-linear. E os resultados expressos como média  $\pm$  DP de duas replicatas independentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção dos extratos das algas *A. mirabilis* e *C. jacquinoitii*

Para obtenção de metabólitos secundários de algas marinhas existem vários métodos, incluindo a extração por solventes, enzimáticos ou por fluido supercrítico (ZHANG et al., 2008; ANDREGUETTI, 2015). Porém os procedimentos que utilizam solventes são os mais empregados devido ao seu custo mais baixo (SANTOS et al., 2010). Desta forma, neste estudo utilizamos a metodologia de extração sequencial baseada em solventes para obtenção dos extratos algais empregados no monitoramento bioguiado da atividade leishmanicida. O rendimento dos extratos obtidos em relação ao material seco (440 g para *A. mirabilis* e 310 g para *C. jacquinoitii*) para variou entre 0,25 e 2,5%, com exceção do extrato aquoso da alga *C. jacquinoitii*, o qual apresentou rendimento superior a 7% (Tabela 1).

Tabela 1 - Massa bruta e rendimentos obtidos para os extratos aquoso, etanólico e hexânico.

Alga	Extrato	Massa (g)	Rendimento(%)
<i>A. mirabilis</i>	Aquoso	11,0	2,5
	Etanólico	6,7	1,5
	Hexânico	5,9	1,7
<i>C. jacquinoitii</i>	Aquoso	23,7	7,7
	Etanólico	3,5	1,1
	Hexânico	0,8	0,2

A variação no rendimento de substâncias extraídas é comum e pode ser atribuída ao tipo de substâncias presentes nas algas em estudo ou métodos de extração utilizados como pode ser verificado em diferentes trabalhos da literatura (NETO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; ANDREGUETTI, 2015; SASSAKI, 2015). Baixos rendimentos, como o que obtivemos, representam uma das desvantagens de se trabalhar com produtos naturais bioativos, o que dificulta o isolamento e caracterização de substâncias de interesse econômico (FREARSON; COLLIE, 2009).

## 4.2 Isolamento de fungos endofíticos e obtenção de seus extratos

Os métodos de isolamento de fungos endofíticos de algas marinhas envolvem a utilização de agentes sanitizantes e desinfetantes, tais como hipoclorito de sódio e cloranfenicol, utilizados neste estudo. Este processo de sanitização e desinfecção é obrigatório para eliminação de microrganismos epifíticos (KJER et al., 2010), podendo variar de laboratório para laboratório, seguido de inoculação em meio de cultura apropriado, incluindo os meios PDA e ágar-Czapek (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; FLEWELLING; JOHNSON; GRAY, 2013; MEDINA et al., 2016).

Neste estudo, a metodologia empregada proporcionou o isolamento de cinco fungos endofíticos, sendo que o meio de cultura PDA foi aquele que proporcionou o crescimento de quatro isolados, número maior que aquele observado em ágar-Czapek, que gerou apenas um único isolado (Tabela 2). De fato, o meio de cultura e as condições de cultivo (temperatura, pH, fonte de carbono, agitação, etc), são determinantes para o crescimento fúngico, não representando, necessariamente, a real diversidade de microrganismos presentes na amostra analisada (KJER et al., 2010). Os isolados foram cultivados para posterior preservação e obtenção de extratos para análise de atividade leishmanicida.

Tabela 2 - Fungos endofíticos isolados a partir das algas *C.jacquinotii* e *A.mirabilis*.

Alga	Código do Fungo isolado
<i>C. jacquinotii</i>	CjCzapeckMII <sub>2</sub>
	AmCzapeckMII <sub>2</sub> , AmpdbaMII <sub>2</sub> ,
<i>A. mirabilis</i>	AmpdbaMI <sub>2</sub> ,
	AmpdbbMI <sub>2</sub>

Cj = *C. jacquinotii*; Am = *A. mirabilis*; Czapeck/pda = meios de cultura; a/b = posição na placa; MI/MII/MIII = métodos de desinfecção; 1 ou 2 indicação da placa que foi isolado.

O número de isolados aqui obtidos está diretamente relacionado tanto com as técnicas de desinfecção e sanitização empregadas, quanto dos meios de cultivo utilizados. Esta afirmação é corroborada pelos dados obtidos por Godinho et al. (2013) e Loque et al. (2010), os quais utilizaram apenas água do mar para lavagem

das algas e empregaram outros meios de cultura, como ágar marinho acrescidos de glicose (2%) e cloranfenicol (200ug/mL), obtendo cerca de 25 isolados por alga.

Após sucessivos repiques, as linhagens puras foram cultivadas em meio de arroz para produção de extrato diclorometano:metanol (2:1), onde seus rendimentos foram calculados com relação ao peso de substrato utilizado para a fermentação (90 g de arroz) (Tabela 3).

Tabela 3 - Massa bruta e rendimento finais obtidos, após o cultivo em meio arroz e extração com diclorometano:metanol.

<b>Código Fungo</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
AmCzapeckMII2	4,6	5,2
AmpdaaMII2	7,4	8,2
AmpdbaMI2	6,7	7,5
AmpdbbMI2	3,1	3,5
CjCzapeckMII2	7,5	8,3

A produção de metabólitos secundários fúngicos *in vitro* depende de vários fatores de cultivo que influenciam o rendimento final dos extratos como aquelas condições que mimetizam o habitat natural do microrganismo como temperatura, pH, fonte de carbono, agitação, entre outros (KJER et al., 2010; ARAUJO et al., 2016). Nas condições experimentais aqui empregadas, obtivemos rendimentos extrativos satisfatórios para o nosso propósito de identificação de metabólitos bioativos, sendo que o isolado AmpdbaMII2 apresentou o maior rendimento extrativo.

### **4.3 Monitoramento bioguiado e fracionamento de extratos algais bioativos para atividade leishmanicida**

#### **4.3.1 Avaliação da bioatividade dos extratos algais**

Os extratos obtidos a partir das algas antárticas *A. mirabilis* e *C. jacquinotii* foram utilizados para avaliação da atividade anti-promastigota pelo método de contagem em câmara de Neubauer. Dos seis extratos avaliados, apenas aqueles oriundos das extrações com hexano ou etanol apresentaram atividade leishmanicida ( $CI_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 4). A atividade do extrato etanólico de *A. mirabilis* ( $CI_{50} =$

108 ± 22,65 µg/mL) foi duas vezes mais potente que o extrato etanólico de *C. jacquiniotii* (CI<sub>50</sub> = 215 ± 52,4 µg/mL). Em relação ao índice de seletividade (IS), o extrato etanólico de *C. jacquiniotii* foi cinco vezes mais seletivo para o parasito que aquele apresentado por *A. mirabilis*.

Tabela 4 - Atividade biológica dos extratos das algas *C. jacquiniotii* e *A. mirabilis* frente à formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos.

Alga	Extrato	CI <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)	IS	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. mirabilis</i>	Aquoso	> 500	(n.d)	-
<i>C. jacquiniotii</i>	Aquoso	> 500	(n.d)	-
<i>A. mirabilis</i>	Etanólico	108 ± 22,65	(0,5)	59,02 ± 0,10
<i>C. jacquiniotii</i>	Etanólico	215 ± 52,40	(> 2,3)	>500
<i>A. mirabilis</i>	Hexânico	176 ± 11,31	(0,26)	46,10 ± 10,40
<i>C. jacquiniotii</i>	Hexânico	20 ± 3,30	(0,64)	12,90 ± 1,50
pentamidina	-	10,20 ± 0,85	(3,5)	35,69 ± 6,84
anfotericina B	-	3,20 ± 0,03	(7,2)	23,10 ± 2,52

n.d – não detectado

Para os extratos hexânicos, temos que, *C. jacquiniotii* apresentou atividade biológica cerca de nove vezes mais potente (CI<sub>50</sub> = 20 ± 3,3 µg/mL IS = 0,64) que aquele apresentado pela alga *A. mirabilis* (CI<sub>50</sub> = 176 ± 11,31 µg/mL; IS = 0,26). Nota-se que ambos extratos apresentam baixa seletividade para o parasito (Tabela 4). No entanto, é importante considerar que nesta etapa estamos avaliando extratos e que as diferentes substâncias presentes podem estar contribuindo tanto para a atividade parasiticida quanto citotóxica, portanto, prosseguimos para a etapa de fracionamento.

#### 4.3.2 Análise química dos extratos bioativos

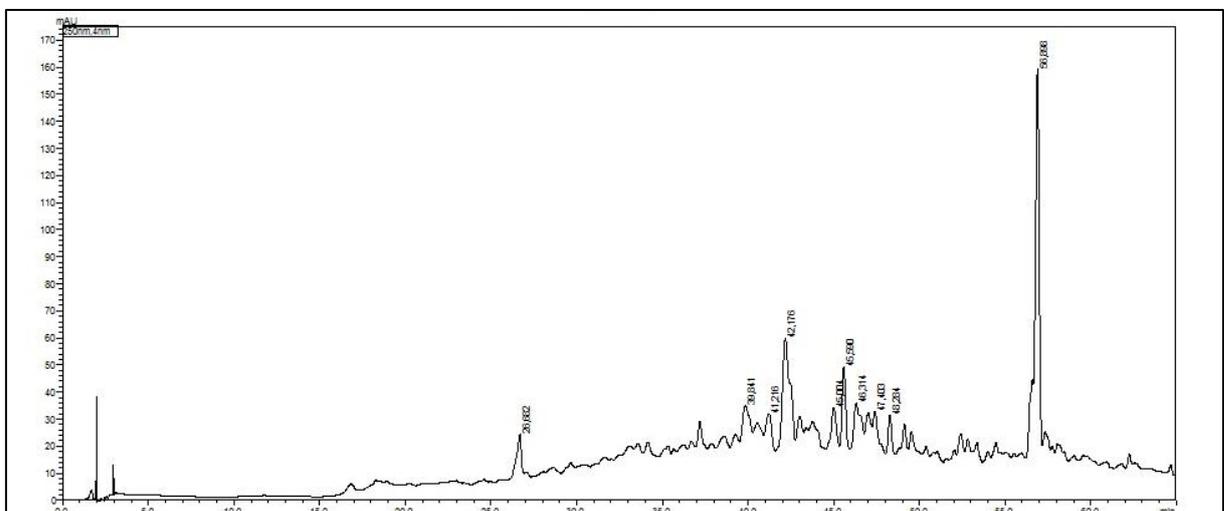
Embora o extrato etanólico das algas *A. mirabilis* e *C. jacquiniotii* também tenham apresentado atividade leishmanicida, decidimos explorar inicialmente apenas os extratos hexânicos para identificação de possíveis substâncias bioativas, não descartando a possibilidade de continuidade da caracterização dos demais extratos. Para as análises realizadas por CLAE em fase reversa foi escolhido um

gradiente exploratório, que permitiu que substâncias com maior polaridade fossem eluídas primeiro e substâncias com menor polaridade eluídas posteriormente (VOGEL; AFONSO, 2000).

Nas Figuras 14 e 15 encontram-se os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD onde é possível observar variabilidade nos extratos hexânicos, com poucos picos de alta absorbância, sendo que para o extrato de *A. mirabilis* há destaque para um pico majoritário no tempo de retenção ( $t_R$ ) de 57 min (250 nm) e alguns picos de média intensidade com  $t_R$  de 40 a 50 minutos (250 nm). Já para o extrato de *C. jacquintii*, observa-se vários picos de média intensidade, com destaque para os picos com  $t_R$  de 35 a 55 minutos, o que indica a presença de metabólitos secundários de baixa polaridade em ambos extratos hexânicos.

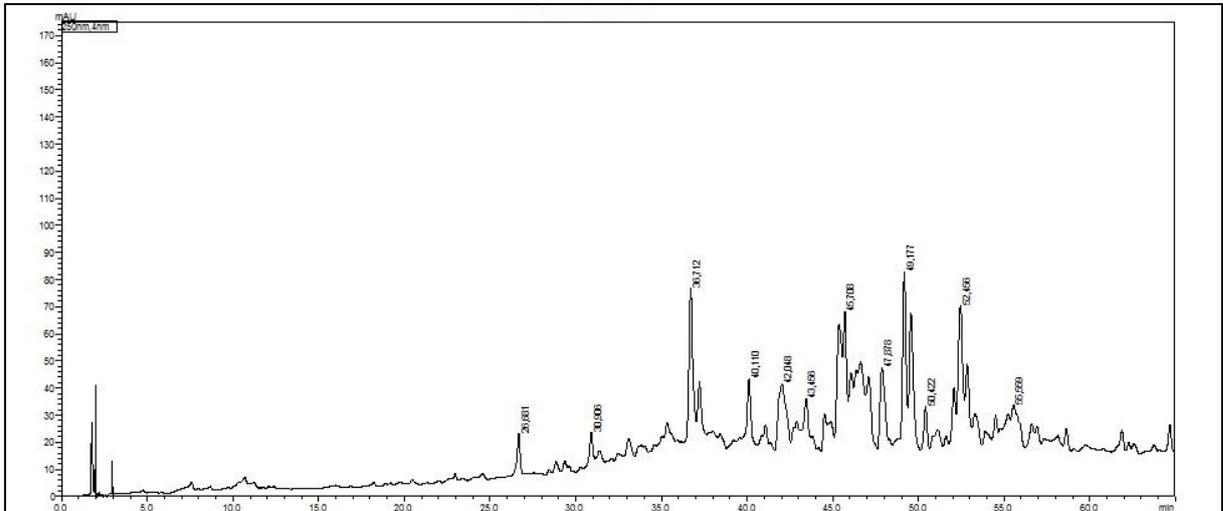
As absorções nos comprimentos de 250, 280 e 330 nm, Figuras 16 e 17, sugerem a presença de compostos fenólicos ou ainda alcenos conjugados (SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2007; GORINSTEIN et al., 1993).

Figura 14 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* monitorado em  $\lambda = 250$  nm.



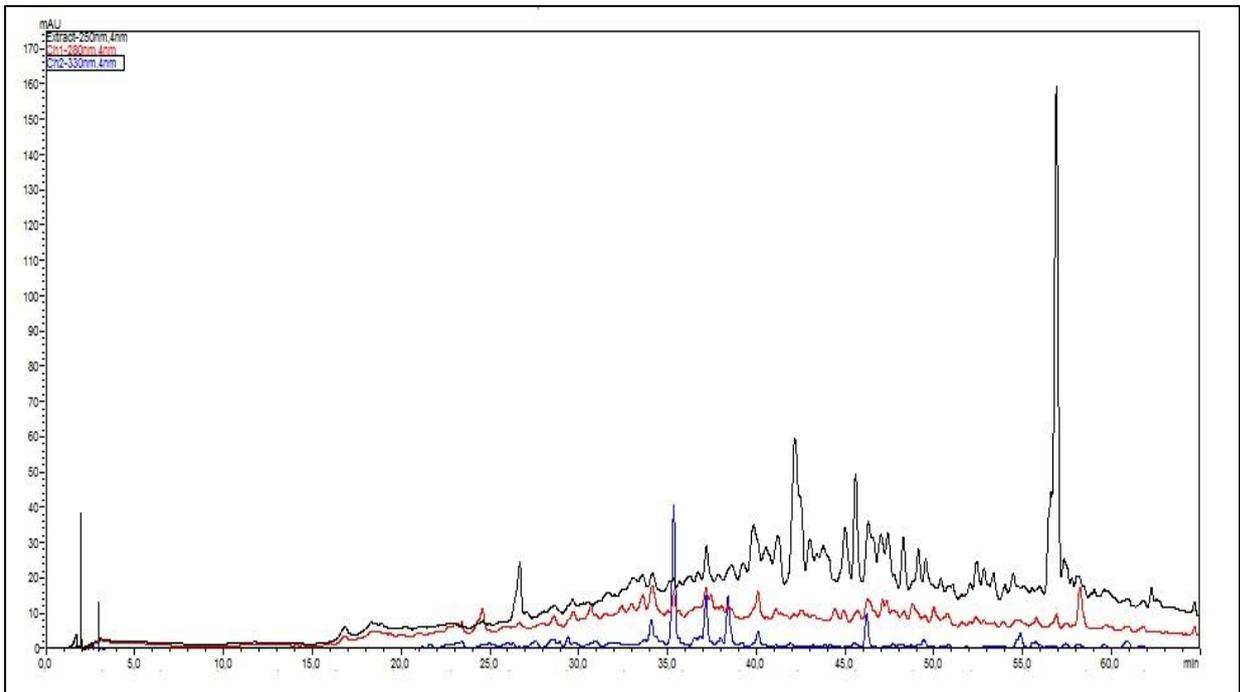
Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0-2 min 5% B; 2-60 min 5-100% B; 60-65 min 100% B, com injeção de 40  $\mu$ L de amostra.

Figura 15 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga *C. jacquiniotii* monitorado em  $\lambda = 250$  nm.



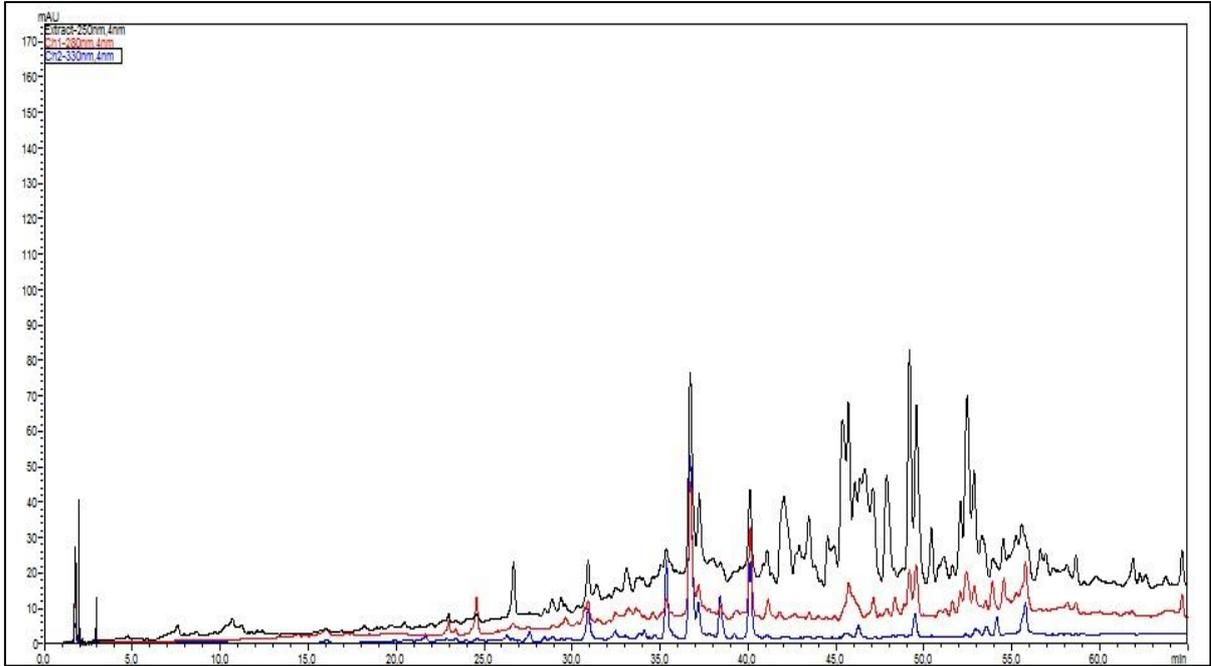
Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0-2 min 5% B; 2-60 min 5-100% B; 60-65 min 100% B, com injeção de 40  $\mu$ L de amostra.

Figura 16 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* monitorado em  $\lambda = 250$  nm (preto),  $\lambda = 280$  nm (vermelho) e  $\lambda = 330$  nm (azul).



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0-2 min 5% B; 2-60 min 5-100% B; 60-65 min 100% B, com injeção de 40  $\mu$ L de amostra.

Figura 17 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato hexânico da alga *C. jacquinoitii* monitorado em  $\lambda = 250$  nm (preto),  $\lambda = 280$  nm (vermelho) e  $\lambda = 330$  nm (azul).



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0-2 min 5% B; 2-60 min 5-100% B; 60-65 min 100% B, com injeção de 40  $\mu$ L de amostra.

Figura 18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

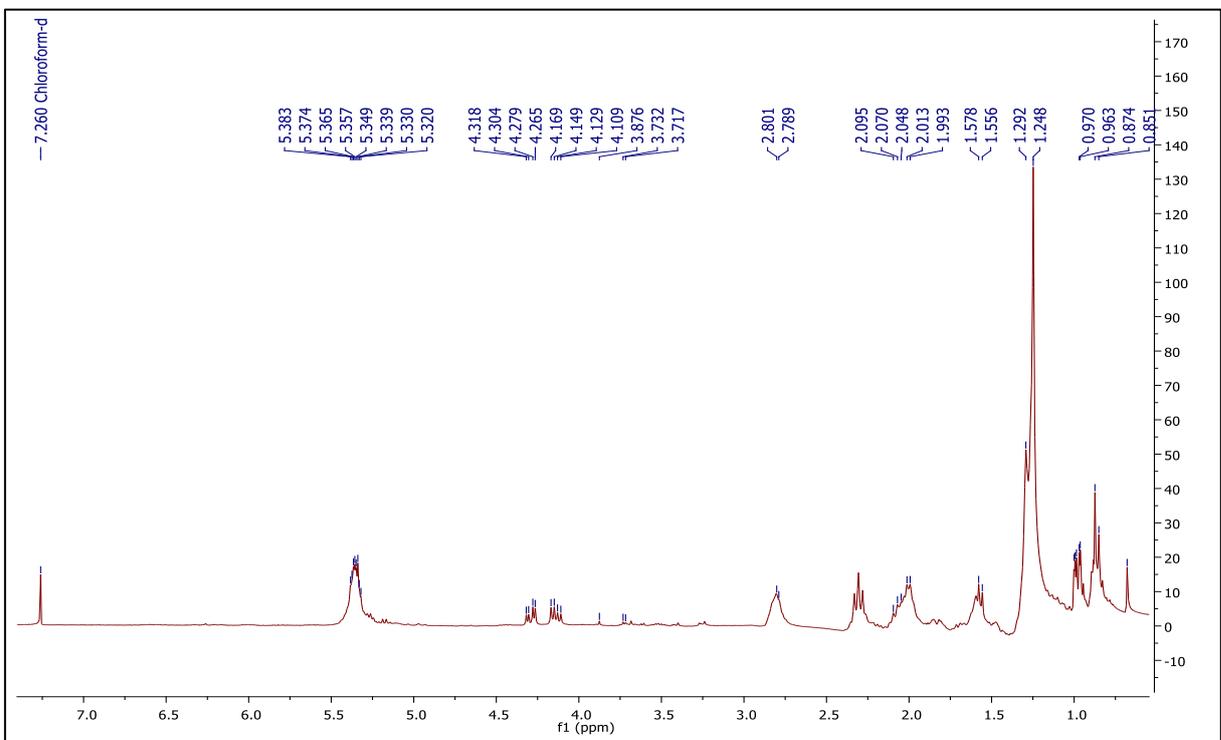
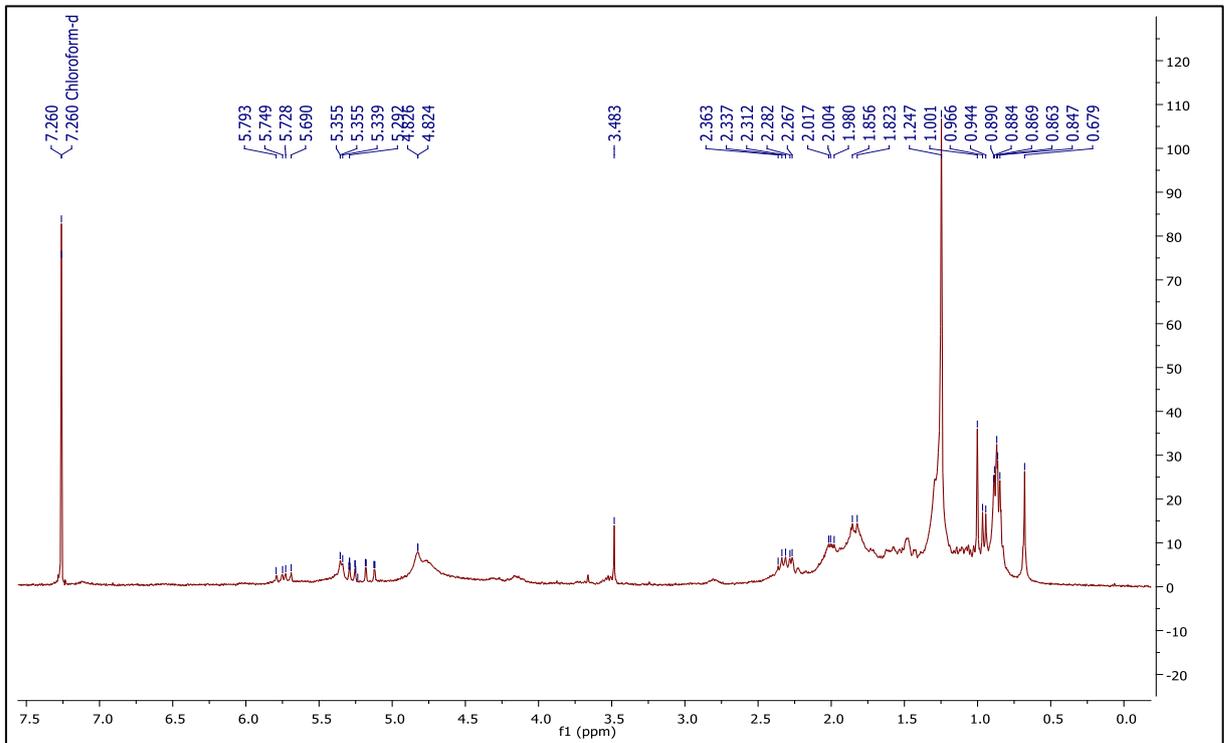


Figura 19 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico da alga *C. jacquintii* em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das Figuras 16 e 17, são bastante similares, sendo observados sinais de baixa e média intensidade na faixa espectral observada correspondente a hidrogênios metílicos com valores de  $\delta$  entre 0,7 e 1,0 e metilênicos com valores de  $\delta$  entre 1,2 e 1,6 ppm, que indicam hidrocarbonetos saturados ou outras substâncias de baixa polaridade, e alguns sinais de baixa intensidade com valores de  $\delta$  entre 4 e 6 que sugerem a presença de hidrogênios de alcenos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

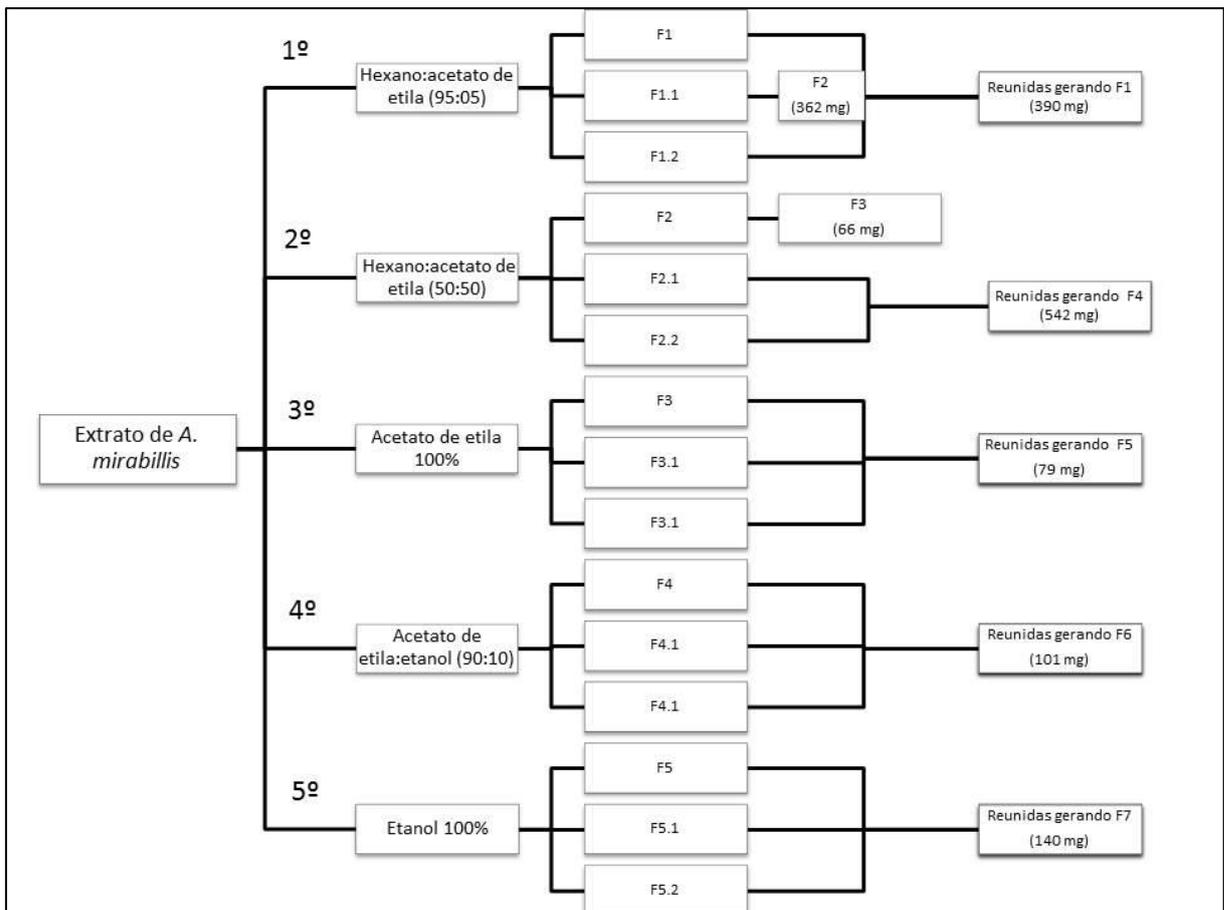
#### 4.3.3 Fracionamento dos extratos e avaliação de bioatividade

A Extração em Fase Sólida (EFS) foi escolhida como técnica para o fracionamento dos extratos algais por ser uma técnica de separação líquido-sólido utilizada comumente para concentrar e/ou extrair analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas, porém, também pode ser aplicada para amostras

sólidas pré-extraídas com solventes, como foi nosso caso (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; JARDIM, 2010).

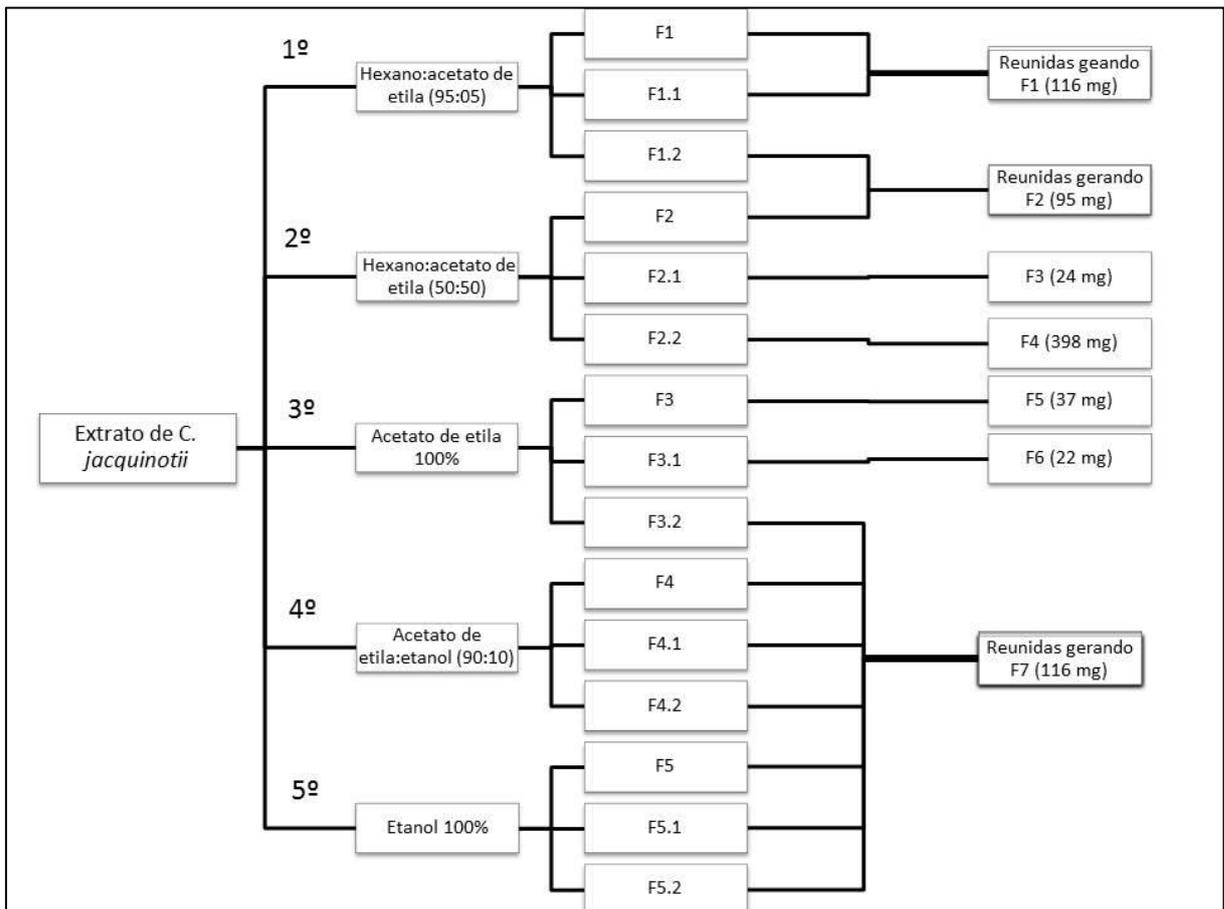
O fracionamento por EFS dos extratos hexânicos resultou em sete frações para a alga *A. mirabilis*, e sete para *C. jacquinotii*, as quais foram agrupadas de acordo com a similaridade química observada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Figuras 18 e 19).

Figura 20 - Representação esquemática do fracionamento do extrato hexânico de *A. mirabilis*.



O extrato hexânico de *A. mirabilis* foi fracionado por Extração em Fase Sólida (EFS) utilizando eluentes distintos: 1º refere-se à mistura hexano:acetato de etila (95:05), 2º, hexano:acetato de etila (50:50), 3º, acetato de etila 100%, 4º, acetato de etila:etanol (90:10) e 5º, etanol 100%. As frações geradas (Fn.n) foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a similaridade química observada.

Figura 21 - Representação esquemática do fracionamento do extrato hexânico de *C. jacquinotii*.



O extrato hexânico de *C. jacquinotii* foi fracionado por Extração em Fase Sólida (EFS) utilizando eluentes distintos: 1º refere-se à mistura hexano:acetato de etila (95:05), 2º, hexano:acetato de etila (50:50), 3º, acetato de etila 100%, 4º, acetato de etila:etanol (90:10) e 5º, etanol 100%. As frações geradas (Fn.n) foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a similaridade química observada.

O ensaio de atividade anti-promastigota para as frações obtidas foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.12, com diluição seriadas (1:2) a partir de 100 µg/mL. A Tabela 5 mostra o resultado em  $CI_{50}$  das frações obtidas a partir de ambas espécies, onde é possível observar que F3 ( $CI_{50}$  61,4 ± 9,1 µg/mL) e F6 ( $CI_{50}$  = 73,4 ± 0,4 µg/mL) de *A. mirabilis* foram as únicas frações com atividade leishmanicida, sendo esta aproximadamente duas vezes maior que aquela observada no seu extrato bruto ( $CI_{50}$  = 176 ± 11,31 µg/mL). Para a alga *C. jacquinotii*, foi observada atividade em todas as frações, com destaque para F4 ( $CI_{50}$  = 25,5 ± 0,2 µg/mL) e F6 ( $CI_{50}$  = 36,1 ± 1,6 µg/mL), que apresentaram atividade leishmanicida semelhante a do extrato bruto ( $CI_{50}$  = 20 ± 3,30 µg/mL).

Tabela 5 - Atividade biológica das Frações obtidas dos extratos hexânicos das algas *C. jacquinotii* e *A. mirabilis*, frente à formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos.

Alga	Fração	Massa (mg)	CI <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)	IS	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. mirabilis</i>	F1	390	> 100	(n.d)	-
	F2	362	> 100	(n.d)	-
	F3	66	61, 30 ± 9,10	(> 1,6)	> 100
	F4	542	> 100	(n.d)	-
	F5	79	> 100	(n.d)	-
	F6	101	73, 40 ± 0,40	(> 1,4)	> 100
	F7	140	> 100	(n.d)	-
<i>C. jacquinotii</i>	F1	116	89,90 ± 0,60	(n.d)	-
	F2	95	50 ± 0,90	(> 2)	> 100
	F3	24	41,80 ± 0,70	(> 2,4)	> 100
	F4	398	25,50 ± 0,20	(1,2)	31,50 ± 0,50
	F5	37	52 ± 0,05	(> 1,9)	> 100
	F6	22	36,20 ± 1,65	(> 2,8)	> 100
	F7	116	59,9 ± 2,80	(> 1,6)	> 100
pentamidina	-		10,20 ± 0,85	(3,5)	35,69 ± 6,84
anfotericina B	-		3,20 ± 0,03	(7,2)	23,10 ± 2,52

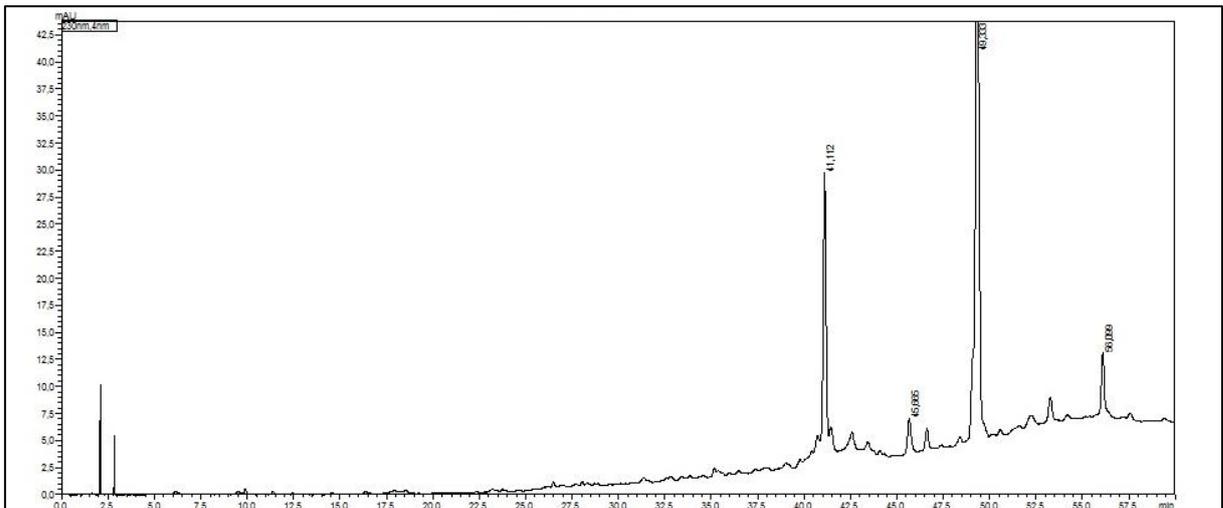
n.d não detectado

As frações F3 e F6 de *A. mirabilis* apresentaram menor citotoxicidade (CC<sub>50</sub> > 100 µg/mL) em relação ao extrato bruto (CC<sub>50</sub> = 46,10 ± 10,40 µg/mL). Para a alga *C. jacquinotii* as frações obtidas (F1-7) também apresentaram toxicidade menor que o extrato bruto (CC<sub>50</sub> = 12,90 ± 1,50 µg/mL), sendo F4 (CC<sub>50</sub> = 31,50 ± 0,50 µg/mL) e F6 (CC<sub>50</sub> > 100 µg/mL) as mais ativas.

#### 4.3.4 Análise química das frações bioativas e sub-fracionamento para avaliação da bioatividade

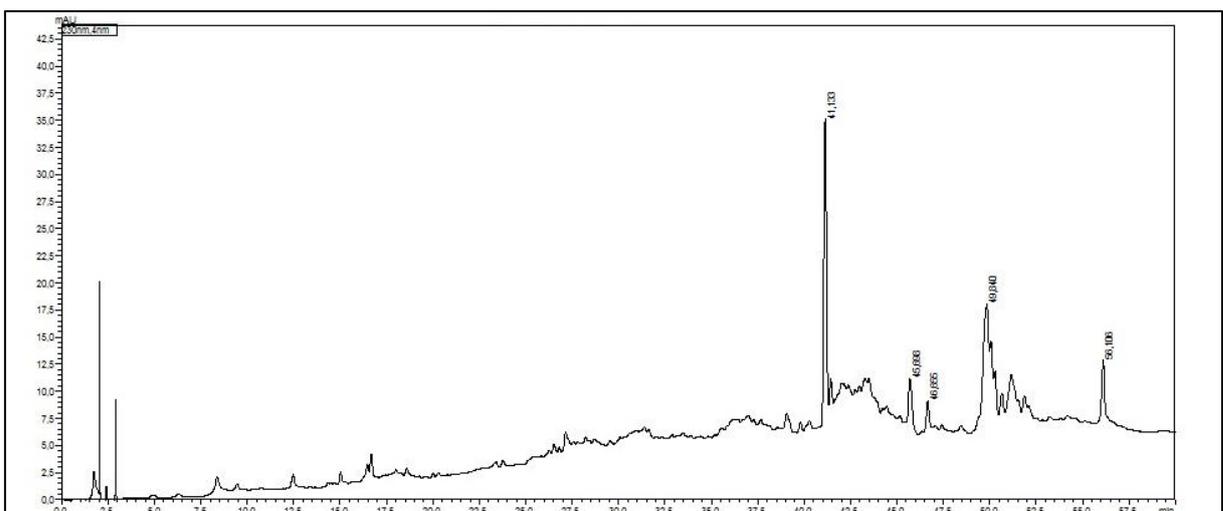
A análise química das frações algais bioativas foi realizada inicialmente por CLAE-DAD. Esta análise revelou que as frações apresentam perfis cromatográficos semelhantes, indicando que podem apresentar constituintes químicos similares (Figuras 20 e 21).

Figura 22 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da fração 3 obtida por fracionamento do extrato hexânico alga *A. mirabilis*, monitorado em  $\lambda = 250$  nm.



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) metanol: 0-2 min 5% B; 2-50 min 5-100% B; 50-60 min 100% B, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra.

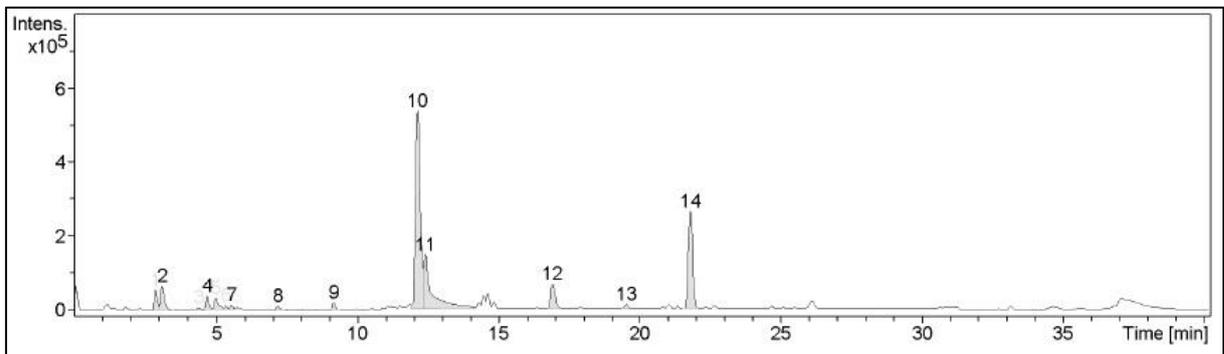
Figura 23 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD da fração 6 obtida por fracionamento do extrato hexânico alga *A. mirabilis*, monitorado em  $\lambda = 250$  nm.



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) metanol: 0-2 min 5% B; 2-50 min 5-100% B; 50-60 min 100% B, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra.

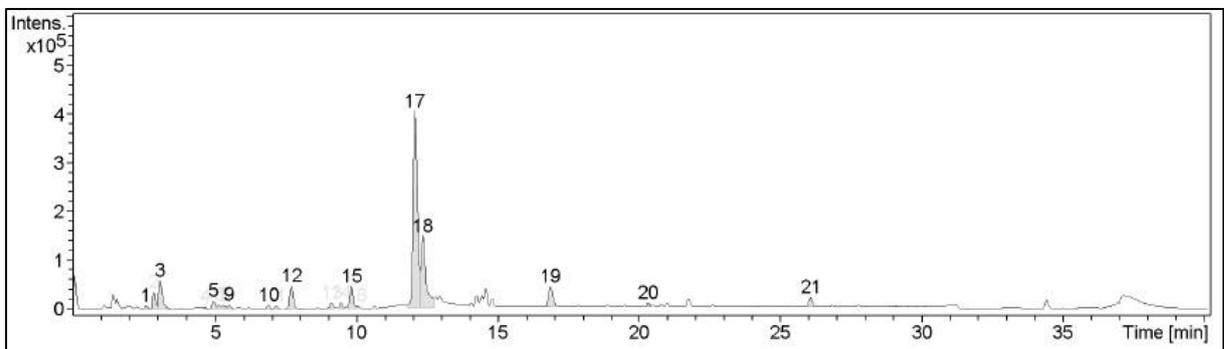
Logo, foi realizada a análise por CLAE-EM para verificar essa similaridade pelos componentes químicos sugeridos por esta análise. Como é possível observar nos cromatogramas abaixo (Figuras 22 e 23), as duas frações apresentam bastante similaridade em número de picos e distribuição ao longo dos cromatogramas, apresentando em comum os picos majoritários 10 (F3) e 17 (F6), com  $t_R$  de 12,1 min, além do pico 14 com  $t_R$  de 21,8 min para a F3. Outros picos minoritários também apresentaram tempo de retenção muito próximos, indicando a semelhança química entre as frações F3 e F6, respectivamente, e.g., picos 11/ 18 com  $t_R \cong 12,4$  e 12/ 19 com  $t_R = 16,9$ .

Figura 24 - Cromatograma da fração 3, proveniente do extrato hexânico da alga *A. mirabilis*, obtido por CLAE-EM.



Eluição realizada em modo gradiente; fase móvel A - água ultrapura á 1% de ácido fórmico e fase móvel B - metanol, onde : 0 – 2 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min; 2 – 30 min (80% B), fluxo 0,8 mL/min; 30,5 – 35 min (80% B), fluxo 1,0 mL/min; 37 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min; 40 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra a cada corrida.

Figura 25 - Cromatograma da fração 6, proveniente do extrato hexânico da alga *A. mirabilis*, obtido por CLAE-EM.

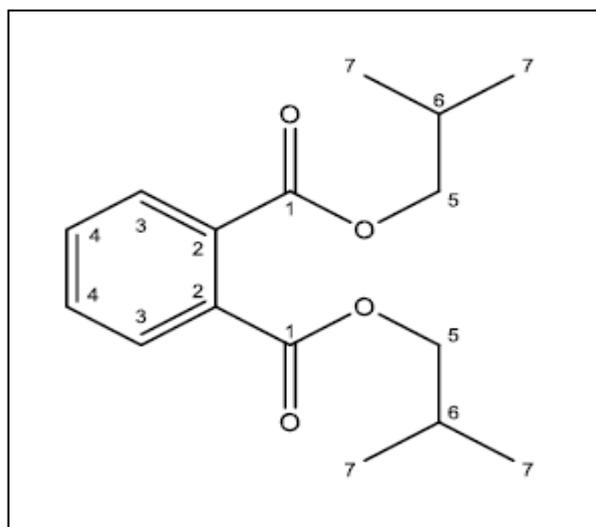


Eluição realizada em modo gradiente; fase móvel A - água ultrapura á 1% de ácido fórmico e fase móvel B - metanol, onde : 0 – 2 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min; 2 – 30 min (80% B), fluxo 0,8 mL/min; 30,5 – 35 min (80% B), fluxo 1,0 mL/min; 37 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min; 40 min (35% B), fluxo 0,8 mL/min, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra a cada corrida.

Na última busca realizada em 25 de Junho de 2017 nos bancos de dados Metlin, PubChem, Chempider, HMDB, MMCD, Lipdmass, Chebi e SciFinder, verificamos que os picos 10 da F3 e 17 da F6 correspondem a substância diisobutilftalato (Figura 24), com fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_4$ , massa 278.1518 Da, onde os valores de  $m/z$  279.1591 e 301.1410 relativos aos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  conferem com os valores encontrados nos bancos de dados para este composto.

Os picos minoritários 11 de F3 e 18 da F6 também sugerem a presença dos ftalatos diisobutilftalato, dibutilftalato ou ainda o ácido monoexiletil ftálico, todos com  $m/z$  279.1591 e 301.1410 relativos aos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ . Para o pico 14 da F3 foi encontrado a substância palmitato de sorbitano ( $C_{22}H_{42}O_6$ ), utilizado como emulsificante e aditivo alimentar, de massa 402.2981 Da e valores de  $m/z$  403.3054 e 420.3320 relativos aos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+NH_4]^+$ . As demais substâncias presentes em pequena concentração (tabelas 11 e 12, Anexo B) podem corresponder a terpenos derivados da vitamina E, como por exemplo, o delta-tocotrienol  $m/z$  397.3101  $[M+H]^+$  (pico 8, F6) conhecido por apresentar atividade antioxidante (FOTI et al., 1994). Informações adicionais sobre os espectros de massa encontram-se no Anexo A.

Figura 26 - Estrutura química do diisobutilftalato.



Para corroborar estas análises, foi realizado também a análise por RMN de  $^1H$  destas frações, já que as informações obtidas por CLAE-EM proporcionam uma caracterização preditiva.

Os sinais dos hidrogênios do anel aromático foram atribuídos no RMN de  $^1\text{H}$  da F3 e F6 (Figuras 27 a 30) aos duplos dupletos ( $dd$ ) em  $\delta_{\text{H}}$  7,7 ( $J = 5,5$  e  $3,5$  Hz) e 7,59 ( $J = 5,5$  e  $3,5$  Hz). Assim como uma banda de absorção  $\lambda_{\text{máx}} = 275$  nm (banda secundária em aromáticos) foi observada no espectro de UV obtido da substância AmF6.2 (Figura 32), correspondente ao diisobutilftalato encontrado na F6 (PAVIA et al., 2010). O sinal com o valor de  $\delta_{\text{H}}$  0,88  $d$  ( $J = 5,2$  Hz) foi atribuído as metilas na posição 7. Já os sinais com os valores de  $\delta_{\text{H}}$  2,02  $m$  e 4,04  $d$  ( $J = 6,6$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metínicos (H6) e metilênicos (H5). Ainda analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da F3 observa-se que os sinais majoritários com  $\delta_{\text{H}}$  0,88; 1,63; 2,0; 2,32; 2,80 e 5,32 sugerem a presença do ácido graxo insaturado metil (9E)-9-hexadecenoato, encontrado em organismos marinhos, com massa molecular 268.2402.

Tabela 6 - Dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$  referentes ao diisobutilftalato obtidos em metanol- $d_4$ , para a F6 a 300 MHz.

C	$\delta$ $^1\text{H}$ (J; Hz)*	$\delta$ $^1\text{H}$ F6 (J; Hz)
3 CH	7,70 $dd$ (8,9; 3,2)	7,70 $dd$ (5,5; 3,5)
4 CH	7,60 $dd$ (8,9; 3,2)	7,59 $dd$ (5,5; 3,5)
5 CH <sub>2</sub>	3,99 $d$ (6,6)	4,04 $d$ (6,6)
6 CH	1,93 $m$	2,02 $m$
7 CH <sub>3</sub>	0,88 $d$ (4,2)	0,88 $d$ (5,2)

\*Dados de RMN do diisobutilftalato obtido a 600 MHz para  $^1\text{H}$ , em DMSO- $d_6$  (GARG; BISHT; LING, 2014).

Figura 27 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da F3, obtida do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

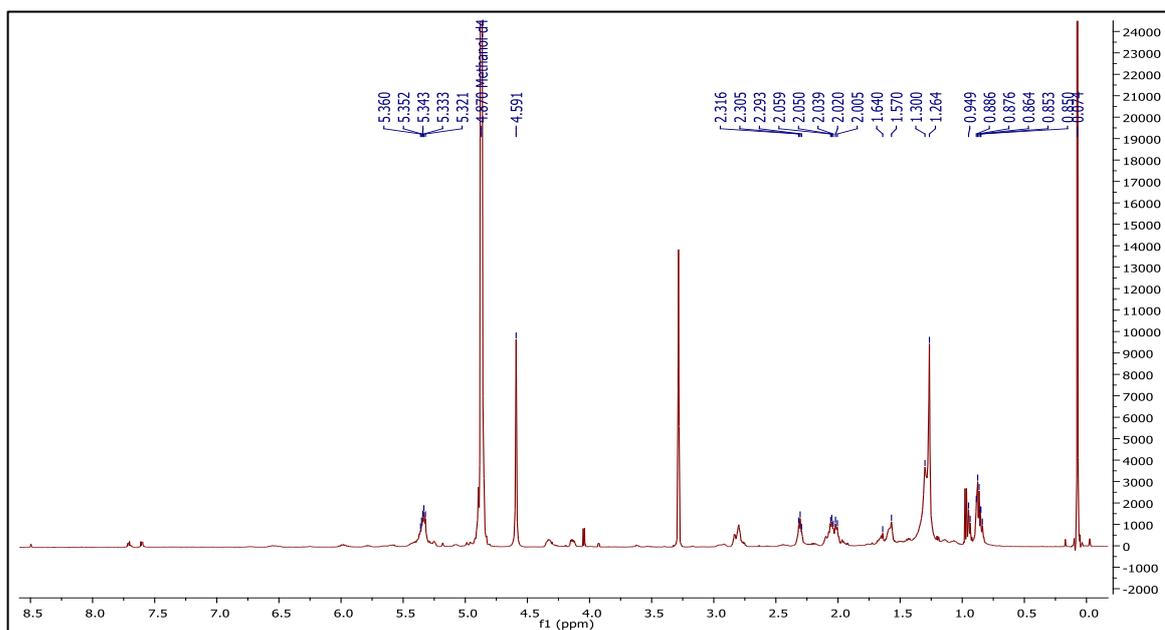


Figura 28 - Expansão dos sinais de RMN 1H característicos do diisobutilftalato para a F3

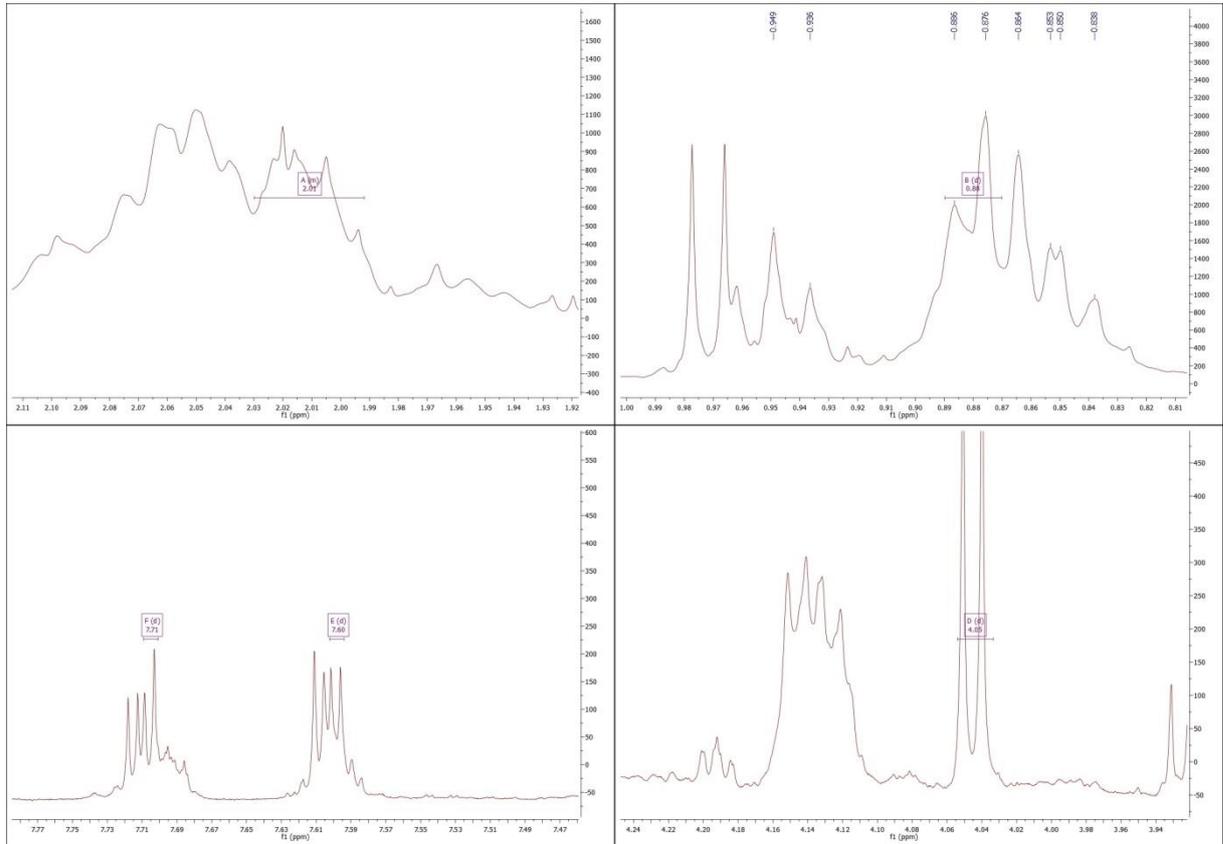


Figura 29 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da F6, obtida do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz.

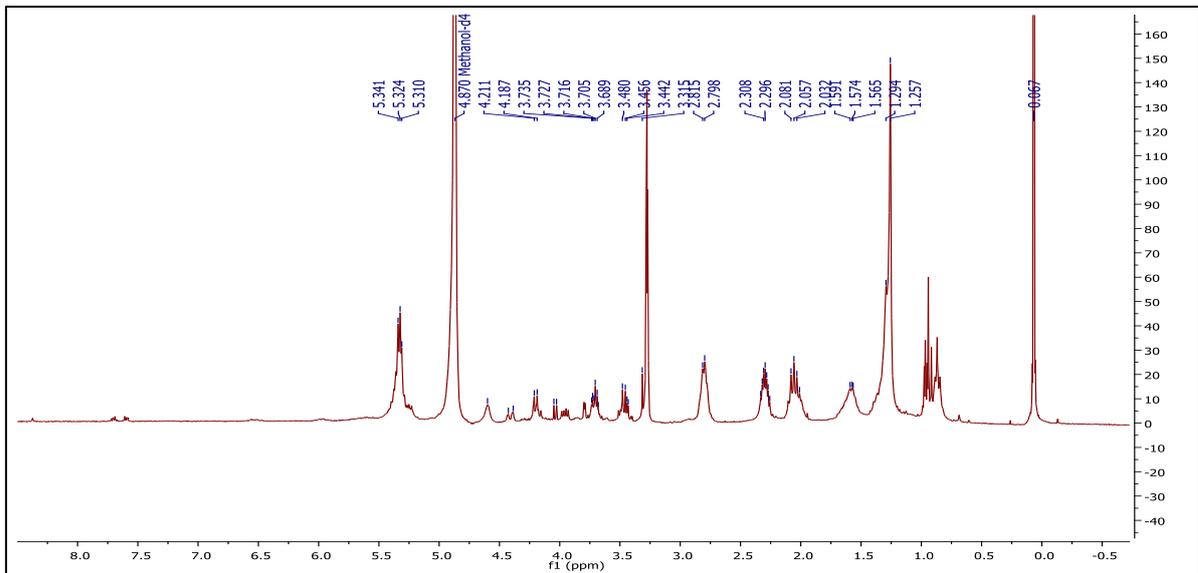
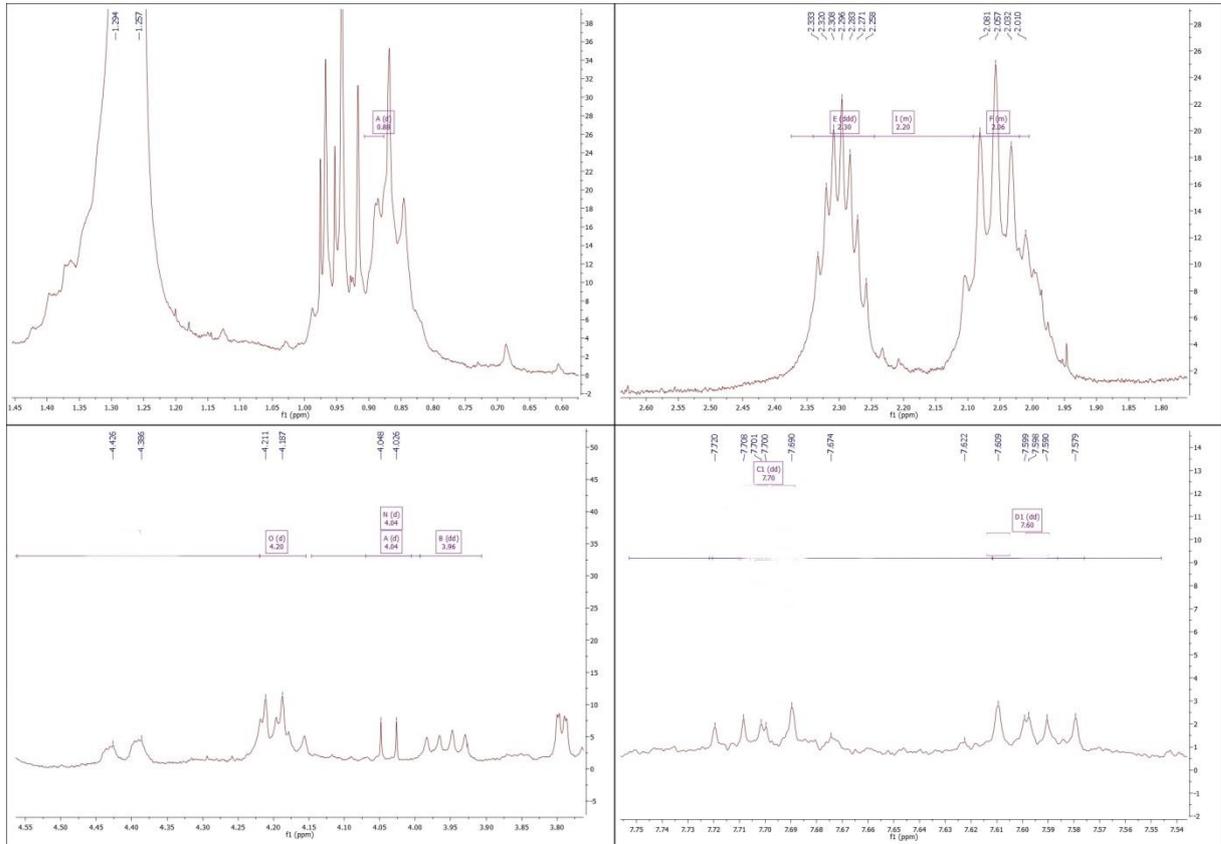


Figura 30 - Expansão dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  característicos do diisobutilftalato para a F6



Desta forma, para os estudos a seguir, observada a similaridade entre as frações, optamos pela fração F6 pelo fato desta ter gerado maior massa, partindo para o sub-fracionamento por cromatografia semi-preparativa na tentativa de purificação dos constituintes presentes na F6. A partir desta técnica, foi possível a separação de quatro subfrações posteriormente denominadas AmF6.1, AmF6.2, AmF6.3 e AmF6.4. Estas subfrações foram avaliadas quanto à atividade antiparasitária e citotóxica (Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade biológica das sub-frações obtidas da F6 de *A. mirabilis*, frente à formas amastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos

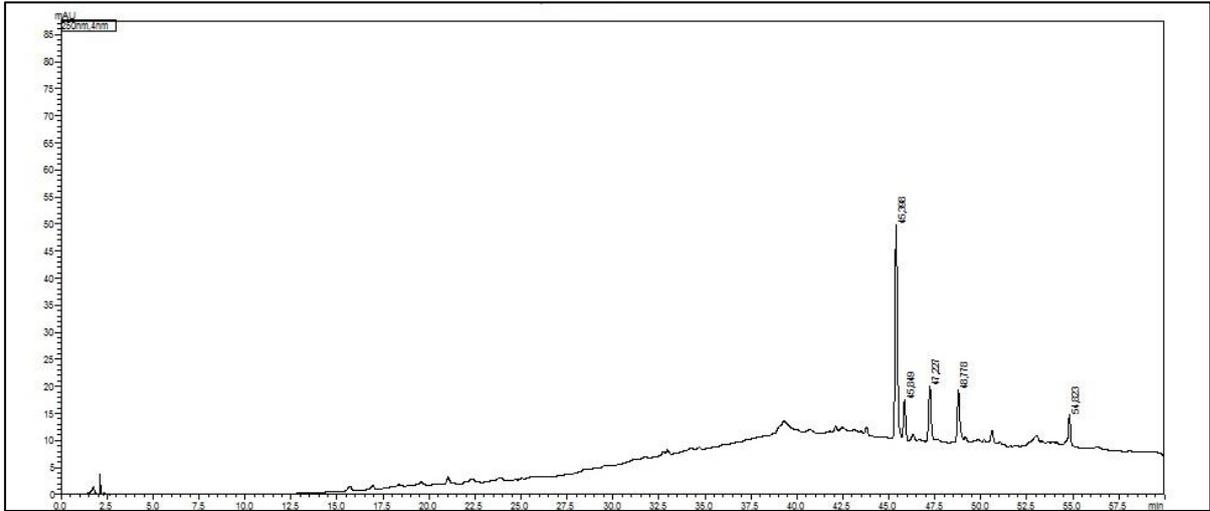
Substância	CI <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)	Massa (mg)	IS	CI <sub>50-AMA</sub> (µg/mL)	IS	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
AmF6.1	>100	5	(n.d)	-	-	-
AmF6.2	66,50 ± 4,75	6	(1,8)	40 ± 0,80	(3,0)	121,30 ± 0,10
AmF6.3	>100	6	(n.d)	-	-	-
AmF6.4	>100	7	(n.d)	-	-	-
pentamidina	3,20 ± 0,13	-	(3,5)	6,25 ± 0,58	(5,7)	35,69 ± 6,84
anfotericina B	1,50 ± 0,07	-	(7,2)	4,92 ± 0,14	(4,7)	23,10 ± 2,52

n.d. não detectado

A subfração AmF6.2 apresentou atividade leishmanicida tanto contra formas promastigotas (CI<sub>50-PRO</sub> = 66,50 ± 4,75 µg/mL) quanto para amastigotas intracelulares (CI<sub>50-AMA</sub> = 40 ± 0,80 µg/mL). A citotoxicidade obtida (CC<sub>50</sub> = 121,30 ± 0,10 µg/mL), mostra que o (s) constituinte (s) químico (s) presentes nesta subfração é (são) três vezes mais seletivo para o parasito (IS = 3), similar àquela apresentada pela anfotericina B (IS = 4,7).

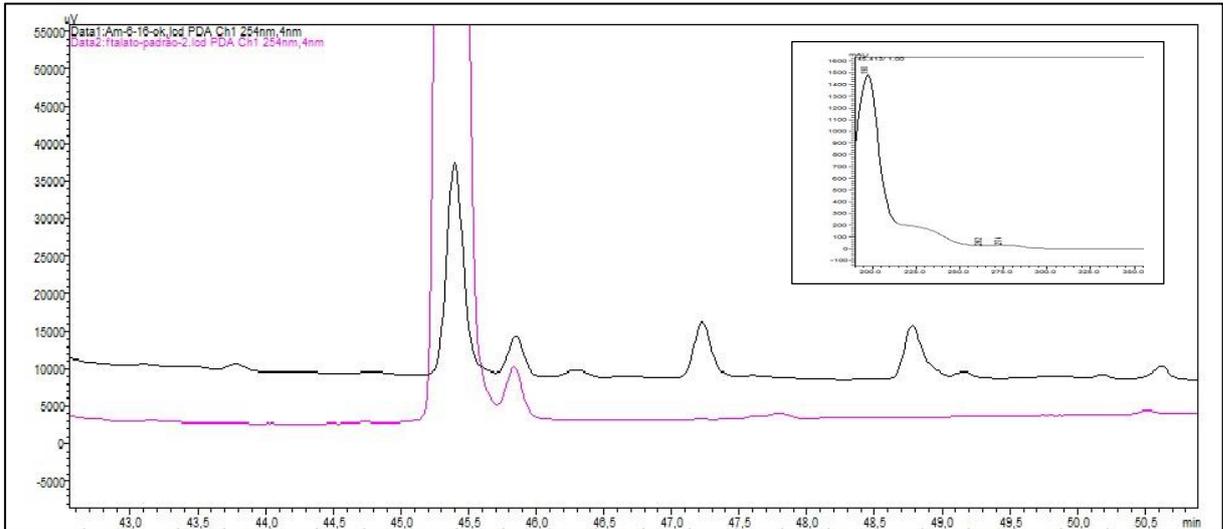
Como observado nos cromatogramas da AmF6.2 (Figuras 28 e 29), a purificação não foi satisfatória, um vez que há ainda picos minoritários na subfração, entretanto, o constituinte majoritário em CLAE-UV/Vis desta fração é o diisobutilftalato, após comparação com um padrão. Esta substância ainda continua como constituinte majoritário da F6, embora existam outros dois picos nesta fração, a atividade constatada pode ser pelo efeito majoritário do diisobutilftalato.

Figura 31 - Cromatograma obtido em gradiente exploratório da subfração AmF6.2.



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) metanol: 0-2 min 5% B; 2-55 min 5-100% B; 55-60 min 100% B, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra.

Figura 32 - Cromatograma expandido obtido em gradiente exploratório do padrão diisobutilftalato (cor magenta) e subfração AmF6.2 (cor preta).



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) metanol: 0-2 min 5% B; 2-55 min 5-100% B; 55-60 min 100% B, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra.

Os ftalatos, pelo fato de serem os constituintes majoritários, podem estar relacionados com a atividade leishmanicida observada, mas não podemos descartar que outros constituintes minoritários, como os terpenos encontrados (derivados da vitamina E, delta-tocotrienol, por exemplo), também possam ser responsáveis ou contribuir para a bioatividade por efeito sinérgico. Cumpre-nos destacar que estes ftalatos podem ser entendidos como sendo fruto de contaminação externa via solvente ou uso de plásticos já que estes são em geral petroquímicos utilizados

como plastificantes ou encontrados em solventes (STAPLES; PARKERTON; PETERSON, 2000; CHEN, 2004).

No entanto, sabemos que ftalatos já foram isolados de plantas superiores (MACHADO, 2007; LI et al., 2012; WYREPKOWSKI, 2014). No que diz respeito ao grupo das algas, estas também produzem ftalatos de diversos tipos (SASTRY; RAO, 1995; CHEN, 2004; GANTI et al., 2006; NAMIKOSHI et al., 2006; GRESSLER, 2010). Dentre estes trabalhos, o mais importante foi o realizado por Chen (2004), que ao cultivar a alga vermelha *Bangia atropurpurea* em condições laboratoriais na presença de  $^{14}\text{C}$ , livre de contaminantes ou solventes, verificou que a alga produziu ftalatos marcados com o  $^{14}\text{C}$ , eliminando a suspeita de bioacumulação por poluição ou solventes e, em análise das mesmas algas cultivadas em seu ambiente natural foram encontradas as mesmas substâncias em concentrações semelhantes, corroborando a hipótese de biossíntese destas substâncias (CHEN, 2004). Gressler (2010) também verificou a presença de alguns tipos de ftalatos em extratos voláteis de algas do litoral brasileiro por um processo de extração em HS-SPME (*Headspace-Solid Phase Microextraction*) livre de solventes, eliminando a suspeita de contaminação por esta via (GRESSLER, 2010). Ainda não foi possível o estabelecimento de vias de biossíntese destes compostos, entretanto, acredita-se que eles sejam armazenados na membrana celular e estejam envolvidos com a flexibilidade das células algais (CHEN, 2004).

No desenvolvimento deste projeto, tomamos todos os cuidados necessários para evitar presença de contaminantes, desde o processo extrativo até a etapa de sub-fracionamento das substâncias, assim como a utilização de solventes de boa qualidade armazenados em recipientes de vidro, para minimizar os efeitos de possíveis contaminantes, no entanto, são necessários mais experimentos para poder afirmar que os ftalatos majoritários encontrados para as frações obtidas do extrato hexânico da alga *A. mirabilis* são realmente produzidos pela alga e não advindos de contaminação, incluindo extração por HS-SPME e análise cromatográfica dos solventes utilizados no laboratório, para tentar dar mais evidências à hipótese de que os ftalatos encontrados tenham sido extraídos da alga e não contaminantes externos.

#### 4.4 Monitoramento bioguiado e fracionamento dos extratos fúngicos de extratos fúngicos bioativos para atividade leishmanicida

##### 4.4.1 Avaliação da bioatividade dos extratos fúngicos

Para os fungos endofíticos das algas *A. mirabilis* e *C. jacquinoitii*, a Tabela 8 mostra os resultados do ensaio anti-promastigota contra formas de *L. amazonensis* com os extratos obtidos. Apenas o extrato diclorometano:metanol obtido do fungo identificado como AmMI2pdba apresentou atividade leishmanicida ( $CI_{50} = 47 \pm 2,01 \mu\text{g/mL}$ ,  $IS > 10,6$ ), mostrando-se pelo menos 10 vezes mais seletivo para o parasito. Os demais extratos não apresentaram atividade leishmanicida, incluindo um extrato obtido apenas do cultivo em meio arroz, sem o fungo inoculado, sendo estes desconsiderados para prosseguimento de nossos estudos ( $CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 8 - Atividade biológica dos extratos diclorometano:metanol dos fungos endofíticos isolados das algas *C. jacquinoitii* (Cj) e *A. mirabilis* (Am), frente à formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos.

Fungo	$CI_{50-PRO}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
AmMII2Czapeck	>500	(n.d)	-
AmMII2pdba	>500	(n.d)	-
AmMI2pddb	>500	(n.d)	-
AmMI2pdba	$47 \pm 2,01$	(> 10,6)	>500
CjMII2Czapeck	>500	(n.d)	-
pentamidina	$10,2 \pm 0,85$	(3,5)	$35,69 \pm 6,84$
anfotericina B	$3,2 \pm 0,03$	(7,2)	$23,10 \pm 2,52$

n.d – não detectado

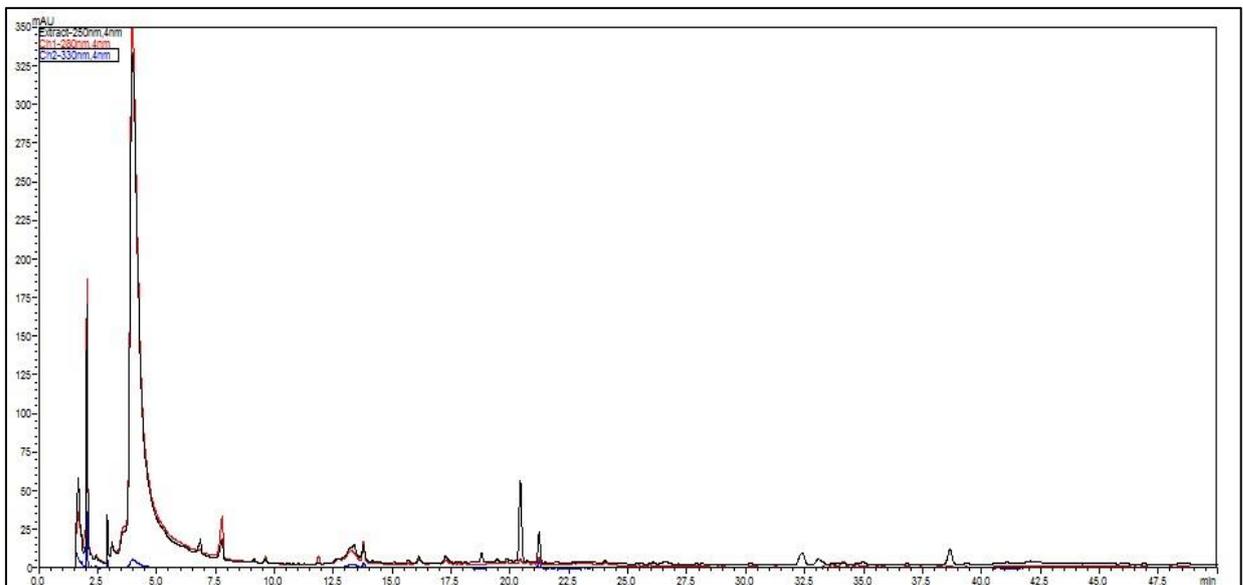
Em estudo semelhante, Godinho e colaboradores (2013) investigaram a atividade tripanocida dos extratos etanólicos dos fungos *Penicillium sp.* UFMG 6034 e *Penicillium sp.* UFMG 6120, isolados de algas antárticas pardas e verdes, contra *Trypanossoma cruzi*. Estes extratos apresentaram  $CI_{50} = 1,28 \mu\text{g/mL}$  e  $0,48 \mu\text{g/mL}$  respectivamente, contra formas tripomastigotas do parasito, não havendo dados sobre sua toxicidade. Para as macroalgas utilizadas neste estudo, este é o primeiro

relato de atividade leishmanicida atribuída a fungos endofíticos associados à estas algas.

#### 4.4.2 Análise química dos extratos bioativos

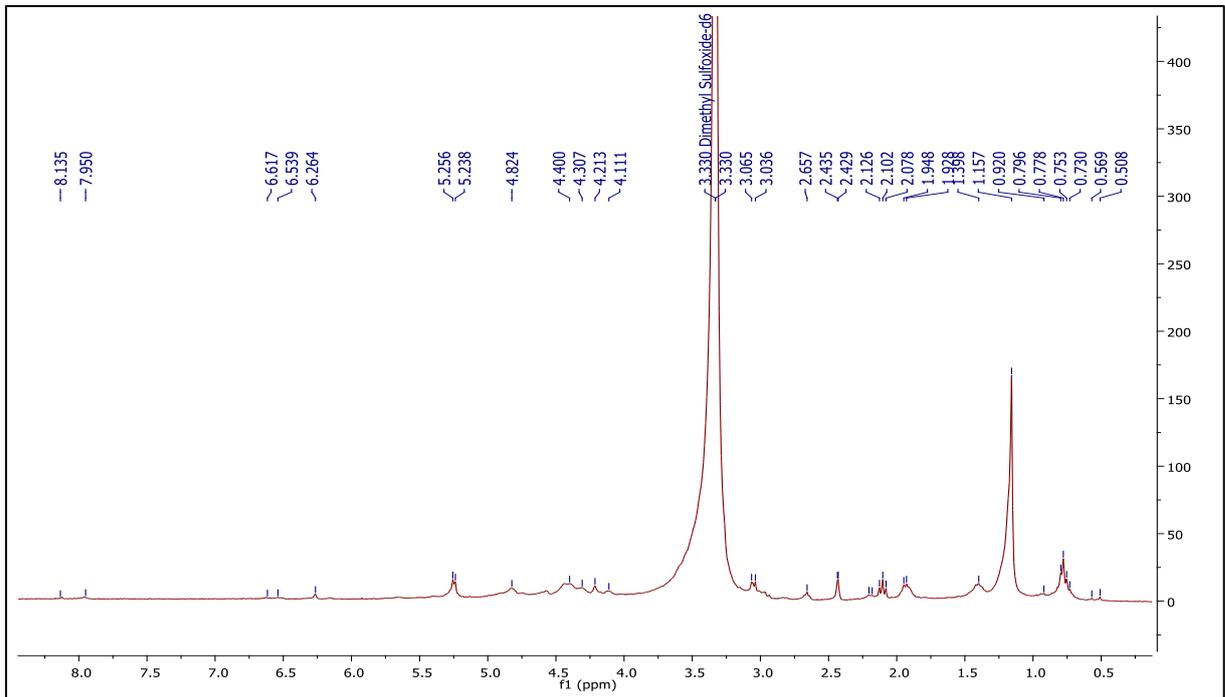
Observamos de acordo com a Figuras 28 que o fungo AmMI2pdba produziu substâncias de média e alta polaridade, com um pico de intensa absorção com  $t_R$  de 5 minutos. Enquanto que no espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 29) podemos observar sinais com baixa intensidade com valores  $\delta_H$  entre 0,5 e 1,3, exceto um singlete em  $\delta_H$  1,2 ppm, que sugerem a presença de hidrogênios metílicos. Ainda são observados hidrogênios metilênicos com valores de  $\delta_H$  entre 1,2 e 1,4 que sugerem a presença de hidrocarbonetos saturados na faixa espectral observada, assim como hidrogênios de alcenos e aromáticos ( $\delta_H$  entre 6 e 9).

Figura 33 - Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD do extrato diclorometano:metanol do fungo endofítico AmMI2pdaa, isolado da alga *A. mirabilis*, monitorado em  $\lambda = 250$  nm (preto),  $\lambda = 280$  nm (vermelho) e  $\lambda = 330$  nm (azul).



Eluição realizada em modo de gradiente exploratório, como fase móvel (A) água ultrapura e (B) metanol: 0-2 min 5% B; 2-40 min 5-100% B; 40-50 min 100% B, com injeção de 10  $\mu$ L de amostra.

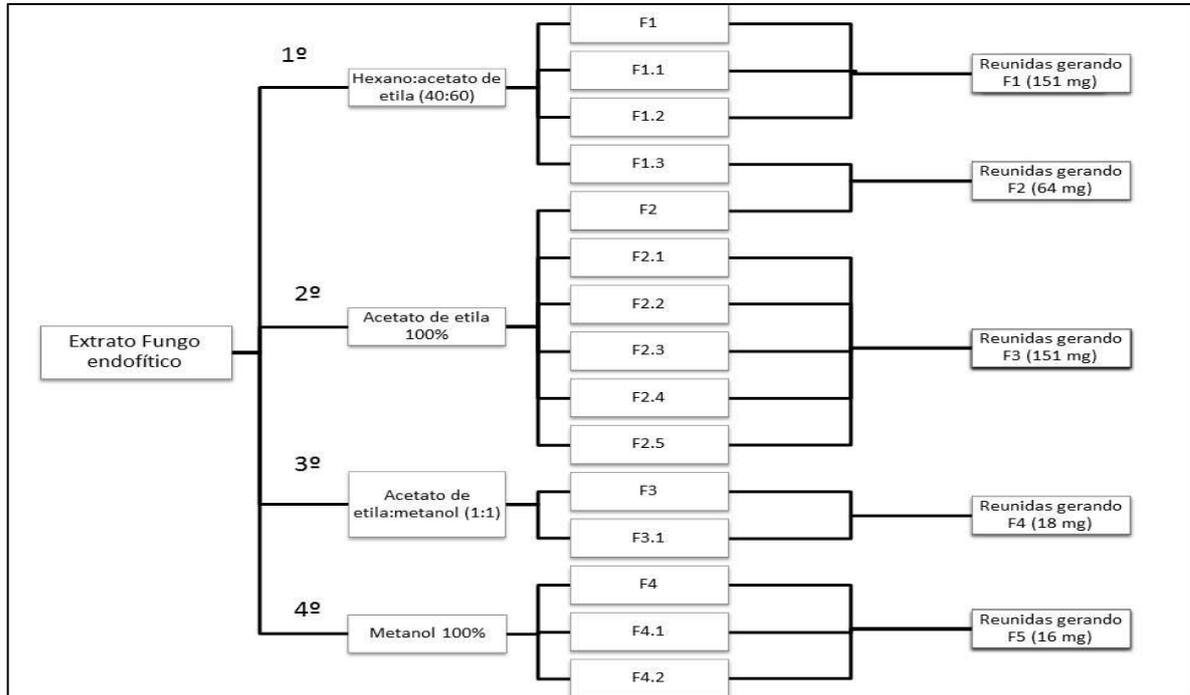
Figura 34 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato diclorometano:metanol do fungo endófito AmMI2pdaa isolado da alga *A. mirabilis* em DMSO- $d_6$  a 300 MHz.



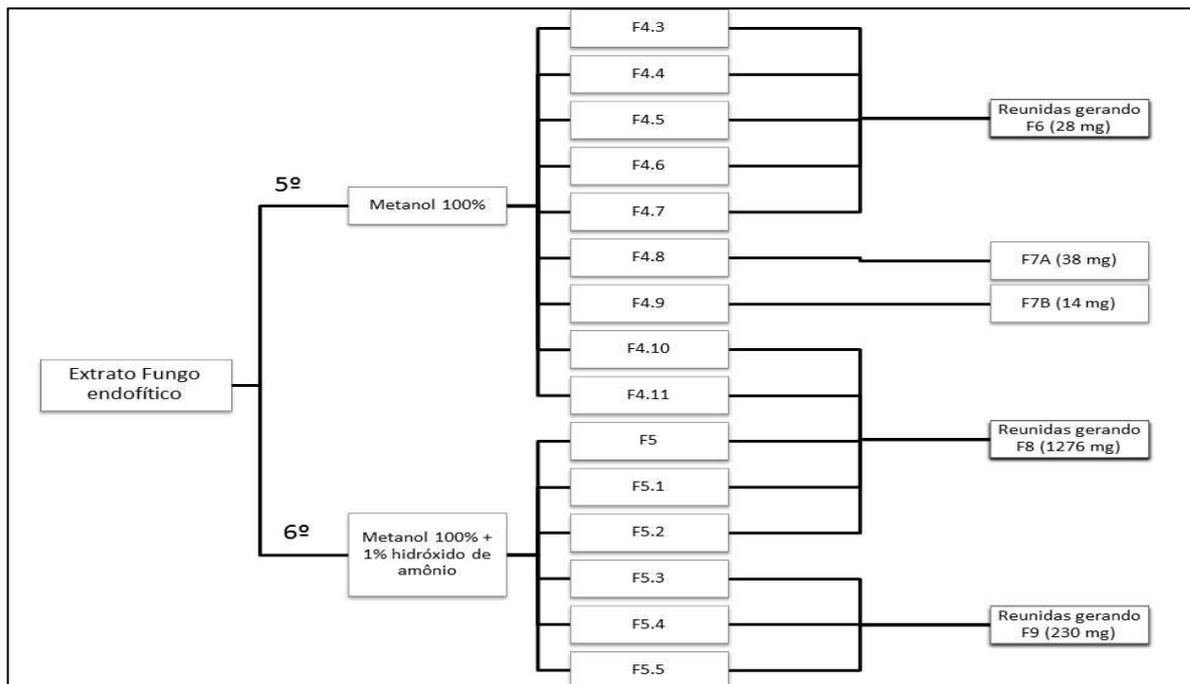
#### 4.4.3 Fracionamento dos extratos e avaliação química e da bioatividade

O fracionamento do extrato bioativo foi realizado por cromatografia clássica em coluna, seguindo os mesmos princípios de separação da CLAE, porém esta é realizada em fase normal, com a força da gravidade atuando na eluição da fase móvel contendo o analito, pela fase estacionária e se empregada da forma correta, proporciona alto grau de pureza dos analitos (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Foi escolhida esta metodologia de fracionamento, uma vez que o cromatograma do extrato apresentou poucos picos majoritários, mais suscetíveis à purificação por esta técnica. Logo, apenas um extrato fúngico foi fracionado por cromatografia clássica, que foi o extrato do fungo AmMI2pdba, gerando nove frações de acordo com a Figura 16.

Figura 35 - Representação esquemática do fracionamento e reagrupamento das frações do extrato hexânico do fungo endofítico associado à alga *A. mirabilis*.



Continuação



O extrato do fungo endofítico Am12pdaa foi fracionado por Cromatografia clássica nas condições: 1º hexano:acetato de etila (40:60), 2º acetato de etila 100%, 3º acetato de etila:metanol (1:1), 4º e 5º metanol 100% e 5º metanol com 1% de hidróxido de amônio. As frações geradas foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a similaridade observada.

Na Tabela 9 estão os resultados da atividade anti-promastigota contra *L. amazonensis* das frações obtidas por cromatografia em coluna do extrato do fungo

AmMI2pdba Apenas as frações 5 ( $CI_{50} = 50,10 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$ ) e 6 ( $CI_{50} = 50,10 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ ) mostraram potencial para continuação dos estudos de isolamento dos compostos, com atividade semelhante a do extrato bruto ( $CI_{50} = 47 \pm 2,01 \mu\text{g/mL}$ ), porém com citotoxicidade aparentemente maior ( $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) para ambas frações quando comparada àquela observada no extrato ( $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 9 - Atividade biológica das frações obtidas do extrato do fungo AmMI2pdba isolado da alga *A. mirabilis*, frente à formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos.

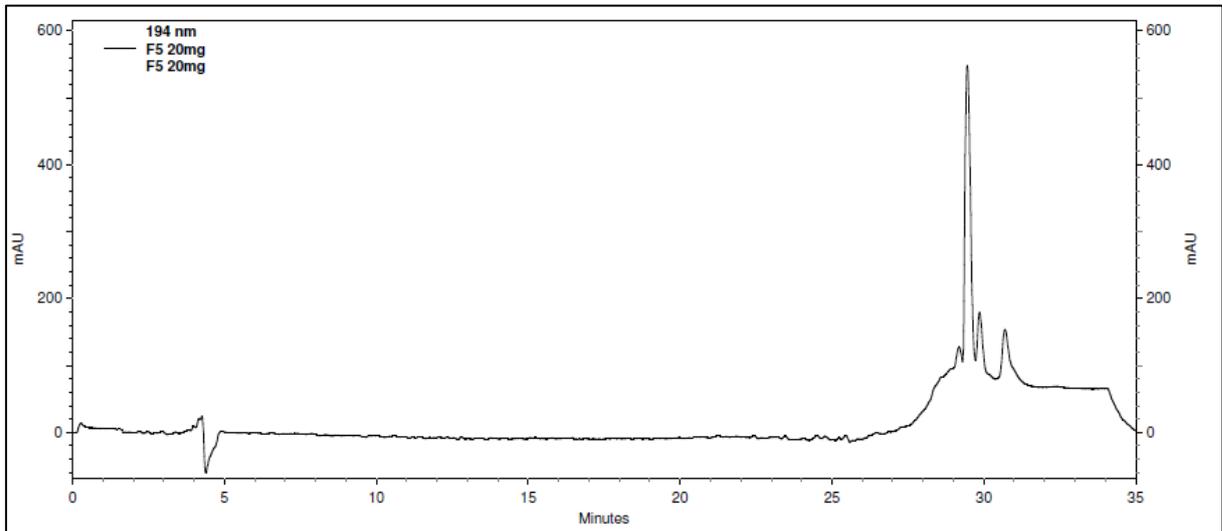
Fração	$CI_{50}(\mu\text{g/mL})$	Massa (mg)	IS	$CC_{50} (\mu\text{g/mL})$
F1	> 100	151	(n.d)	-
F2	> 100	64	(n.d)	-
F3	> 100	150	(n.d)	-
F4	> 100	18	(n.d)	-
F5	$50 \pm 0,80$	16	(> 2)	> 100
F6	$50 \pm 0,05$	28	(> 2)	> 100
F7 A	> 100	38	(n.d)	-
F7 B	> 100	14	(n.d)	-
F8	> 100	1276	(n.d)	-
F9	> 100	230	(n.d)	-
pentamidina	$10,20 \pm 0,85$	-	(3,5)	$35,69 \pm 6,84$
anfotericina B	$3,20 \pm 0,03$	-	(7,2)	$23,10 \pm 2,52$

n.d não detectado

A citotoxicidade observada também continuou baixa dentro da concentração testada ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), sendo que as duas frações apresentaram valores semelhantes conferindo um IS > 2 para ambas.

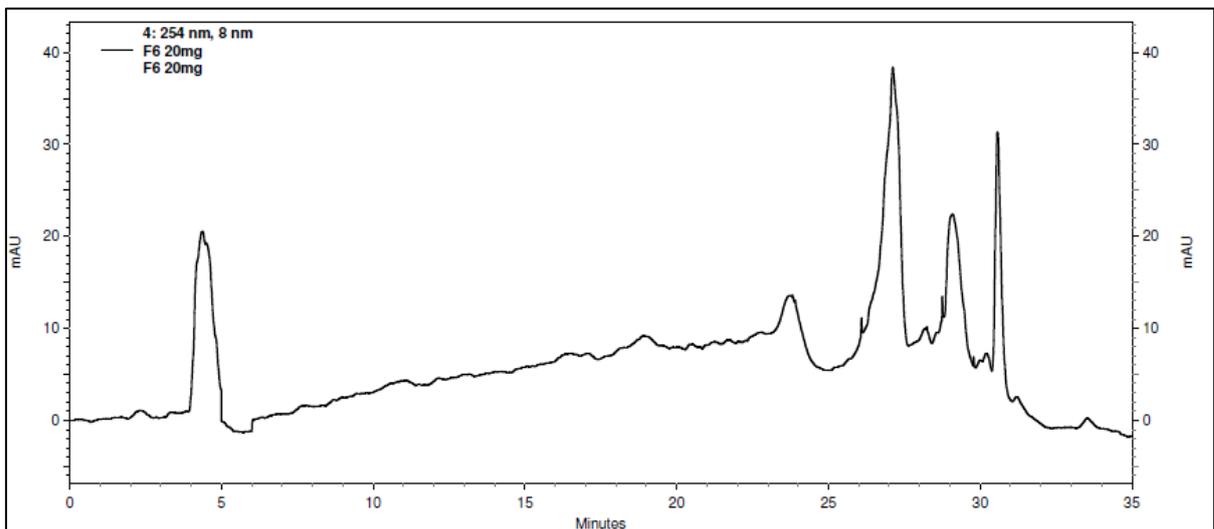
As Figuras 31 e 32 mostram os cromatogramas da F5 e F6 do fungo AmMI2pdba onde é possível observar poucos picos majoritários em ambas frações.

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.



Eluição realizada em gradiente exploratório, fase móvel A - água ultra pura à 1% de ácido fórmico e fase móvel B metanol, com gradiente: 0 min - 18% B; 20 min - 45,2%; 25 min - 100% B; 27 min - 100% B; 30 min - 23,5% B, com fluxo de 5 mL/min e injeção de 1 mL de amostra.

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.



Eluição realizada em gradiente exploratório, fase móvel A - água ultra pura à 1% de ácido fórmico e fase móvel B metanol, com gradiente: 0 min - 23,5% B ; 20 min - 52,5% B; 25 min - 100% B; 27 min - 100% B; 30 min 23,5%, com fluxo de 5 mL/min e injeção de 1 mL de amostra.

Dessa forma as duas frações seguiram para a etapa de sub-fracionamento no intuito da purificação dos constituintes majoritários e novos testes de atividade leishmanicida.

#### 4.4.4 Sub-fracionamento e avaliação da bioatividade

Para o sub-fracionamento das frações bioativas foi realizada Cromatografia semi-preparativa, pelos mesmos motivos descritos anteriormente. Foram escolhidas para purificação as frações 5 e 6 do fungo endofítico AmMI2pdba, e seis substâncias obtidas das frações 5 e 6 do fungo endofítico. Estas substâncias foram avaliadas com relação a sua atividade anti-promastigota, anti-amastigota e citotóxica e os resultados estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Atividade biológica das subfrações obtidas das frações 5 e 6 do fungo endofítico AmMI2pdba, frente à formas amastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos.

Substância	CI <sub>50-PRO</sub> (µg/mL)	Massa (mg)	IS	CI <sub>50-AMA</sub> (µg/mL)	IS	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
FeF5.1	>100	2	(n.d)	-	-	-
FeF5.2	>100	3	(n.d)	-	-	-
FeF6.1	> 100	4	(n.d)	-	-	-
FeF6.2	53,40 ± 3,30	6	(> 1,2)	> 40	(n.d)	> 100
FeF6.3	> 100	14	(n.d)	-	-	-
FeF6.4	>100	2	(n.d)	-	-	-
pentamidina	3,20 ± 0,13	-	(3,5)	6,25 ± 0,58	(5,7)	35,69 ± 6,84
anfotericina B	1,50 ± 0,07	-	(7,2)	4,92 ± 0,14	(4,7)	23,10 ± 2,52

n.d não detectado

Já para o fungo endofítico AmMI2pdba, apenas a sub-fração FeF6.2 apresentou atividade leishmanicida contra formas promastigotas (CI<sub>50-PRO</sub> = 53,4 ± 3,3 µg/mL), e maior que 40 µg/mL para formas amastigotas, não foi possível a obtenção do valor exato do CI<sub>50-AMA</sub> devido a quantidade do material disponível para teste. Estão sendo realizados ensaios de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C no intuito de caracterizar os constituintes desta sub-fração. Este resultado é muito interessante, uma vez que é uma subfração, com poucos constituintes, e baixa citotoxicidade.

#### 4.4.5 Identificação dos fungos produtores de metabólitos bioativos

A identificação molecular do fungo endofítico AmMI2pdba (Figura 38), responsável pela atividade bioativas observada, foi realizada pela amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal com os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), gerando uma sequência de 538 pares de base (Anexo C). A sequência de DNA obtida foi analisada pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) (ALTSCHUL et al., 1990) contra um banco de sequências não-redundantes.

Figura 38 - Foto do Isolado AmMI2pdba



A Tabela 11 mostra o resultado obtido através do alinhamento da sequência e comparação no banco de dados que resultou em uma identidade de sequência de 99% e *e-value* 0,0 com *Aspergillus flavus* e *Aspergillus oryzae* (Anexos D e E). Os dados de ITS não foram suficientes para discriminar o isolado a nível de espécie. De fato, Gazis e colaboradores (2011) relatam que o uso do marcador ITS apenas pode falhar na identificação de alguns gêneros de fungos, sendo assim, necessário o uso de outros marcadores, tais como o gene da beta tubulina ou fragmento que codifica a subunidade maior do RNA ribossomal (GAZIS; REHNER; CHAVERRI, 2011).

Tabela 11 - Identificação molecular do fungo endofítico isolado da alga *A. mirabilis*

Código do Fungo	Resultado BLAST (número de acesso GenBank)	Query cover (%)	Identidade (%)	E-value	Táxon proposto (número de acesso GenBank)
AmMI2pdba	<i>Aspergillus flavus</i> (KF432854)	100	99	0	<i>Aspergillus sp.</i> (KF432854.1) <sup>a</sup>
	<i>Aspergillus oryzae</i> (KU095081)	99	99	0	<i>Aspergillus sp.</i> (KU095081.1) <sup>b</sup>

a - (DIVAKARA et al., 2015).

b - N.D.

Fungos do gênero *Aspergillus sp.* são comumente encontrados como endófitos em macroalgas marinhas (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012). Em se tratando de *Aspergillus spp.* endófitos de algas pardas, várias espécies deste gênero são encontradas, como por exemplo, *Aspergillus wentii* e *versicolor*, isolado de *Sargassum sp.*; *Aspergillus niger* isolado de *Colpomenia Sinuosa* e *Aspergillus terreus* de *Sargassum ilicifolium* (FLEWELLING et al., 2015; SARASAN et al., 2017). Entretanto, para macroalgas antárticas os dados na literatura são escassos, havendo um registro para macroalgas pardas, referentes aos endófitos *Aspergillus terreus* e *Aspergillus conicus* isolados das algas *Phaeurus antarcticus* e *Adenocystis sp.*, respectivamente (GODINHO et al., 2013). Logo, este é o primeiro registro deste gênero como fungo endofítico para a macroalga antártica *A. mirabilis*.

## 5 CONCLUSÃO

Foram avaliados oito extratos obtidos das algas *A. mirabilis* e *C. jacquinothii* 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. jacquinothii*, 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  $^1\text{H}$  mostraram a predominância de hidrogênios metílicos e metilênicos correspondentes a hidrocarbonetos saturados. O cromatograma do extrato do fungo AmMl2pdba apresentou substâncias de média e alta polaridade e o RMN de  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  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.; COLEPICOLO, 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.; CICALI, 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 Science 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 <sup>14</sup>C 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.

PELLISSARI, 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](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.

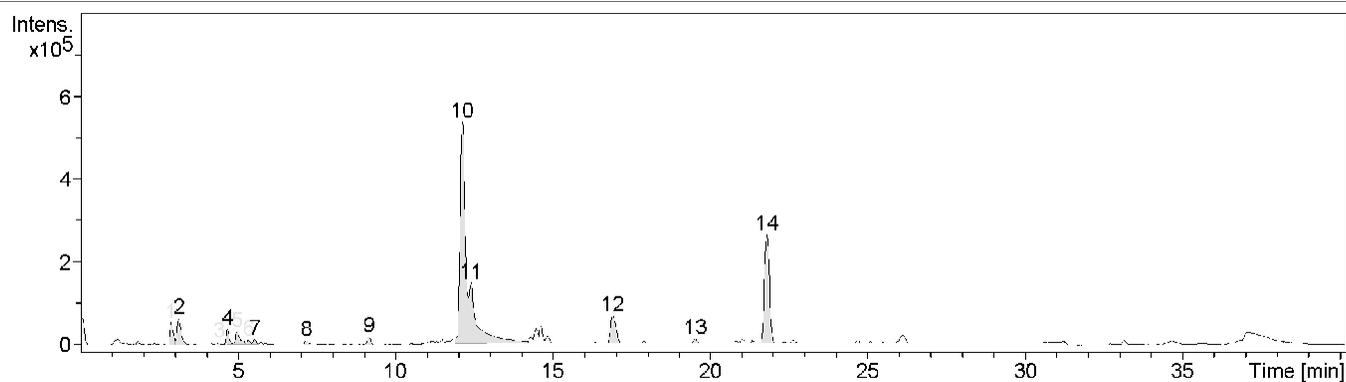
ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; AL-OTHMAN, M. R.; ALAFEEFY, A. M.; EL-MELIGY, R. M. Withdrawn: biological activity of fungal secondary metabolites. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2013. doi:10.1016/j.jscs.2013.02.007.

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.

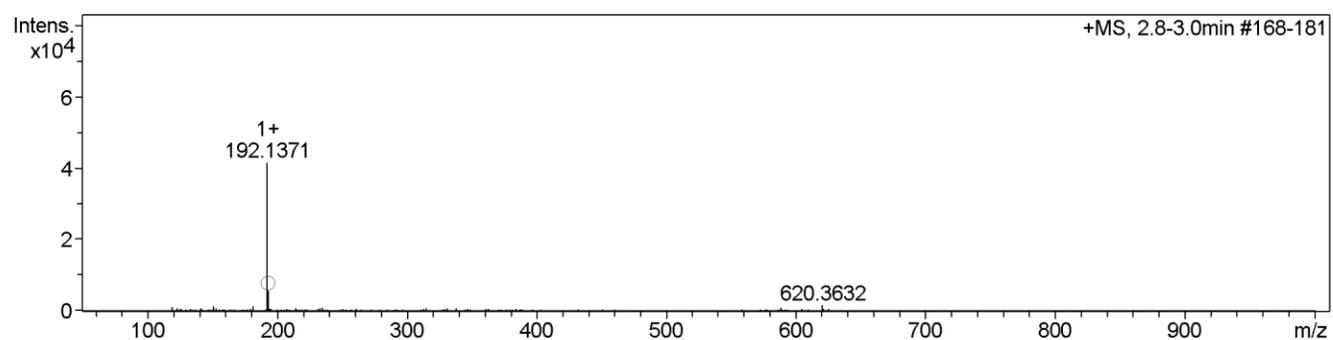
## ANEXOS

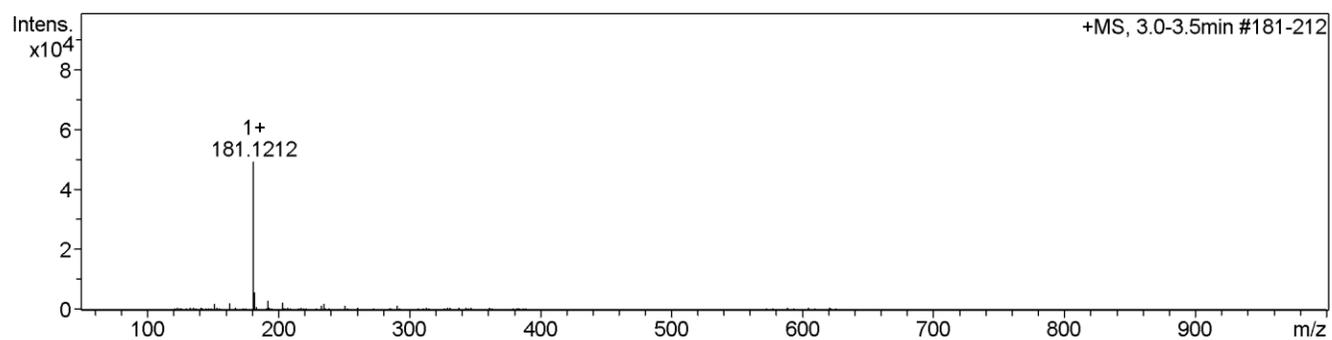
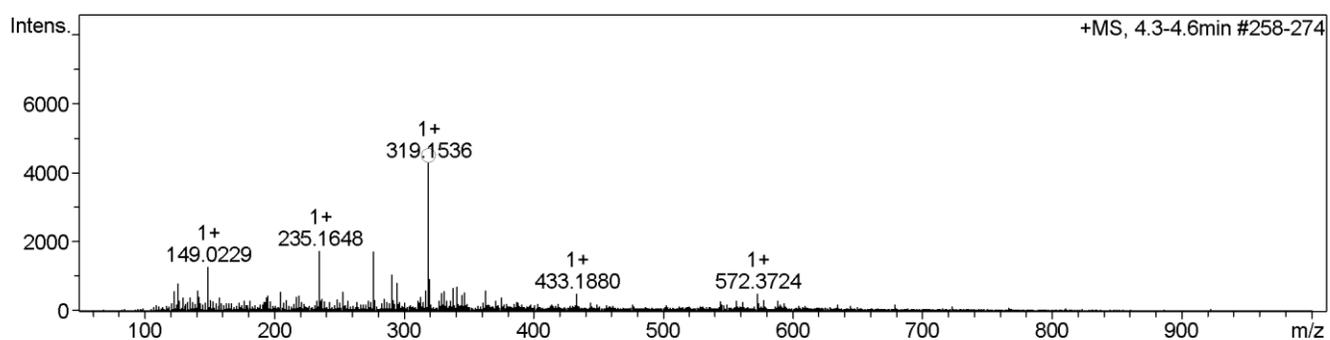
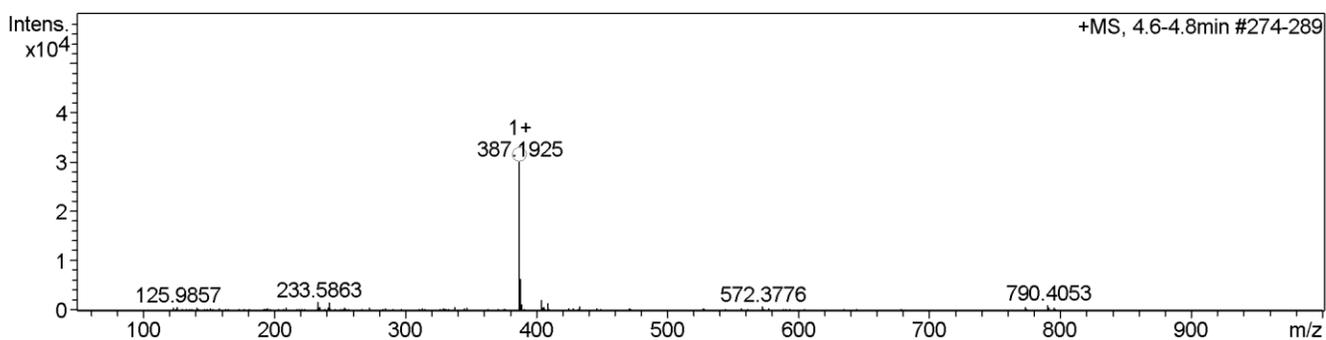
## ANEXO A

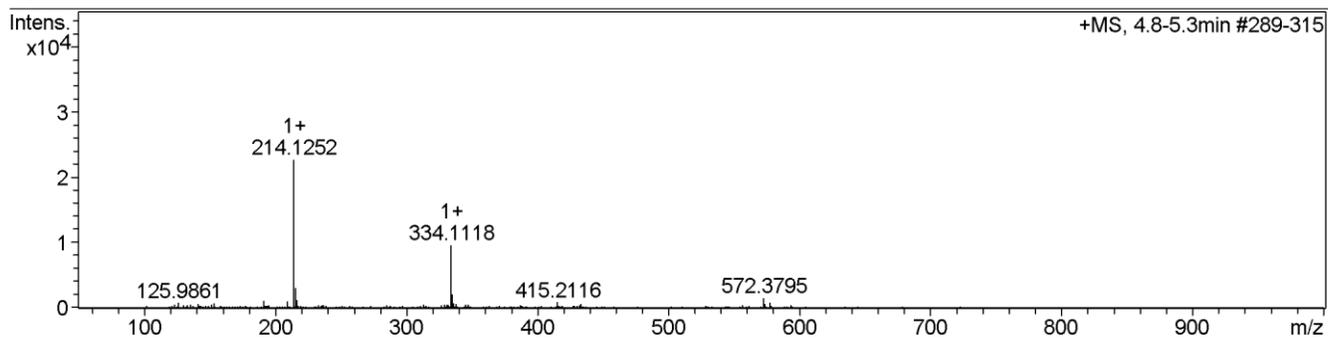
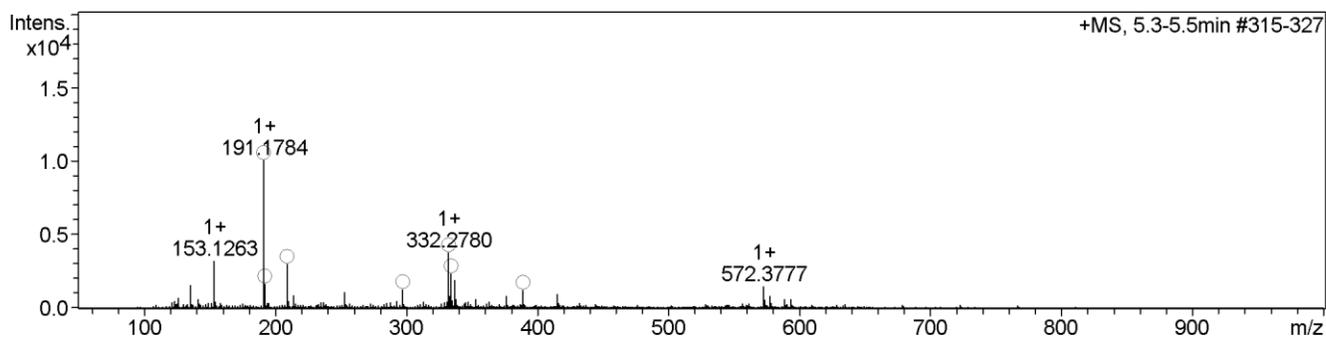
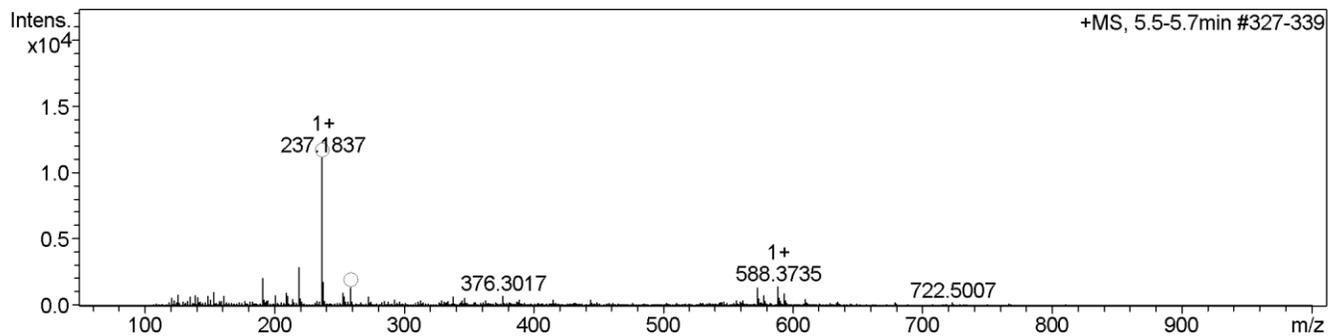
Dados de Espectrometria de Massas da F3 de *A.mirabilis*

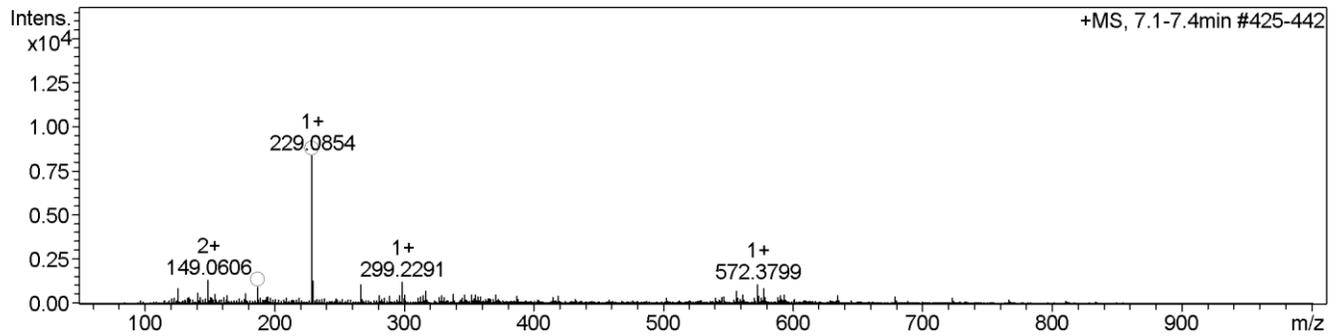
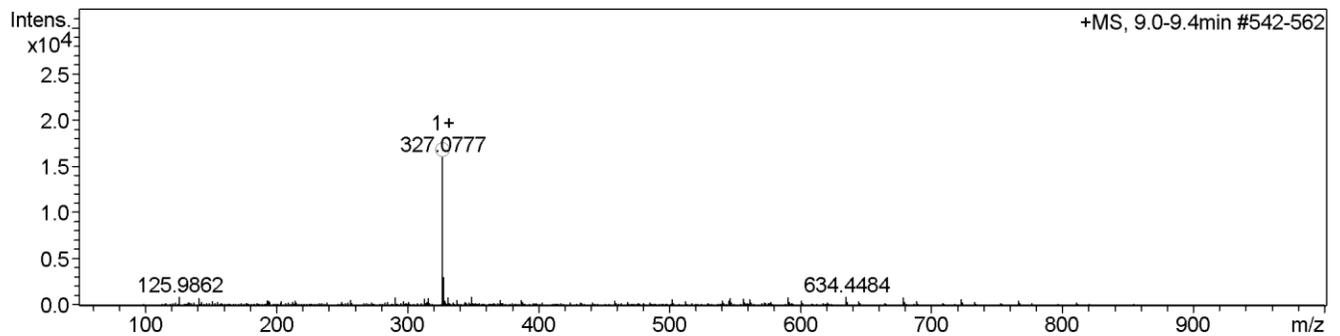
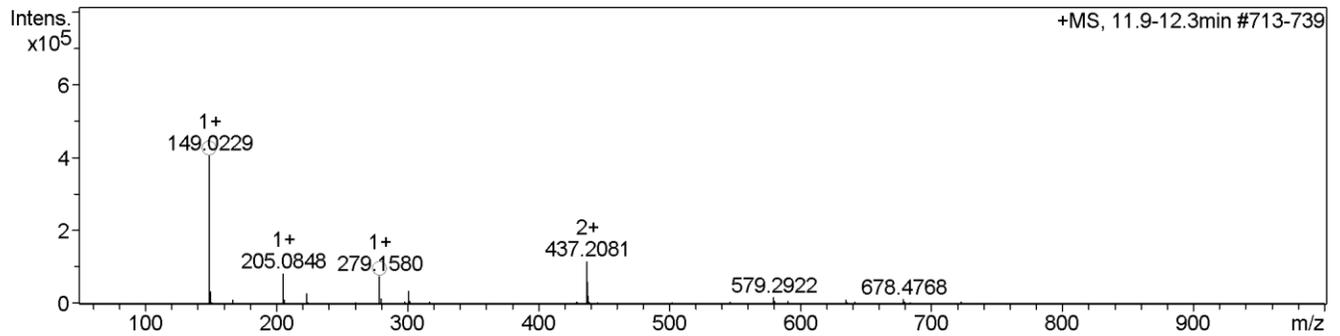
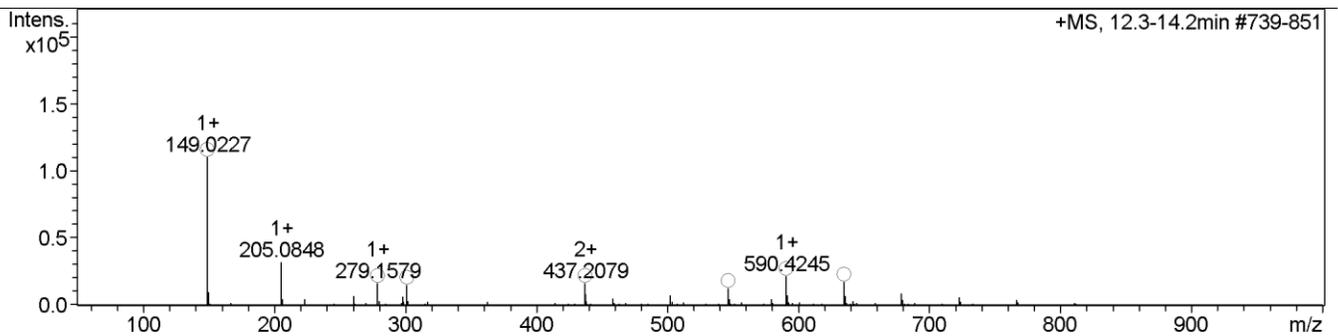
#	RT [min]	Area	S/N
1	2.9	376397	207.7
2	3.1	574614	246.5
3	4.4	34511	16.2
4	4.7	249795	143.3
5	5.0	316259	116.8
6	5.3	63747	37.3
7	5.5	67180	39.8
8	7.2	80573	38.9
9	9.2	138744	74.2
10	12.1	6086402	2100.0
11	12.4	2973779	571.6
12	16.9	738751	254.9
13	19.5	62608	36.4
14	21.8	2803575	1025.6

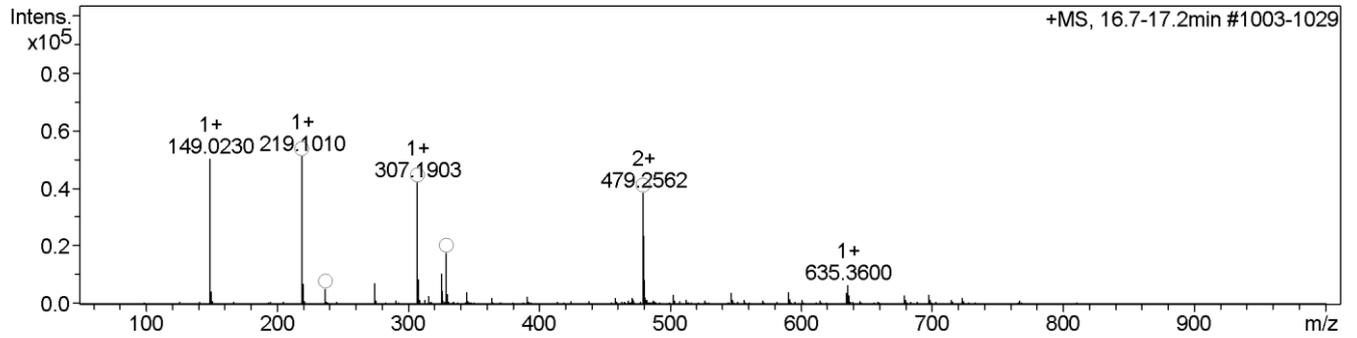
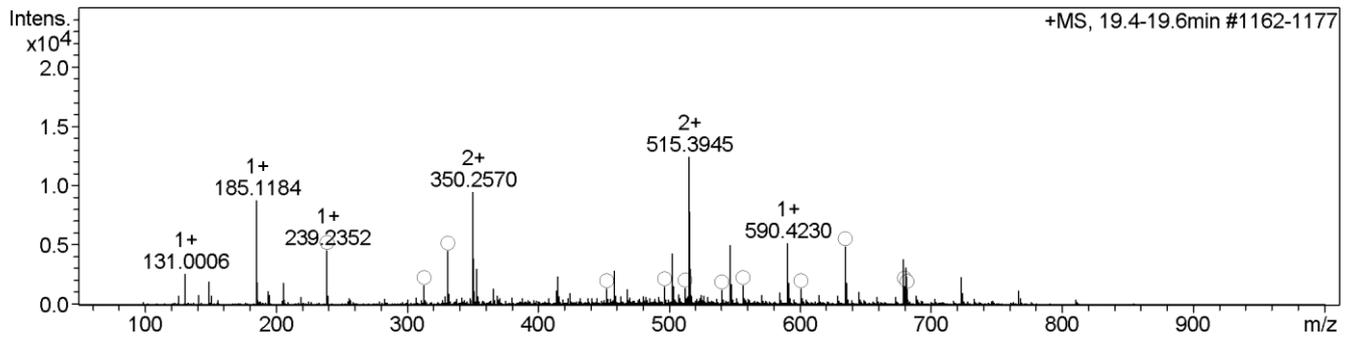
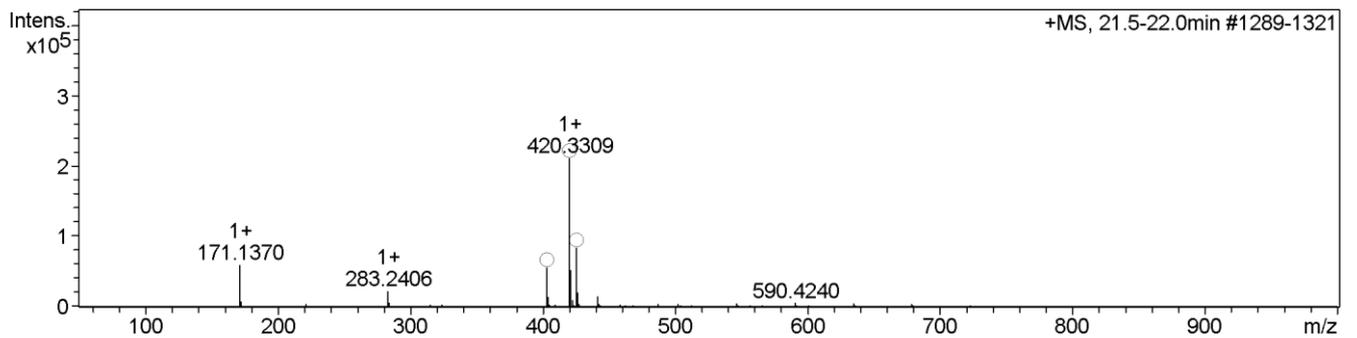
## Cmpd 1, 2.9 min



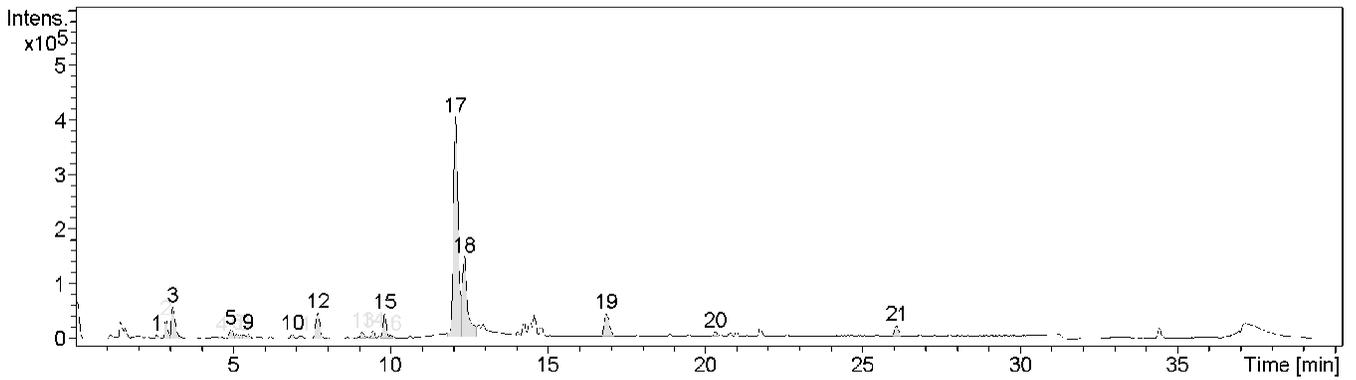
**Cmpd 2, 3.1 min****Cmpd 3, 4.4 m****Cmpd 4, 4.7 min**

**Cmpd 5, 5.0 min****Cmpd 6, 5.3 min****Cmpd 7, 5.5 min**

**Cmpd 8, 7.2 min****Cmpd 9, 9.2 min****Cmpd 10, 12.1 min****Cmpd 11, 12.4 min**

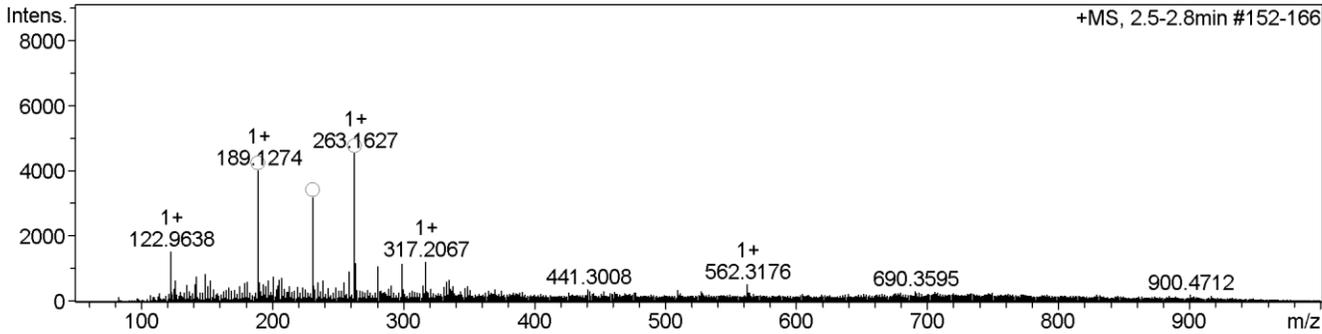
**Cmpd 12, 16.9 min****Cmpd 13, 19.5 min****Cmpd 14, 21.8 min**

## ANEXO B

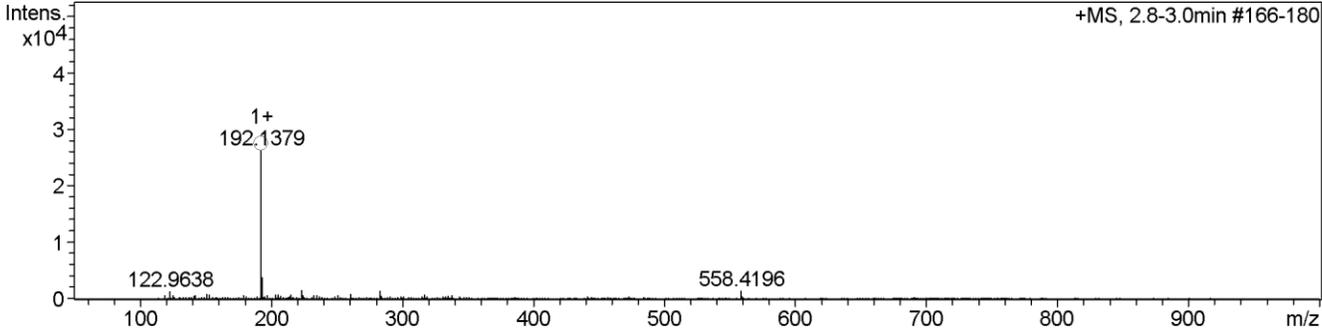
Dados de Espectrometria de Massas da F6 de *A.mirabilis*

#	RT [min]	Area	S/N
1	2.6	49636	23.9
2	2.9	240524	129.0
3	3.1	534787	221.9
4	4.6	29815	16.3
5	4.9	143986	63.2
6	5.1	62517	33.2
7	5.3	43020	27.7
8	5.4	33639	24.8
9	5.5	60870	30.2
10	6.9	50561	27.3
11	7.2	53491	20.5
12	7.7	402241	181.0
13	9.1	84008	43.3
14	9.4	79773	44.8
15	9.8	334516	173.1
16	10.0	28319	21.0
17	12.1	4166357	1556.4
18	12.3	1827571	561.0
19	16.9	438859	157.1
20	20.3	40913	27.1
21	26.1	153169	70.4

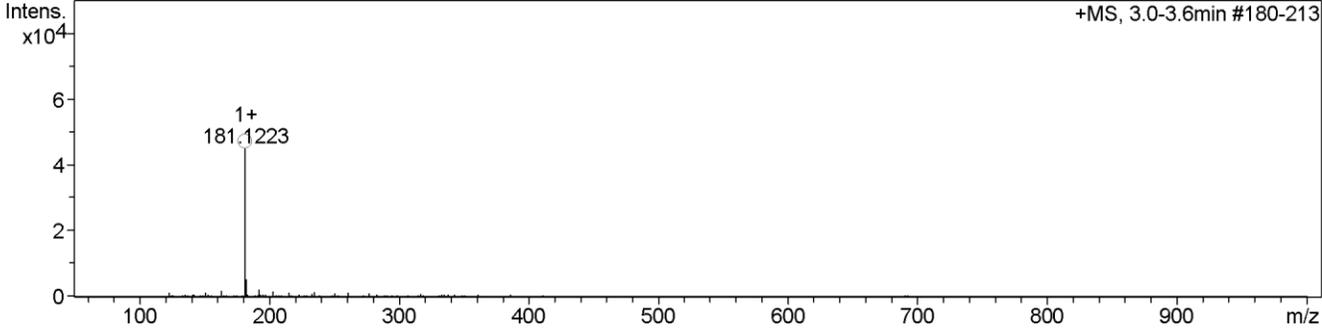
Cmpd 1, 2.6 min



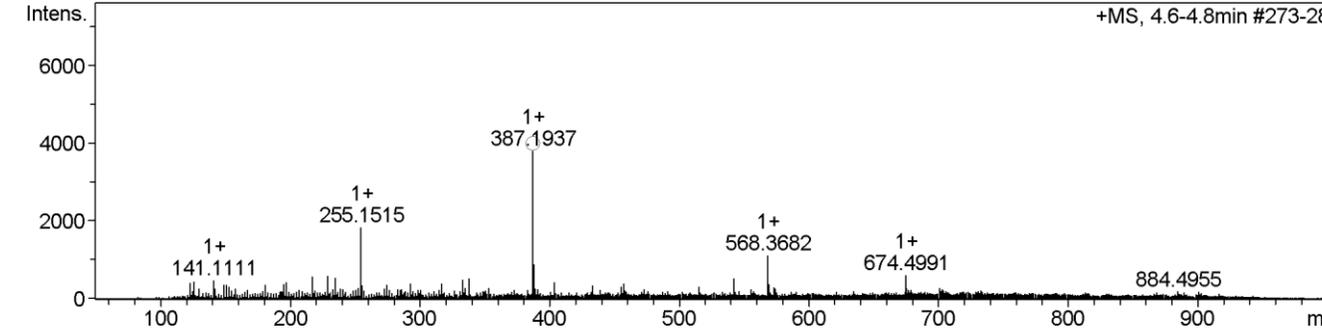
Cmpd 2, 2.9 min



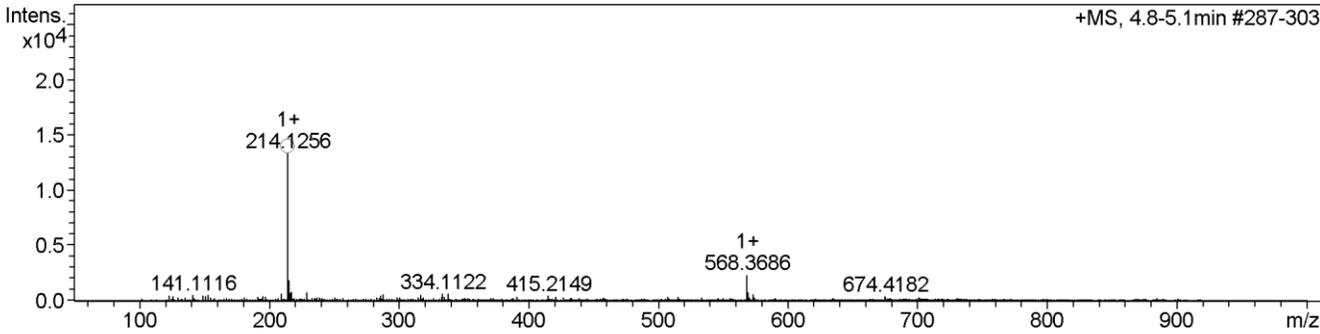
Cmpd 3, 3.1 min



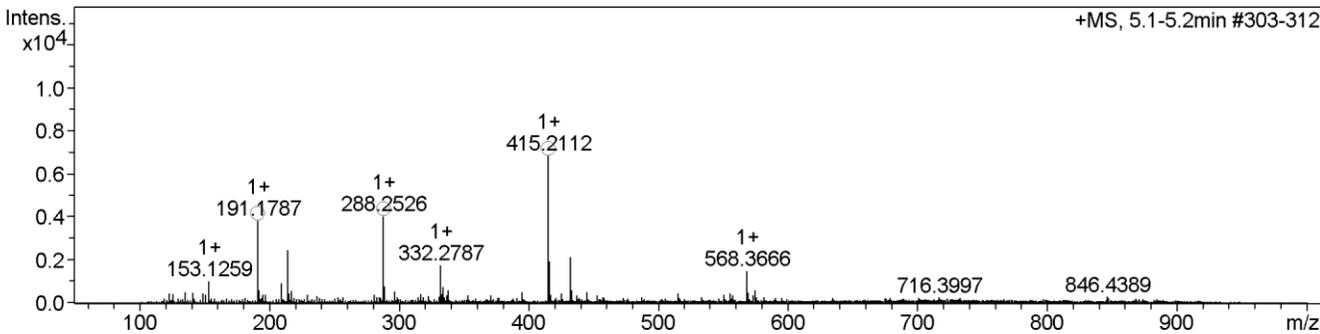
Cmpd 4, 4.6 min



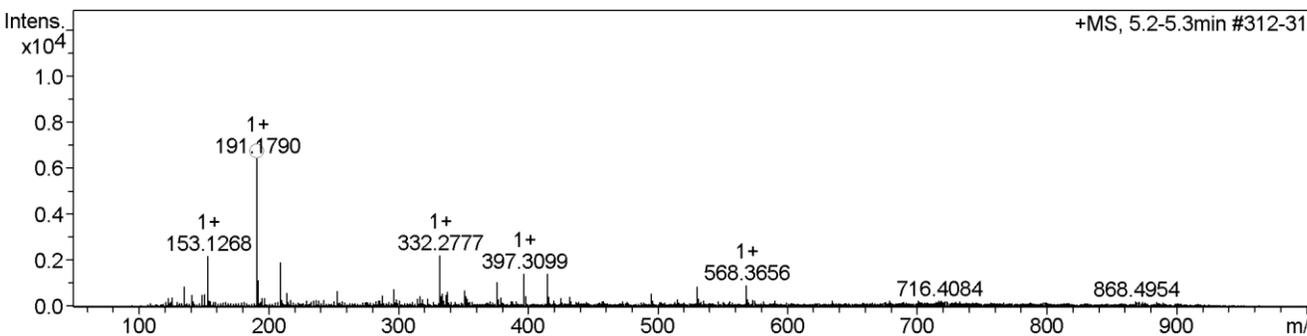
Cmpd 5, 4.9 min



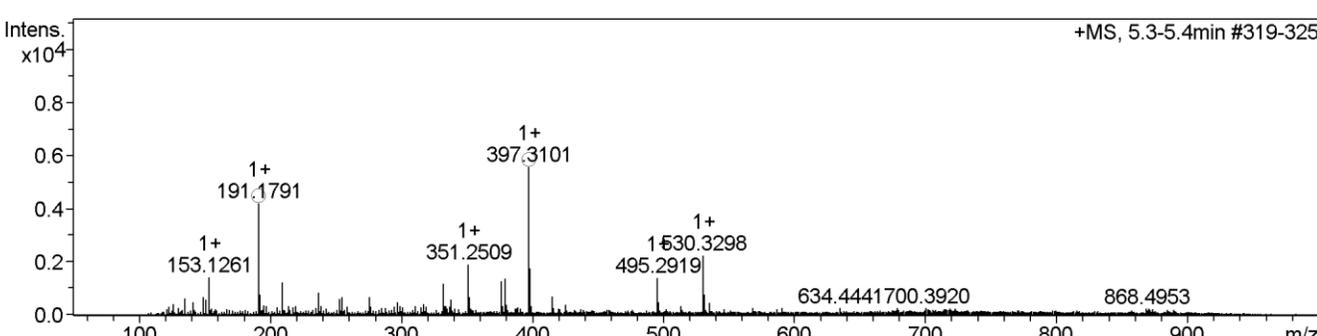
Cmpd 6, 5.1 min



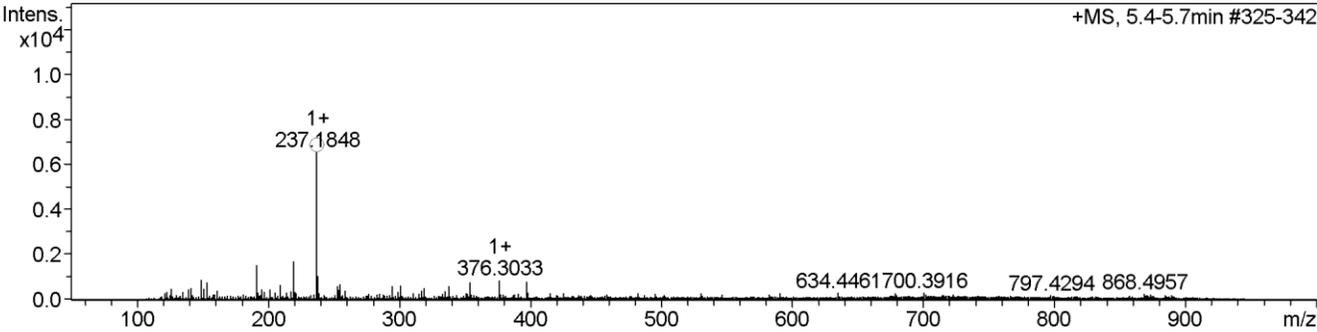
Cmpd 7, 5.3 min



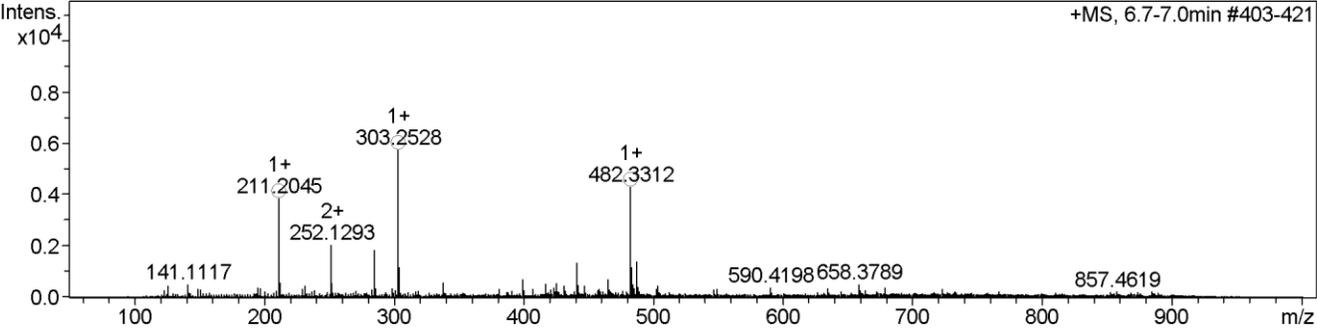
Cmpd 8, 5.4 min



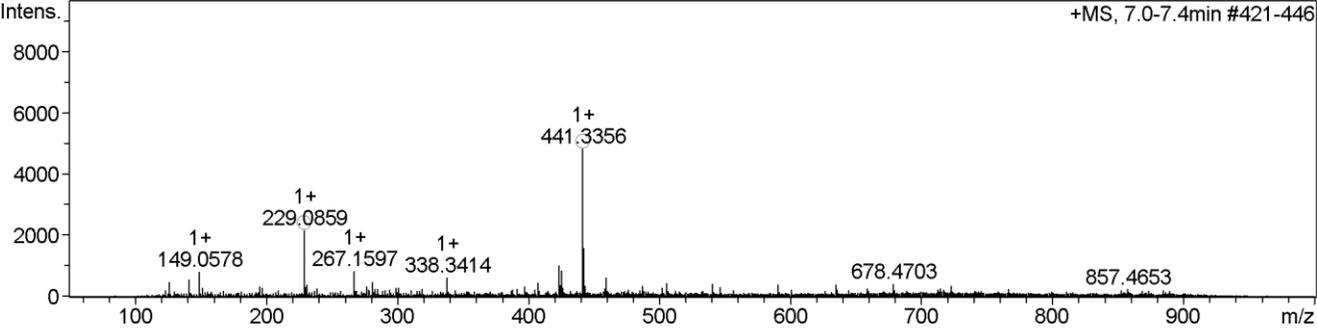
Cmpd 9, 5.5 min



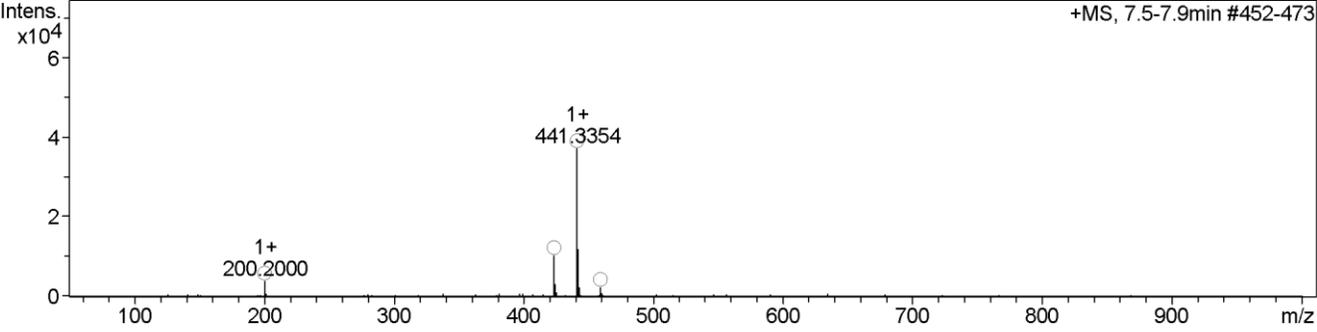
Cmpd 10, 6.9 min



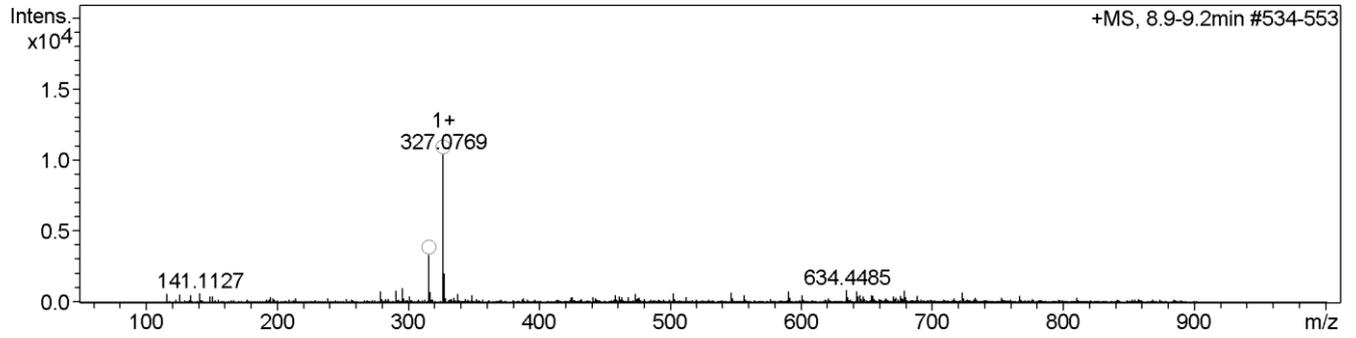
Cmpd 11, 7.2 min



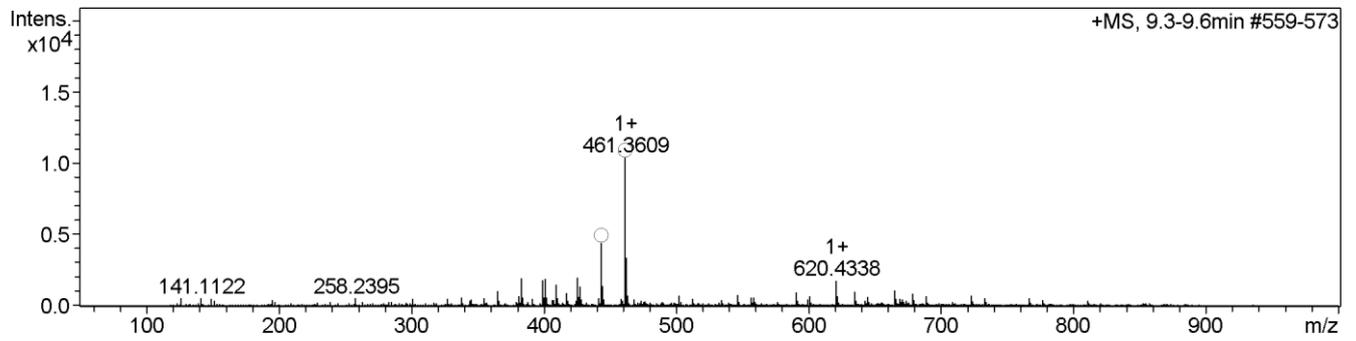
Cmpd 12, 7.7 min



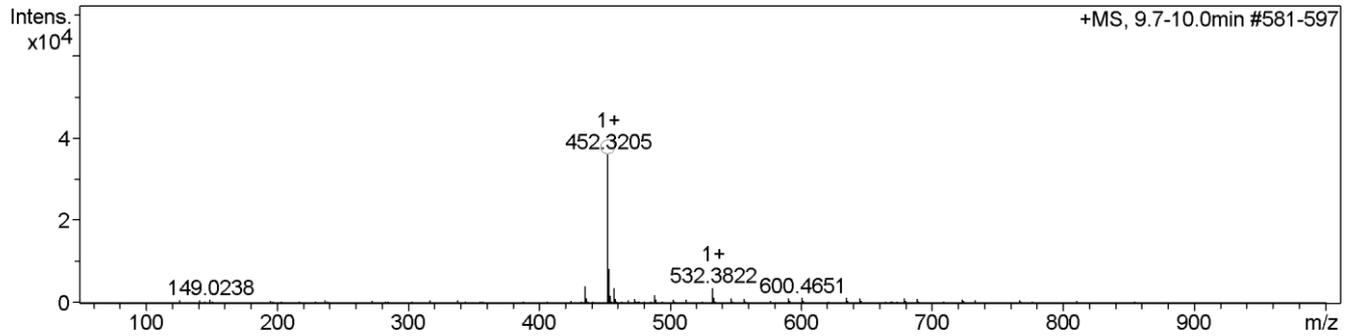
**Cmpd 13, 9.1 min**



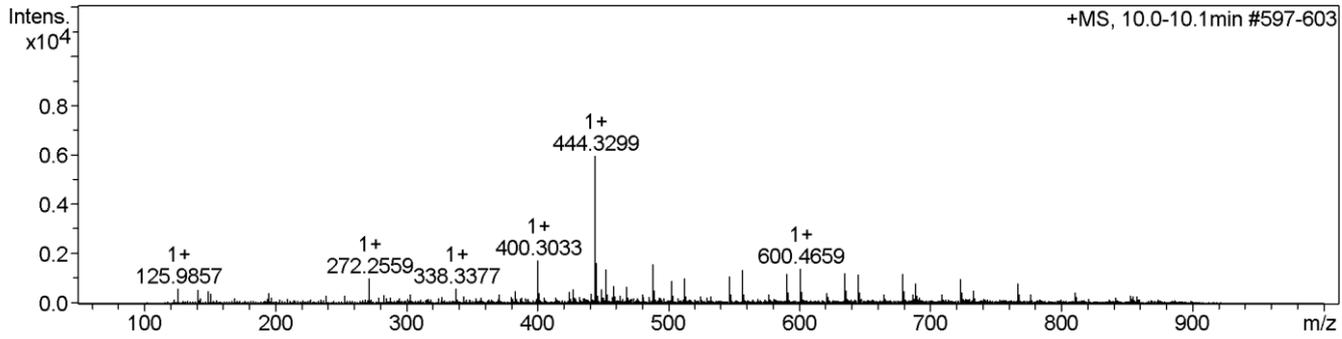
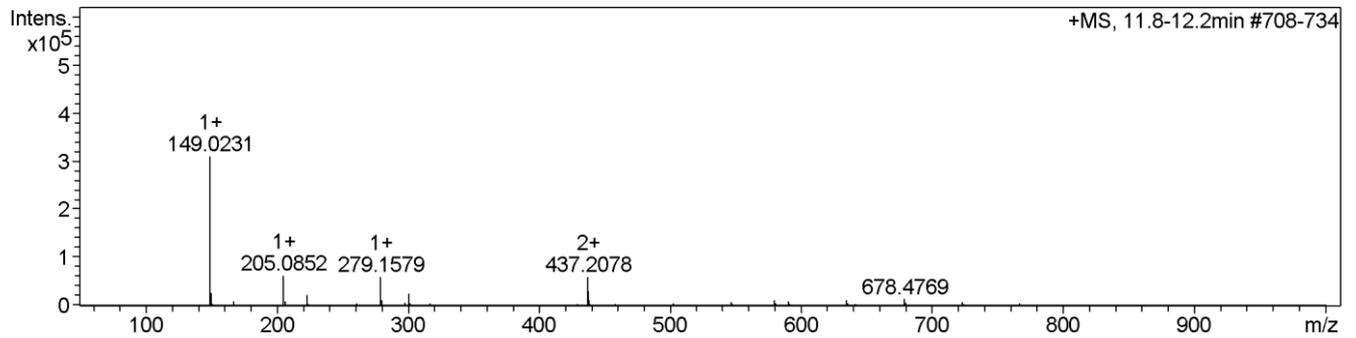
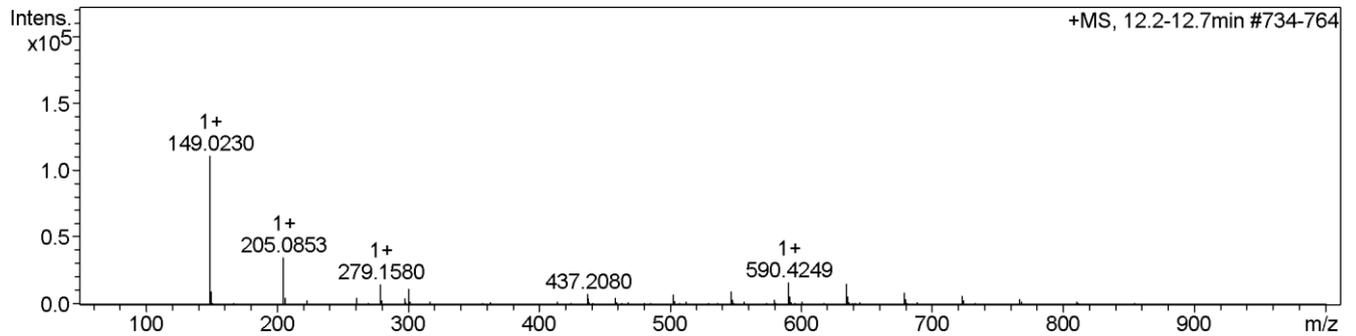
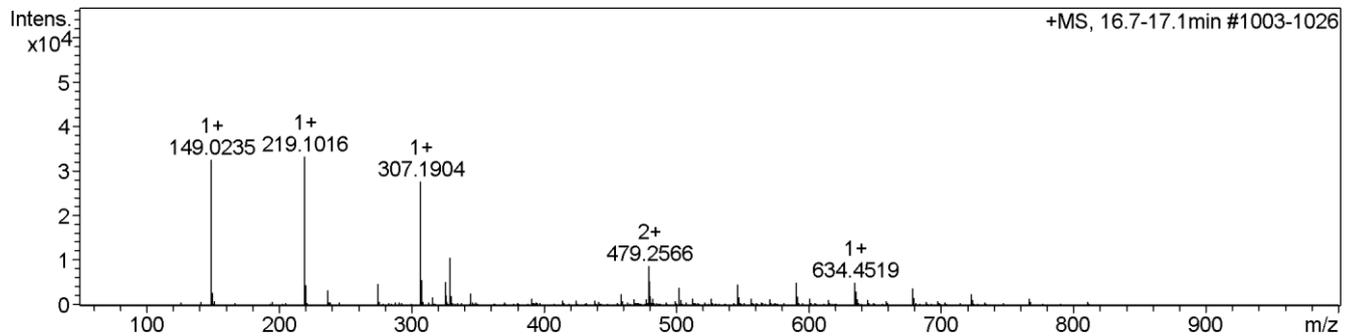
**Cmpd 14, 9.4 min**



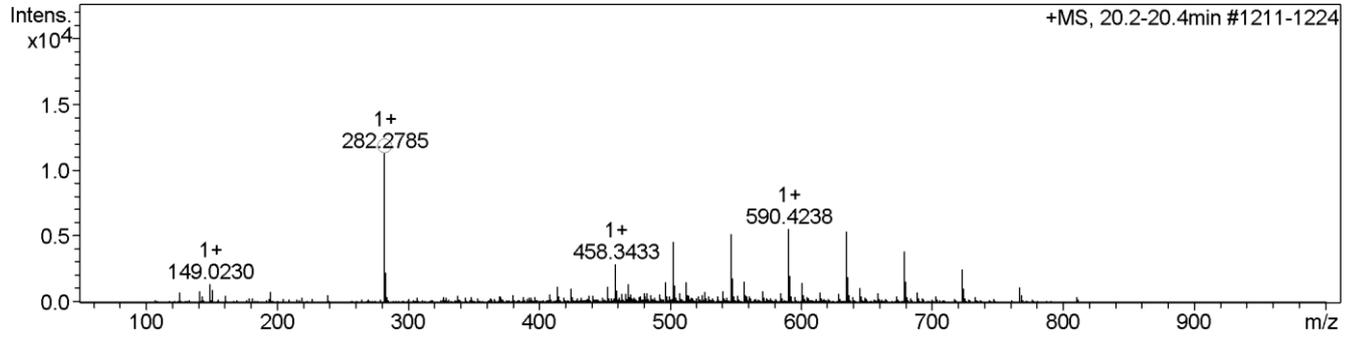
**Cmpd 15, 9.8 min**



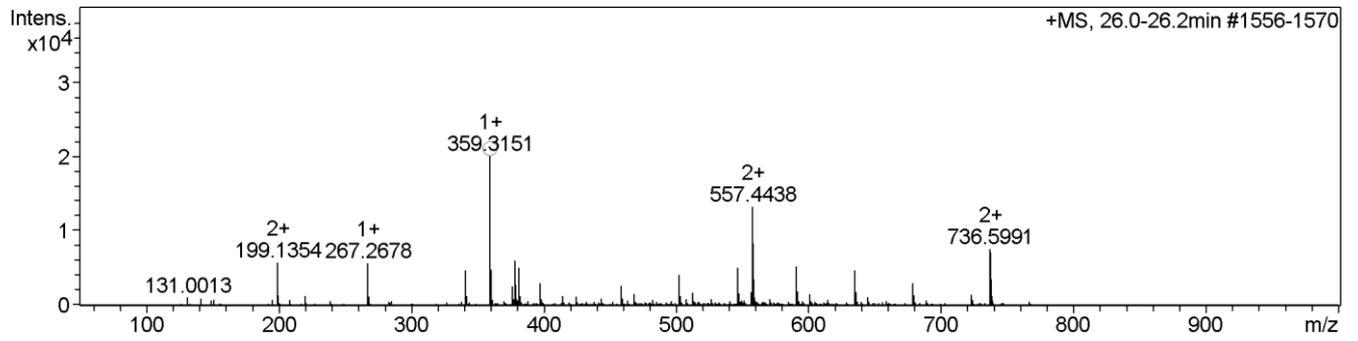
**Cmpd 16, 10.0 min**

**Compd 17, 12.1 min****Compd 18, 12.3 min****Compd 19, 16.9 min**

Cmpd 20, 20.3 min



Cmpd 21, 26.1 min



## ANEXO C

Possíveis compostos para as frações F3 e F6.

Tabela 12 - Possíveis compostos obtidos por CLAE-EM para a F3 obtida do extrato hexânico da alga *A. mirabilis*, encontradas nos bancos de dados HMDB, Metlin, SciFinder, LipdMass, Chebi, Pubchem e Chempider.

Pico	Massa (m/z)	Possíveis substâncias	Fórmula	Massa + adutos	Δppm
1	192.1371	-	-	-	-
2	181.1212	-	-	-	-
3	319.1536	(S,E)-Zearalenone	C18H22O5	319.1540	1
		6-Hydroxyenterodiol	C18H22O5	319.1540	1
		2-Hydroxyenterodiol	C18H22O5	319.1540	1
		4-Hydroxyenterodiol	C18H22O5	319.1540	1
4	387.1925	3-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)xanthyletin	C24H28O3	387.1931	1
5	214.1252	-	-	-	-
6	191.1784	-	-	-	-
7	237.1837	-	-	-	-
8	229.0854	-	-	-	-
9	327.0777	2-(4-Methyl-1,3-pentadienyl)anthraquinone	C20H16O2	327.0782	1
		Myclobutanil	C15H17ClN4	327.0773	1
10	279.1580	Dibutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Diisobutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Monoethylhexyl phthalic acid	C16H22O4	279.1591	4
11	279.1579	Dibutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Diisobutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Monoethylhexyl phthalic acid	C16H22O4	279.1591	4
12	307.1903	Capsiate	C18H26O4	307.1904	0
		5'-Carboxy-gamma-chromanol	C18H26O4	307.1904	0
		Di-n-pentyl phthalate	C18H26O4	307.1904	0
13	590.4230	-	-	-	-
14	420.3309	Sorbitan palmitate	C22H42O6	420.3320	2

Tabela 13 - Possíveis compostos obtidos por CLAE-EM para a F6 obtida do extrato hexânico da alga *A. mirabilis*, encontradas nos bancos de dados HMDB, Metlin, SciFinder, LipdMass, Chebi, Pubchem e Chempider.

Pico	Massa (m/z)	Possíveis substâncias	Fórmula	Massa + adutos	Δppm
1	263.1627	-	-	-	-
2	192.1379	N-Ethyl-N-Methylcathinone	C12H17NO	192.1383	1
3	181.1223	formyl 2E,4E,6Z-decatrienoate	C11H16O2	181.1223	0
		4-(Butoxymethyl)phenol	C11H16O2	181.1223	0
		formyl 2E,4Z,6Z decatrienoate	C11H16O2	181.1223	0
		7E,10-undecadien-4-olide	C11H16O2	181.1223	0
		2-Phenylpropionaldehyde dimethyl acetal	C11H16O2	181.1223	0
4	387.1937	3-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)xanthyletin	C24H28O3	387.1931	1
		9-Fluoro-11beta,16alpha-dihydroypregn-4-ene-3,20-dione	C21H29FO4	387.1942	1
		6alpha-Fluoro-11beta,17-dihydroypregn-4-ene-3,20-dione	C21H29FO4	387.1942	1
		7'-Carboxy-alpha-chromanol	C21H32O4	387.1932	1
5	214.1256	-	-	-	-
6	415.2112	Clausarinol	C24H30O6	415.2115	1
		4-O-Methylmelleolide	C24H30O6	415.2115	1
7	191.1790	-	-	-	-
8	397.3101	d-Tocotrienol	C27H40O2	397.3101	0
		alpha-Micropteroxanthin B	C27H40O2	397.3101	0
		delta3,5-Deoxyneotigogenin	C27H40O2	397.3101	0
		beta-Micropteroxanthin	C27H40O2	397.3101	0
		delta3,5-Deoxytigogenin	C27H40O2	397.3101	0

Continuação

9	237.1848	Capsidiol	C15H24O2	237.1849	0
		Humulene-8-hydroperoxide	C15H24O2	237.1849	0
10	303.2528	2,3-Dihydroxypropyl 12-methyltridecanoate	C17H34O4	303.2530	0
11	441.3356	5alpha,8alpha-epidioxy-stigmasta-6,9(11),22E-trien-3beta-ol	C29H44O3	441.3363	1
12	441.3354	5alpha,8alpha-epidioxy-stigmasta-6,9(11),22E-trien-3beta-ol	C29H44O3	441.3363	1
13	327.0769	-	-	-	-
14	461.3609	-	-	-	-
15	452.3205	-	-	-	-
16	<b>444.3299</b>	-	-	-	-
17	279.1579	Dibutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Diisobutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Monoethylhexyl phthalic acid	C16H22O4	279.1591	4
18	279.1580	Dibutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Diisobutyl phthalate	C16H22O4	279.1591	4
		Monoethylhexyl phthalic acid	C16H22O4	279.1591	4
19	307.1904	Capsiate	C18H26O4	307.1904	0
		5'-Carboxy-gamma-chromanol	C18H26O4	307.1904	0
		Di-n-pentyl phthalate	C18H26O4	307.1904	0
20	282.2785	-	-	-	-
21	<b>359.3151</b>	Glycerol 1-octadecanoate	C21H42O4	359.3156	1

## ANEXO D

Sequência de DNA obtida por amplificação em PCR utilizando os primers ITS1 e ITS4 de DNA ribossomal para o fungo endofítico AmpdbaMI2.

```
CTAGCGAGCCACCTCCNACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGG
GGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGAT
TGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCTCCCTCC
GGGGGGGACGGGCCCAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG
CTCTGTAGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA
```

## ANEXO E

Resultado *Blast* para a espécie *Aspergillus flavus*.

```
1 CTAGCGAGCCACCTCCNACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAT 60
|
|
1 CTAGCGAGCCACCTCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAT 60
|
|
61 TCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGAACTCT 120
|
|
61 TCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGAACTCT 120
|
|
121 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG 180
|
|
121 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG 180
|
|
181 ATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGC 240
|
|
181 ATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGC 240
|
|
241 AGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG 300
|
|
241 AGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG 300
|
|
301 CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC 360
|
|
301 CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC 360
|
|
361 CCCTCTCCgggggggACGGGCCCAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCG 420
|
|
361 CCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCG 420
|
|
421 TATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATC 480
|
|
421 TATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATC 480
|
|
481 TTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA 538
```

```

|||||
481 TTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA 538

```

Resultado Blast para a espécie *Aspergillus oryzae*.

```

1 CTAGCGAGCCACCTCCNACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAT 60
|
|
|
1 CTAGCGAGCCACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAT 60
|
|
|
61 TCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCGCGCCGCGGAGACACCACGAACTCT 120
|
|
|
61 TCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCGCGCCGCGGAGACACCACGAACTCT 120
|
|
|
121 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG 180
|
|
|
121 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG 180
|
|
|
181 ATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGC 240
|
|
|
181 ATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGC 240
|
|
|
241 AGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG 300
|
|
|
241 AGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG 300
|
|
|
301 CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC 360
|
|
|
301 CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC 360
|
|
|
361 CCCTCTCCgggggggACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCACC GCGTCCGATCCTCGAGCG 420
|
|
|
361 CCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCACC GCGTCCGATCCTCGAGCG 420
|
|
|
421 TATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATC 480
|
|
|
421 TATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATC 480
|
|
|
481 TTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 536
|
|
|
481 TTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 536

```