

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BqBM
LABORATÓRIO DE DIVERSIDADE MOLECULAR

Sibelle Leite Aldeman de Oliveira

**Prospecção de metabólitos secundários produzidos
por fungos marinhos com atividade antifúngica**

Maceió-AL

2021

Sibelle Leite Aldeman de Oliveira

**Prospecção de metabólitos secundários produzidos
por fungos marinhos com atividade antifúngica**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Melissa Fontes Landell

Coorientadora: Prf.^a Dr.^a Helena B. Nader

Dissertação apresentada ao programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Maceió-AL

2021

SIBELLE LEITE ALDEMAN DE OLIVEIRA

PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS MARINHOS COM
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Dissertação de Mestrado do Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade
Federal de Alagoas aprovada no dia 19
de fevereiro de 2021.

Banca Examinadora:

Melissa Fontes Landell

Orientador: Profa. Dra. Melissa Fontes Landell

João Xavier de Araújo Júnior

Avaliador 1: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Francis Soares Gomes

Avaliador 2: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Luciano A. M. Grillo

Avaliador 3: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- O48p Oliveira, Sibelle Leite Aldeman de.
Prospecção de metabólitos secundários produzidos por fungos marinhos com atividade antifúngica / Sibelle Leite Aldeman de Oliveira. – 2021.
92 f. : il.
- Orientadora: Melissa Fontes Landell.
Co-orientadora: Helena B. Nader.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Macció, 2021.
- Bibliografia: f. 77-92.
1. Compostos fitoquímicos. 2. Biotecnologia. 3. Microrganismos aquáticos.
I. Título.
- CDU: 661.163.2

“Quando as raízes são profundas,
não há razão para temer o vento.”

(proverbio chinês)

Dedico está dissertação a minha família...

Aos meus pais Claumir e Graças;

Ao meu filho Dominick;

Aos meus irmãos Fred e Wedeman;

Aos meus sobrinhos Lucas, Laura, Miguel e Ana
Lívia;

E minhas cunhadas Ana Paula e Marily.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças e saúde e por está ao meu lado nas construções das minhas metas e nas realizações dos meus objetivos e por proporcionar cada dia estar mais próxima dos meus sonhos.

Ao meu filho Dominick por ser o meu maior motivo de toda minha luta. Meu único amor.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Melissa Fontes Landell por todo aprendizado, acolhimento e por todo momento vivido nessa caminhada, toda minha gratidão.

Aos meus queridos amigos Gustavo Paulino, Ciro Ramon e James Henrique, do Laboratório de Diversidade Molecular, pela companhia e por ter proporcionado momentos únicos.

A minha querida amiga Dayse, do Laboratório de Diversidade Molecular, por ter sido meu ombro amigo nessa jornada e pelas alegrias do dia a dia, todo meu amor e gratidão.

Ao Prof^o Dr^o Alexandre José Macedo da UFRGS e ao LaBDiM pela colaboração científica.

A Universidade Federal de Alagoas pela oportunidade de construir o máximo de conhecimento.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À Rede Nacional de Biotecnologia Marinha – BIOTECMAR.

A toda a minha família pelas orações, apoio e por acreditar em meus objetivos para realização dos meus sonhos. Amo todos vocês.

“A força não provém da capacidade física. Provém de uma
vontade indomável.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O ambiente marinho tem se tornado promissor na busca por substâncias químicas com potencial biotecnológico, farmacêutico e agrícola. Estas substâncias complexas são produzidas muitas vezes por micro-organismos associados aos invertebrados marinhos (corais e esponjas), destacando-se os fungos filamentosos. Este grupo de micro-organismos tem mostrado potencial por possuírem rotas bioquímicas peculiares capazes de sintetizar metabólitos característicos ou específicos de uma espécie. Esses produtos naturais conferem propriedades antifúngicas, antimicrobianas, antioxidante, anti-inflamatória, antivirais, entre outros. Logo, o objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão sistemática sobre fungos marinhos e metabólitos secundários com atividades biológicas e investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos de Maceió/AL com atividade antifúngica contra agentes infecciosos. A revisão sistemática foi realizada através de buscas de palavras chave como “marine fungi”, “antifungal”, “secondary metabolite” e “natural products” nas bases de dados Pubmed e Science Direct, obtendo 19 artigos publicados entre os anos de 2015 e 2020 que descrevem 84 metabólitos produzidos fungos marinhos. O potencial biotecnológico foi verificado a partir da produção de extratos brutos de 16 fungos, coletados no recife de coral da Praia de Ponta Verde, Maceió-AL. Para a obtenção dos extratos fúngicos, os mesmos foram cultivados. Após cultivo de 7 dias em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), seguido de um segundo cultivo de 14 dias em meio líquido composto por glicose 1%, extrato de levedura 0,1%, cloreto de potássio 0,1%, cloreto de sódio 0,1%, o sobrenadante e o micélio dos fungos foram extraídos com acetato de etila, gerando uma fração orgânica e aquosa. Posteriormente foram analisados através da técnica de Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para analisar a sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos. Extratos brutos de dez fungos marinhos apresentaram atividade antifúngica contra a levedura *Candida haemulonii*, cinco contra *Candida albicans*, dois contra *Cryptococcus gatti* e 10 contra *Cryptococcus neoformans*. Dois dos extratos dos fungos ativos foram fracionados com metanol, acetonitrila e água e testados novamente pelo método CIM. Os fungos *C. neoformans* ATCC 40283 e *C. albicans* ATCC 90028 foram inibidos por todas as frações testadas apresentando CIM entre 0,5-2 µ/mL, demonstrando que os compostos bioativos derivados de micro-organismos marinhos possuem potencial antimicrobiano e biotecnológico.

Palavras-chave: compostos bioativos, biotecnologia, micro-organismos marinhos.

ABSTRACT

The marine environment has become promising in the search for chemical substances with biotechnological, pharmaceutical and agricultural potential. These complex substances are often produced by microorganisms associated with marine invertebrates (corals and sponges), especially filamentous fungi. This group of microorganisms has shown potential because they have peculiar biochemical routes capable of synthesizing characteristic or species-specific metabolites. These natural products provide antifungal, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral properties, among others. Therefore, the objective of this work was to make a systematic review on marine fungi and secondary metabolites with biological activities and to investigate the biotechnological potential of filamentous fungi associated with marine invertebrates in Maceió / AL with antifungal activity against infectious agents. The systematic review was carried out by searching for keywords such as “marine fungi”, “antifungal”, “secondary metabolite” and “natural products” in the Pubmed and Science Direct databases, obtaining 19 articles published between the years 2015 and 2020 that describe 84 metabolites produced by marine fungi. The biotechnological potential was verified from the production of crude extracts from 16 fungi, collected in the coral reef of Praia de Ponta Verde, Maceió-AL. To obtain the fungal extracts, they were grown. After cultivation of 7 days in Potato Dextrose Agar (BDA), followed by a second cultivation of 14 days in liquid medium composed of 1% glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% potassium chloride, sodium chloride 0.1%, the fungi supernatant and mycelium were extracted with ethyl acetate, generating an organic and aqueous fraction. Subsequently, they were analyzed using the Minimum Inhibitory Concentration Determination (MIC) technique to analyze the sensitivity of microorganisms to antimicrobials. Crude extracts from ten marine fungi showed antifungal activity against the yeast *Candida haemulonii*, five against *Candida albicans*, two against *Cryptococcus gatti* and 10 against *Cryptococcus neoformans*. Two of the extracts of the active fungi were fractionated with methanol, acetonitrile and water and tested again by the CIM method. The fungi *C. neoformans* ATCC 40283 and *C. albicans* ATCC 90028 were inhibited by all tested fractions, presenting MIC between 0.5-2.0 μ /mL, demonstrating that the bioactive compounds derived from marine microorganisms have antimicrobial and biotechnological potential.

Keywords: bioactive compounds, biotechnology, marine microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Papel ecológico dos metabólitos secundários dos fungos. Interações entre animais, plantas e micro-organismos por comunicação, defesa e virulência.	24
Figura 2: Complexos de espécies de <i>Cryptococcus</i>	29
Figura 3: Estrutura molecular do ergosterol	32
Figura 4: Estrutura molecular da nistatina (A) e anfotericina B (B).....	33
Figura 5: Estrutura molecular da 5-fluorouracil.....	34
Figura 6: Estrutura química do fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol.....	35
Figura 7: Biossíntese do Ergosterol e os principais alvos dos antifúngicos allilaminas, azóis e poliênicos.	35
Figura 8: Mecanismo de ação dos azólicos, tendo como alvo a enzima α -14-esterol-dimetilase responsável pela fase final da biossíntese do ergosterol. ...	36
Figura 9: Estrutura química da caspofungina (A), micafungina (B) e anidulafungina (C).	37
Figura 10: Estrutura molecular da digoxina.	39
Figura 11: Estrutura molecular da actinomicina (A), estreptomicina (B), vancomicina (C), cloranfenicol (D) e clortetraciclina (E).	40
Figura 12: Estrutura molecular da penicilina (A), tetraciclina (B) e lovastatina (C).	42
Figura 13: Estrutura molecular da ergometrina.	43
Figura 14: ARA-A e ARA-C, medicamentos utilizados até hoje, inspirados nos modelos naturais espongouridina e espongotimidina, isolados da esponja caraíbas <i>Cryptotethya crypta</i>	44
Figura 15: Diagrama da revisão sistemática realizada a partir das bases de dados <i>Pubmed</i> e <i>Science Direct</i> entre os anos de 2015 e 2020.....	55
Figura 16: Habitats dos fungos marinhos isolados.....	56
Figura 17: Metabólitos antimicrobianos isolados de fungos marinhos baseado em sua estrutura molecular.	56
Figura 18: Fontes de metabólitos fúngicos marinhos com atividade antimicrobiana.	57
Figura 19: Estrutura química dos compostos 1-10.....	61

Figura 20: Estrutura química dos compostos do 11-21.....	63
Figura 21: Estrutura química dos compostos 22-33.....	64
Figura 22: Estruturas químicas dos compostos 34-39.....	65
Figura 23: Estrutura química dos compostos 40-46.....	66
Figura 24: Estruturas químicas dos compostos 47-54.....	67
Figura 25: Estruturas químicas dos compostos 55-67.....	68
Figura 26: Estruturas químicas dos compostos 68-79.....	70
Figura 27: Estrutura química dos compostos 80-84.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espectro de atividades e mecanismos de ação e resistência dos principais antifúngicos.	31
Tabela 2: Produtos naturais marinhos aprovados como fármacos. Nome do princípio ativo, estrutura molecular e atividade biológica.	45
Tabela 3: Novos metabólitos antimicrobianos produzidos por fungos marinhos em 2015-2020.....	58
Tabela 4: Espécies de fungos marinhos isolados a partir de invertebrados marinhos coletados no recife de coral da Praia de Ponta Verde, Maceió-AL...	73
Tabela 5: Extratos de fungos marinhos que obtiveram atividade inibitória contra espécies patogênicas dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>	74
Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) das frações de fungos marinhos associados a invertebrados marinhos (corais) coletados no recife de coral da praia de Ponta Verde, Maceió/AL.	75

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

PNM	Produtos Naturais Marinhos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
LDM	Laboratório de Diversidade Molecular
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
BDA	Ágar Batata Dextrose
LaBDIM	Laboratório de Biofilme e Diversidade Microbiana
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
H ₂ O	Água
AC	Acetonitrila
MeOH	Metanol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Intitute</i>
PKS	Policetídeos Sintase Multimodulares
NRPS	Peptídeos Sintetase não – Ribossômicos
TOS	Transplante de Órgãos Sólidos
TCTH	Transplante de Célula – Tronco Hematopoiético
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
mg	Miligramas
µg	Microgramas
µg/mL	Microgramas por mililitros
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Fungos marinhos: generalidades, metabólitos secundários e atividades biológicas	19
2.1.1 Ambiente marinho.....	19
2.1.2 Fungos Marinhos e metabólitos secundários.....	21
2.1.3 Infecções fúngicas e os antifúngicos	24
2.1.3.1 Candida spp.	25
2.1.3.2 Cryptococcus spp.	28
2.1.4 Drogas antifúngicas: mecanismos de ação e resistência	31
2.1.4.1 Polienos.....	32
2.1.4.2 Análogos de Pirimidina	33
2.1.4.3 Triazóis	34
2.1.4.4 Equinocandinas	36
2.1.5 Potencial biológico e farmacológico de produtos naturais marinhos	38
2.1.6 Organismos marinhos, micro-organismos associados e a produção de metabólitos secundários	47
3. OBJETIVO	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. METODOLOGIA	51
4.1 Critério de inclusão	51
4.2 Critério de exclusão	52
4.3 Obtenção dos micro-organismos	52
4.4 Obtenção dos extratos brutos.....	52
4.5 Teste para atividade antifúngica - Concentração inibitória mínima (CIM)	53

CAPÍTULO 1: REVISÃO SISTEMÁTICA DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE FUNGOS MARINHOS, 2015-2020.	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
CAPÍTULO 2: PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS MARINHOS DO LITORAL DE ALAGOAS	72
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERÊNCIA	79

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos contêm uma rica biodiversidade do planeta, apresentando 70% de sua ocupação territorial. E como ainda é pouco explorado tornou-se uma competente fonte para descoberta de novos organismos marinhos com valor biotecnológico (BARBERO; DÍEZ-POZA; BARBERO, 2017). Taxonomicamente, de todos os 76 filos pertencentes aos eucariotos, registrados no *Catalogue of Life*, 60 filos estão relacionados ao ambiente marinho. Atualmente, conta nos registros da *World Register of Marine Species - WoRMS* cerca de 462.614 espécies aceitas (WoRMS, 2020). Com a biodiversidade encontrada nos oceanos, pesquisadores vêm estudando e buscando por novas espécies e substâncias com estruturas complexas e biologicamente ativas. Várias dessas descobertas originaram-se inúmeros fármacos utilizados atualmente no mercado (CHOUDHARY et al., 2017).

Na década de 50, Bergman publicou pela primeira vez a composição química de um organismo marinho, as esponjas (BERGMANN, 1955). Com o decorrer dos anos, estudos relacionados à taxonomia, o desenvolvimento de técnicas para isolar, caracterizar e identificar substâncias e o avanço de estudos biomoleculares auxiliaram nos estudos sobre os produtos naturais marinhos que possuem variadas atividades biológicas, como, anticâncer, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária, etc. (BLUNT et al., 2012). A grande evolução dos Produtos Naturais Marinhos (PNM) deu-se nas últimas duas décadas através das evidências da importância de organismos que vivem em associação com micro-organismos marinhos (BLUNT et al., 2017).

A princípio as buscas e estudos por PNM eram realizadas em corais, algas vermelhas e esponjas por serem organismos acessíveis. E a partir desses estudos iniciais foram revelados compostos inéditos e halogenados, em virtude da disponibilidade de cloro e bromo dispersos na água do mar, direcionando o aumento de pesquisas em organismos marinhos com substância química peculiar (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010). Posteriormente, com o avanço das técnicas de mergulho, tornou possível a exploração de organismos antes inacessíveis, puderam estudar fungos,

cianobactérias e bactérias marinhas, surgindo como novas fontes de metabolitos secundários. Conseqüentemente, inúmeros PNM foram isolados e re-isolados de micro-organismos, que anteriormente eram declaradas como de origem de invertebrados marinhos, e assim destacando a importância da associação entre eles (NWEZE et al., 2020).

No Brasil, Bernard Tursch, iniciou os estudos com organismos marinhos na década de 60, isolando o colesterol oriundo de um ouriço-do-mar. As pesquisas se estenderam com as algas marinhas e invertebrados marinhos e na década de 90 encabeçaram estudos com micro-organismos marinhos (BERLINCK et al., 2004). O Brasil apresenta uma diversidade biológica por toda sua faixa litorânea, que é estimada em 8000 km de costa marítima, mas pouco explorada em termos biotecnológicos. Os estudos realizados no ambiente marinho brasileiro vêm revelando uma diversificada classe de compostos químicos como alcaloides, peptídeos e policetídeos que apresentam atividades anticancerígenas (BERLINCK et al., 2017). No entanto, a busca por moléculas bioativas a partir de organismos marinhos nos fornece um grande número de substâncias desconhecidas e que demonstram atividades diversas em sistemas biológicos. Pesquisar produtos naturais tem se tornado de grande relevância para o conhecimento, devido a urgente necessidade de descobrir novos fármacos com eficácia terapêutica contra agentes infecciosos (TAN et al., 2018).

Os fungos têm sido reconhecidos como uma grande fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade médica, na agricultura e farmacêutica. Sabe-se que as estruturas inéditas e extratos bioativos produzidos pelos fungos superam a quantidade de substâncias naturais produzidas por qualquer outro micro-organismo de qualquer habitat (BARBOSA et al., 2020). Isso pode estar relacionado com a interação simbiótica, estabelecida por indução de vias biossintéticas específicas que são capazes de produzir metabólitos secundários inéditos, e isso dependendo de fatores bióticos e abióticos (APPRILL, 2020). Esses metabólitos secundários produzidos por fungos marinhos possuem estrutura complexas e com alta diversidade de atividades biológicas, que já foram descritas, como atividades antibacterianas,

antifúngicas, antivirais, antioxidantes, antitumorais e antiinflamatória (TELES et al., 2020).

Os fungos oportunistas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* são responsáveis por doenças como candidíase (*C. albicans*) e criptococose (*C. neoformans*). São responsáveis também por doenças do trato urogenital humano, orofaríngeo e estão associados às infecções de pacientes imunodeprimidos e hospitalizados (LIONAKIS, 2019). Os fármacos pertencentes às classes triazólicos (Fluconazol) e polienos (Anfontericina B) são utilizados nos tratamentos terapêuticos contra esses fungos oportunistas. Porém, tem aumentado o número de isolados resistentes a esses medicamentos, fazendo com que sejam necessárias novas alternativas para o tratamento das doenças negligenciadas (CHAABANE et al., 2019).

Assim, por meio de isolamento, caracterização e identificação dos micro-organismos associados a invertebrados marinhos, podemos alcançar um numeroso espectro de moléculas conjuntas de estruturas complexas, que apresentem novos mecanismos de ação contra diversos patógenos (RENGASAMY et al., 2020). Com isso, destacar a importância do ambiente marinho nas suas mais variadas vertentes de linha de pesquisa. Considerando que no Brasil existe uma área pouco explorada ao longo de sua costa e observar a relevância dos estudos dos PNM e as pesquisas voltadas para a prospecção química e biológica de micro-organismos marinhos (OLIVEIRA et al., 2020).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos marinhos: generalidades, metabólitos secundários e atividades biológicas

2.1.1 Ambiente marinho

A biota marinha representa um dos ambientes extremos mais inexplorados do mundo. Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre e aproximadamente metade das espécies da terra está presente no mundo marinho (VERDES; HOLFORD, 2018). Esses organismos conseguiram evoluir e se adaptar às diversas regiões do planeta, como regiões tropicais, lugares frios, os próprios oceanos e regiões temperadas (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). O ambiente marinho também apresenta especificidade que difere de forma significativa do ambiente terrestre, sendo a salinidade elevada a principal. Esta salinidade pode variar de 3,4 a 3,7% em mares abertos e podendo chegar a 30% em mares fechados (XIE et al., 2018). Entretanto, o que torna o ambiente marinho diferenciado é o fato de reunir todas as variáveis em um mesmo ambiente como: pressão, temperatura, pH, exposição a período de incidência solar contínua, influência na tábua de maré, predadores, concentração de oxigênio e nutrientes (LAURITANO; IANORA, 2020).

Essa biodiversidade dos organismos marinhos representa a maioria dos filos até hoje descrito. De todos os 76 filos pertencentes aos eucariotos, registrado no *Catalogue of Life*, 60 filos estão relacionados ao ambiente marinho. Atualmente conta nos registros da *World Register of Marine Species - WoRMS* cerca de 462.614 espécies aceitas. Sendo que, destes, 1.730 são espécies aceitas do Reino Fungi e suas divisões baseadas nos filos são: *Ascomycota* (1.027 espécies aceitas), *Basidiomycota* (91 espécies aceitas), *Chytridiomycota* (28 espécies aceita), *Microsporídia* (221 espécies aceitas) e *Zygomycota* (8 espécies aceitas) (WoRMS, 2020).

Sabendo disso, o ambiente marinho por muito tempo foi cobiçado para novas pesquisas à procura de novas moléculas que poderiam ser utilizadas como novos fármacos e nos tratamentos terapêuticos (TORTORELLA et al., 2018). Entretanto, até a década de 50, as dificuldades para pesquisas por causa da falta de tecnologia para alcançar espécies de maiores profundidades impediram os avanços nas buscas de novas moléculas bioativas. Em meados dos anos 80, novas tecnologias voltadas ao mergulho puderam colaborar para descoberta de algas e invertebrados que começaram a ser analisados pelos cientistas do mundo todo. Estes descobriram que os bioensaios executados com extratos de organismos marinhos apresentavam potencial maior como anticancerígenos do que produtos naturais de origem terrestre (MOHR, 2016). A partir disso, animais e plantas marinhas se tornaram alvo de pesquisa constante, sendo descobertos milhares de novas moléculas que originaram novos compostos (ALBARANO et al., 2020).

A grande diversidade de micro-organismos pode ser encontrada em associação com invertebrados e vertebrados marinhos. Um dos principais organismos invertebrados são à base de um ecossistema produtivo e sustentável, os recifes de corais. Neles encontramos uma rica biodiversidade incluindo pequenos invertebrados, plantas e até grandes mamíferos. Assim, possuindo um ecossistema completo onde se predomina os micro-organismos.

O Brasil apresenta uma diversidade biológica por toda sua faixa litorânea, que é estimada em 8000 km de costa marítima, adjacente a mais de 800.000 km² de plataforma continental (BERLINCK et al., 2004). No nordeste da costa brasileira, apresenta características distintivas entre o substrato e organismos relacionados. Sua extensa cobertura carbonácea de 4000 km é dominada por algas calcárias duras, que proporcionam estabilidade a esses substratos e possui uma variedade de Flora e fauna (BERLINCK et al., 2017). Os recifes de franja são comuns ao longo de toda costa nordestina e associadas a eles uma fauna de recifes de corais e arenitos possuindo uma alta taxa de endemismo (BERLINCK et al., 2004). Em Alagoas, podem ser observados os recifes na costa marítima, próximo às áreas urbanas, como os recifes de corais da Ponta Verde. E os corais predominantes nos recifes brasileiros são representados pelo gênero *Palythoa* e *Zoanthus* (ROHLFS; BELEM, 1994). Contudo, apesar

da sua rica biodiversidade, a costa brasileira é pouco explorada em termos biotecnológicos (PAULINO et al., 2017).

2.1.2 Fungos Marinheiros e metabólitos secundários

O Reino Fungi representa um dos maiores grupos de indivíduos depois dos insetos, pertencentes ao Reino Animalia. Estima-se que existem cerca de 5,1 milhões de espécies de fungos na terra. Todavia, calcula-se que aproximadamente cerca de 10% de todas as espécies foram descritas (AMEND et al., 2019). Os fungos são micro-organismos eucariontes, micro ou macroscópicos, unicelulares ou filamentosos, com o modo de vida saprófita, parasitário ou simbiótico, sendo seres heterotróficos. Com parede celular composta por quitina e β -glucano e que se reproduzem de forma sexuada e/ou assexuada (FORZZA et al., 2010).

De acordo com sua distribuição, os fungos são ubíquos, ou seja, podem ser encontrados em ambientes terrestres e aquáticos, mas é diferenciado quanto à distribuição geográfica e os substratos onde são encontrados. Podem ser observados em sedimentos marinhos (LI et al., 2019a) no solo e associado com invertebrados marinhos (esponjas, corais e ascídios) e em associação com plantas marinhas (GROSSART et al., 2019). No entanto, existe um diferencial entre fungos verdadeiros aquáticos e os fungos que são encontrados no ambiente marinho. Os fungos verdadeiros aquáticos esporulam em ambiente marinho e possuem adaptação morfológica específica, sendo denominados de fungos marinhos obrigatórios. Em contrapartida, os fungos marinhos facultativos crescem em ambiente terrestre ou de água doce e são carregados para o ambiente marinho por lixiviação, adesão a substratos orgânicos, por meio do vento entre outros (SPARROW, 1968). Estabelecendo-se em substratos orgânicos submersos, esporulando-se e crescendo em ambiente marinho.

Os fungos são indispensáveis na manutenção dos ecossistemas, pois são organismos decompositores de matéria orgânica e tem capacidade de degradar vários resíduos. Os fungos são importantes na cadeia alimentar por possuírem a capacidade de sintetizar enzimas na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes (NILSSON et al., 2019). Nos

ecossistemas aquáticos, auxiliam em vários processos ecológicos, como o controle da comunidade microbiana e pelo parasitismo. Em associação com invertebrados marinhos colaboram com sua proteção com a liberação de metabólitos secundários (TAKAHASHI et al. 2017).

Os metabólitos secundários são oriundos do metabolismo dos organismos vivos. O metabolismo é o conjunto de reações químicas relacionadas no crescimento, manutenção e reprodução dos organismos vivos. E os micro-organismos nas suas reações metabólicas produzem compostos metabólicos que podem ser classificados em primários e secundários (CHROUMPI; 2020) Os metabólitos primários são produtos essenciais envolvidos no crescimento e manutenção celular do organismo. As moléculas produzidas são proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (KATZ; BALTZ, 2016). Em compensação, os compostos secundários não fazem parte da essencialidade do desenvolvimento celular dos organismos, mas possuem funções ecológicas e vantagens adaptativas, como o sinergismo, predação e comunicação interespecies (COLLEMARE; SEIDL, 2019). Porém, a formação dos metabólitos secundários deriva a partir de metabolismos primários, através de vias específicas e de acordo com a fase de crescimento (MARTÍN et al., 2019).

A biossíntese dos metabólitos ocorre a partir, principalmente, de derivados de acetilcoenzima A, ácido chiquímico, ácido mevalômico e desoxixilulose fosfato, que dependendo das reações químicas e das condições ambientais podem ser convertidos em inúmeros compostos (GOZARI et al., 2020). Os metabólitos secundários são produzidos por uma grande variedade de micro e macro organismos que podem estar distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos (REIS, 2018). A grande gama de produtos naturais marinhos estudados é originada de alga (terpenos, indóis e esteróis), Ascídias (peptídeos, alcaloides, esteróis e policetídeos), esponjas (glicolipídeos, peptídeos, alcaloides, nucleosídeos, enzimas e esteróis), fungos (terpenos, peptídeos, esteróis, lipídeos, alcaloides e policetídeos) e bactérias (macrolactonas, terpenos, peptídeos cíclicos e lipopeptídeos) (JIN et al., 2016). A maioria dessas substâncias marinhas não apresentam estruturas químicas encontradas em ambientes terrestres, devido aos halogênicos (cloro e bromo)

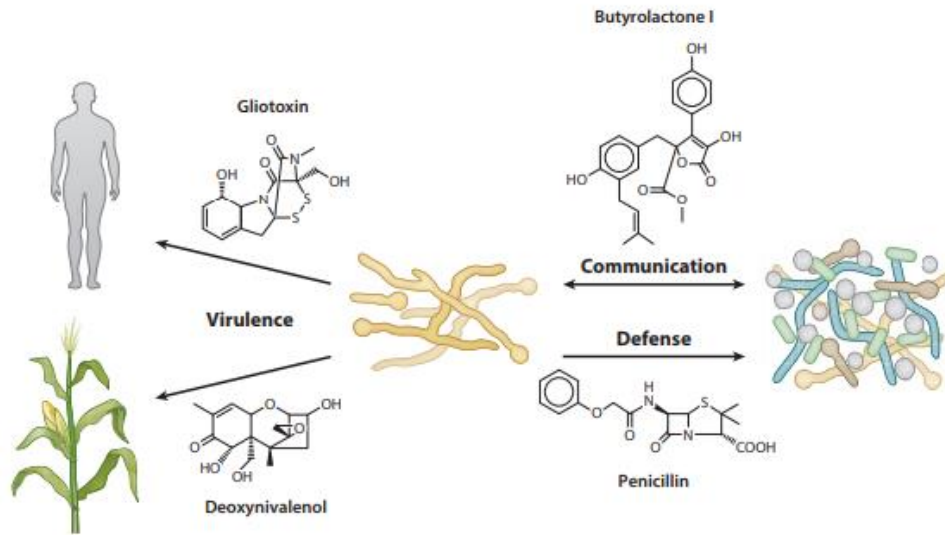
e com isso tornando estruturas peculiares de ambientes marinhos e com potencial biotecnológico (LOUREIRO et al., 2018).

Os fungos passam por inúmeros estresses causados por ações bióticas e abióticas, que variam de privações de nutrientes, pH e temperatura. Como proteção a essas ações, eles produzem inúmeros metabólitos secundários (KÖHLER; CORNELLY; VEHRESCHILD, 2019). Essas substâncias pertencem a grupos heterogêneos e de baixo peso molecular produzido por policetídeos sintase multimodulares (PKSs) e peptídeos sintetase não-ribossômicos (NRPSs) ou por enzimas como preniltransferases e dimetilalil triptofano. Esses compostos produzidos por fungos, principalmente com interações com outros organismos, possuem uma enorme variabilidade estrutural e isso pode explicar o porquê essas substâncias possuem um amplo espectro de atividades e funções (LOUREIRO et al., 2018).

Os metabólitos secundários exercem atividades para combater ataques de patógenos, atuam para mediar comunicação interespecíes, interações simbióticas, aquisição de nutrientes e contra competidores. Utilizam mecanismo como fator de virulência contra patógenos que infectam plantas e animais. A regulação do metabólito secundário pode ocorrer em diferentes níveis regulatórios, que podem ser através de controle epigenético, vias específicas de transdução de sinal (COLLEMARE; SEIDL, 2019).

A produção de metabólitos secundários pelos fungos possui um papel ecológico. Os fungos podem produzir substâncias como virulência determinante para infecções de organismos vivos, como por exemplo, desoxinivalenol e gliotoxina. Porém, podem servir como moléculas de comunicação, como o butirelactenol ou como defesa para outros micro-organismos, por exemplo, a penicilina (ARIAS et al., 2018) (Figura 1). A produção dessas moléculas além de ter um papel ambiental contribui no combate contra infecções microbianas (GURUCEAGA et al., 2019).

Figura 1: Papel ecológico dos metabólitos secundários dos fungos. Interações entre animais, plantas e micro-organismos por comunicação, defesa e virulência.



Fonte: MACHELEIDT et al. (2016).

2.1.3 Infecções fúngicas e os antifúngicos

Nas últimas décadas, houve um aumento geral nas infecções fúngicas à saúde (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). Isso se deve ao aumento e avanços nos tratamentos terapêuticos, consequentemente o uso prolongado de medicamentos de longo espectro ou ao uso de modalidades de tratamentos mais agressivos como o transplante de órgãos sólidos (TOS), transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), agentes imunomoduladores, novos agentes quimioterápicos e dessa forma aumentando a população de pacientes imunocomprometidos, principalmente portadores de AIDS, câncer, transplantados e diabéticos, aumentando o risco de infecções fúngicas invasivas (LOCKHART; GUARNER, 2019).

Os fatores de risco para infecções fúngicas invasivas oportunistas, particularmente candidíase, criptococose e aspergilose, nos hospedeiros imunocomprometidos, incluem neutropenia, disfunção imunológica, disfunção

neutrofílica qualitativa, doenças no trato urogenital, infecções nas mucosas como candidíase orofaríngea e vaginal e doenças nefrológicas (LEBLANC et al., 2020). Isso se deve ao aumento crescente de dispositivos invasivos, como os cateteres centrais intravasculares, permitindo a exposição a patógenos fúngicos circulante de o ambiente hospitalar (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018).

As doenças fúngicas invasivas apresentam um índice elevado de mortalidade, ultrapassando mais de 50% no caso de candidemia e 30% aspergilose invasiva (COTTIER; HALL, 2020). Na América Latina, o agente principal mais comum é *C. albicans* com 37,6% dos casos, seguida por *Candida parapsilosis* com 26,5%, porém, vem ocorrendo o aumento das infecções ocorridas por *Candida não-albicans* (*C. parapsilosis*, *C. auris*, *C. tropicalis* e *C. krusei*), nos últimos anos, atingindo mais que 50% dos casos (CHOWDHARY et al., 2018). Anualmente os fungos patogênicos *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* vêm matando mais pessoas que a malária e a tuberculose, devido ao espectro da doença que irá variar se é sistêmica, invasiva ou superficial. Dependendo também da resposta fisiológica do hospedeiro (REIS, 2018).

2.1.3.1 *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* estão distribuídas em vários ecossistemas, como solo, água, alimentos, plantas, animais e o homem. São capazes de se desenvolver tanto em anaerobiose como em aerobiose, devido a sua capacidade de se adaptar e sua reprodução pode ser assexuada, pelos conídios, como sexuada (ARENDRUP; PATTERSON, 2017). O gênero compreende, aproximadamente, 500 espécies, e é o maior gênero de leveduras de importância médica. As espécies patogênicas que acometem mais comumente os seres humanos são *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermodii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. auris* e *C. haemulonni* (CORSI-VASQUEZ; OSTROSKY-ZEICHNER, 2019).

Leveduras da espécie *C. albicans* podem colonizar várias partes do corpo do hospedeiro como pele, trato gastrointestinal e o trato urogenital. Essa colonização pode ser na microbiota do homem e dos animais, vivendo de forma

comensal (NEVILLE; D'ENFERT; BOUGNOUX, 2015). Porém, como se trata de um fungo oportunista, as alterações no organismo do hospedeiro que causam a diminuição da defesa do organismo afetando o sistema imunológico podem tornar essa relação entre micro-organismo e hospedeiro menos harmoniosa causando doenças locais ou sistêmicas. Pacientes imunodeprimidos tendem a ser mais susceptíveis para que essas leveduras oportunistas comecem a se manifestar infecciosamente (ROMO; KUMAMOTO, 2020). Os isolados de *C. albicans*, quando expostos a antifúngicos exploram várias respostas celulares, como o desenvolvimento de mutações, superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas, modulação da proteína quinase A cAMP (PKA) ou vias Ca^{2+} - calmodulina-calcineurina. Essas respostas mediam a resistência aos triazóis e na maioria das vezes envolvem vias de sinalização do AMP cíclico (cAMP) (HEE-SOO PARK et al., 2018).

A via cAMP-PKA é ativada em *C. albicans* após exposição ao Fluconazol e a outras condições de estressantes para facilitar o processo de recuperação e retornar o crescimento. CDC35, que é responsável por codificar a enzima Adenil ciclase e CAP, uma proteína associada à cAMP, está diretamente envolvida na tolerância ao azol, ou seja, a interrupção de qualquer um dos genes resultará em hiper susceptibilidade a azóis (HUANG et al., 2019). Já a calcineurina é uma fosfatase heterodimérica que em resposta aos estresses causados na membrana fúngica é liberado para atuar em fatores de virulência para auxiliar na sobrevivência, principalmente na ação das drogas antifúngicas (JUVVADI et al., 2017).

Candida glabrata é uma espécie de levedura haploide pertencente ao grupo *Nakaseomyces* (GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2020). É descrita como um fungo monomórfico imperfeito, crescendo como bastoconídios produzindo pequenas colônias. São significativamente menores que *C. albicans*. Pode ser classificada como a terceira espécies de levedura mais frequentemente isolada entre os casos de candidemia (GABALDÓN; NARANJO-ORTÍZ; MARCET-HOUBEN, 2016). Porém, ainda não está clara a forma que *C. glabrata* acomete o hospedeiro, mas a infecção pode ocorrer de forma endógena, já que é uma espécie colonizadora da pele e das mucosas e

de forma exógena através de contaminação de cateteres intravenosos e local de infusões parentais (GABALDÓN; FAIRHEAD, 2019). Contudo, são grandes formadores de biofilmes, mas também são altamente resistentes aos medicamentos azólicos entre os isolados clínicos, as equinocandinas de forma isolada ou em combinação com outros azóis (TIMMERMANS et al., 2018). Isso ocorre devido às cepas possuírem uma taxa elevada de expressão da bomba de efluxo, causado pela mutação de ganho de função em PDR1 que codifica um fator de transcrição que aciona várias bombas de efluxo (KSIEZOPOLSKA; GABALDÓN, 2018).

Candida auris é um membro recém-emergido no clado *Candida/Clavispora* (RUIZ-GAITÁN et al., 2019). Podem ser isoladas de vários locais de infecções pelo corpo humano, e geralmente são adquiridos em hospitais. São isoladas da urina, bile, sangue, narinas, axilas, feridas, pele e reto do indivíduo (JEFFERY-SMITH et al., 2018). Diferente de *C. albicans* que coloniza no trato gastrointestinal e genitourinário dos indivíduos, *C. auris* coloniza predominantemente a pele, e podem infectar o sistema respiratório e o sistema nervoso central, sendo incapazes de colonizar ambientes anaeróbicos como o intestino (LAMOTH; KONTOYIANNIS, 2018). *C. auris* é uma levedura que possui também resistência intrínseca a três principais classes de fármacos antifúngicos (azóis, polienos e equinocandinas). Porém, os isolados resistentes a equinocandinas são relativamente raros (ARENDRUP, 2017).

O complexo de espécies *Candida haemulonni* (*C. haemulonni*, *C. haemulonni* var. *vulnera* e *C. duobushaemulonni*) são leveduras emergentes oportunistas e multirresistentes (ARENDRUP, 2017), associadas a diferentes manifestações clínicas em indivíduos imunossuprimidos. *C. haemulonni* é erroneamente identificada, frequentemente confundida com *C. auris* quando são identificadas por métodos clássicos, devido à semelhança fenotípica. Possuem alta resistência ao fluconazol, itraconazol e voriconazol. O único antifúngico para combater a infecção causada pelo complexo de espécies *C. haemulonni* foi a caspofungina (RAMOS et al., 2015). A resistência no complexo de espécies *C. haemulonni* está fortemente ligada a seus perfis metabólicos e oxidativos (SILVA et al., 2018).

2.1.3.2 *Cryptococcus* spp.

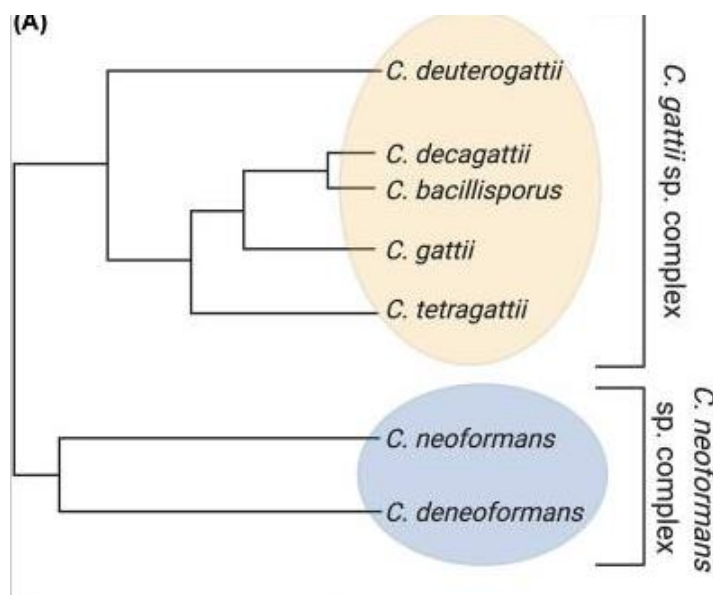
Cryptococcus spp. são leveduras amplamente encontradas no meio ambiente, são fungos de solo contaminados por excrementos de pássaros, madeira em decomposição e ocós de árvores. Prevaecem em regiões do mundo todo (MADA; JAMIL; ALAM, 2020). É um fungo invasivo causador da criptococose, uma doença sistêmica causada pela inalação de basidiósporos desidratados das espécies. É uma infecção fúngica oportunista e acometendo pulmões e sistema nervoso central (DIAZ, 2020).

Os dois principais grupos patogênicos de *Cryptococcus* são o complexo de espécie de *C. neoformans* e o complexo de espécie *C. gatti*. *C. gatti* está associado à infecção primária em indivíduos imunocompetentes e geralmente é isolado em espécies de árvores nativas ou exóticas em estado de biodegradação. Em contrapartida, a infecção causada por *C. neoformans* ocorre em indivíduos imunocomprometidos, como infecções por HIV associado à depleção de célula T ou imunossupressão após transplante de órgão sólido. E geralmente são isolados do solo e de fezes de aves (WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

Estudos anteriores demonstram que o gênero *Cryptococcus* não possuía uma única espécie e foi relatado que havia diferença específica da cepa para anticorpos reativos. Baseando-se na diferença dos polissacarídeos capsulares, as leveduras se classificavam em um dos quatro sorotipos distintos: A, B, C e D. (ALTAMIRANO; JACKSON; NIELSEN, 2020). Trabalhos posteriores relataram que os sorotipos A e D pertenciam à mesma espécie e os sorotipos B e C a outra espécie, sugerindo que *Cryptococcus* continham duas espécies distintas, sendo diferenciadas na ecologia, epidemiologia, bioquímica e estruturas genômicas (HAGEN et al., 2015). Os sorotipos A e D foram denominados como *C. neoformans var neoformans* e os sorotipos B e C foram denominados de *C. neoformans gatti*. Após muitos estudos variados no gene URA5 foram feitas novas nomenclaturas para os sorotipos A e D, renomeando para *C. neoformans var grubbi* (sorotipo A) e o sorotipo D permaneceu *C. neoformans var neoformans*, e os sorotipos B e C renomeados para *C. gatti* (CUOMO; RHODES; DESJARDINS, 2018).

Um estudo molecular adicional das populações de *C. gattii* revelou uma subdivisão em cinco espécies, devido a subestruturas dentro da população e dividindo em: *C. tetragattii*, *C. deuterogattii*, *C. decagattii*, *C. bacillisporus* e *C. gattii* (FERNANDES et al., 2016). Após essa subdivisão, os cientistas renomearam para complexo de espécies *C. gattii*. Conseqüentemente, *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A) foi renomeado como *C. neoformans* e *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D) foi renomeado como *C. deneoformans*, assim, formando o complexo de espécies de *C. neoformans*. (KWON-CHUNG et al., 2017) (Figura 2).

Figura 2: Complexos de espécies de *Cryptococcus*.



Fonte: ALTAMIRANO; JACKSON; NIELSEN (2020)

O tratamento para combater infecções criptocócicas ocorre em três estágios: indução, consolidação e manutenção (FERNANDES et al., 2016). É utilizada anfotericina B mais flucitosina para a terapia de indução, enquanto que o fluconazol é o agente que atua na fase de consolidação e manutenção e de forma alternativa é utilizado como indução (KÖHLER; CORNELLY; VEHRESCHILD, 2019). No entanto, os testes de sensibilidade antifúngica padrão vêm demonstrando uma baixa suscetibilidade entre anfotericina B e fluconazol para os isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii*. Os fatores que influenciam a suscetibilidade incluem a melanização, a cápsula de polissacarídeo e as células titãs (ZARAGOZA, 2019).

A melanização, que é um fator de virulência dessas espécies, confere a resistência a fatores de estresses, como o calor, radicais livres, radiação ionizante e etc. Além disso, a melanização da parede celular pode diminuir o tamanho dos poros devido a uma redução em sua permeabilidade (ZARAGOZA, 2019). Conseqüentemente, a melanização também pode bloquear a entrada de macromoléculas, como a anfotericina B. A melanina também possui propriedades antioxidantes diminuindo o estresse oxidativo, que demonstrou contribuir para a toxicidade da anfotericina B (GROSSMAN; CASADEVALL, 2017).

Outro mecanismo que auxilia na resistência contra os antifúngicos é o tamanho da cápsula polissacarídica, um fator importante de virulência com efeitos infecciosos no sistema imunológico humano (WANG; LI; DOERING, 2018). O aumento da densidade da cápsula também acaba impedindo a entrada de moléculas, como antimicrobianos, contribuindo, assim, para a evasão imunológica. Quanto maior for a cápsula, maior será a proteção para *Cryptococcus* contra anfotericina B e fluconazol (NASCIMENTO et al., 2017). A cápsula de polissacarídeo pode agir como um antioxidante e sofrer alterações em suas estruturas epítopa. Portanto, é provável que uma maior produção de polissacarídeo capsular proteja contra ROS induzidos pelos antifúngicos (CASADEVALL et al., 2019).

As células titãs são células poliploides de *C. neoformans* de formato anormal e grande, devido ao seu tamanho se tornam menos suscetíveis à alta concentração de fluconazol do que as células típicas (ABRAMO et al., 2012). Além da diferença do seu tamanho, que pode chegar a 100 µm de diâmetro já que as células criptocócicas típicas têm em torno entre 5 a 7µm (GERSTEIN et al., 2015). As células titãs possuem morfologias bastante diferentes. Essas diferenças incluem uma cápsula mais densa e reticulada e uma parede celular mais espessa e uma produção de melanização maior. Além disso, as células titãs contêm de quatro a oito cópias de seu genoma dentro de um núcleo (CAZA; KRONSTAD, 2019). O estudo feito por (SIONOV et al., 2010) relatou que o cromossomo 1 das células titãs, contém ERG11, alvo do fluconazol e AFR1, uma bomba de efluxo cuja superexpressão está associada à resistência

ao azol. Acredita-se que ambos contribuam para diminuição da suscetibilidade das células com múltiplas cópias do cromossomo 1.

2.1.4 Drogas antifúngicas: mecanismos de ação e resistência

Os agentes antifúngicos disponíveis são bastante limitados, comparado com os antibacterianos. A busca por novos alvos celulares, dentro da era genômica, vem aumentando de forma exponencial (LIU et al., 2017a). O surgimento da resistência antifúngica está relacionado com pacientes que estão utilizando medicamentos por tempo prolongado ou em tratamento específico antifúngico (COSTA-DE-OLIVEIRA, 2020). Há três tipos de resistência antifúngica que já foram descritas: intrínseca ou primária, que ocorre sem ter tido exposição aos antifúngicos; existe o secundário ou adquirido, que se desenvolve após a exposição ao antifúngico; e a resistência clínica, que ocorre quando o fungo é susceptível ao antifúngico *in vitro*, mas não *in vivo*, por causa da incapacidade do antifúngico agir no alvo (DAYANAND, 2018). Os principais antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas, seus principais mecanismos de ação, e como sua resistência, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Espectro de atividades e mecanismos de ação e resistência dos principais antifúngicos.

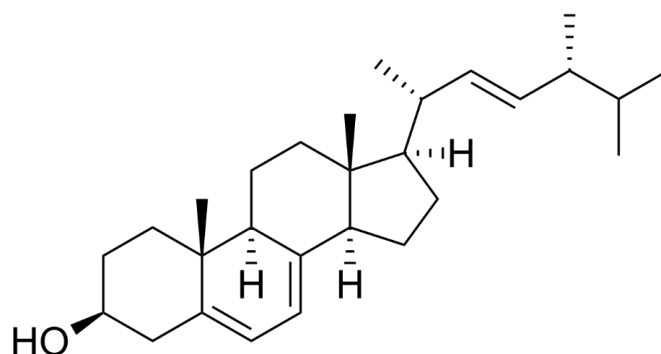
Classe antifúngica	Droga antifúngica	Espectro de atividade	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Polienos	Anfotericina B	Fungicida	Ligam-se ao Ergosterol	Mutação no gene ERG3
Análogos de Pirimidina	5- Flucitosina	Fungicida	Inibição da função e divisão celular	Mutação na enzima Uracil fosforibosiltransferase
Azóis	Fluconazol Voriconazol Posaconazol	Fungistático	Inibição do citocromo 450 14 α -lanosterol desmetilase	Superexpressão das bombas de efluxo da membrana celular
Equinocandinas	Caspofungina Anidulafungina Micafungina	Fungicida	Inibição da enzima β -(1,3) glucano sintase	Mutações pontuais nos genes FKS1 e FKS2

Fonte: Adaptado de COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES (2020).

2.1.4.1 Polienos

Os polienos são moléculas anfipáticas heterocíclica. O alvo principal é o ergosterol (Figura 3), que é o principal esteroide que regula a fluidez da membrana, a função e a biogênese da membrana plasmática, ligando-se nas bicamadas lipídicas e desenvolvendo poros que irá romper a integridade da membrana plasmática, com isso permitirá que moléculas pequenas ultrapassem a membrana ocasionando a lise celular (KRISTANC et al., 2019).

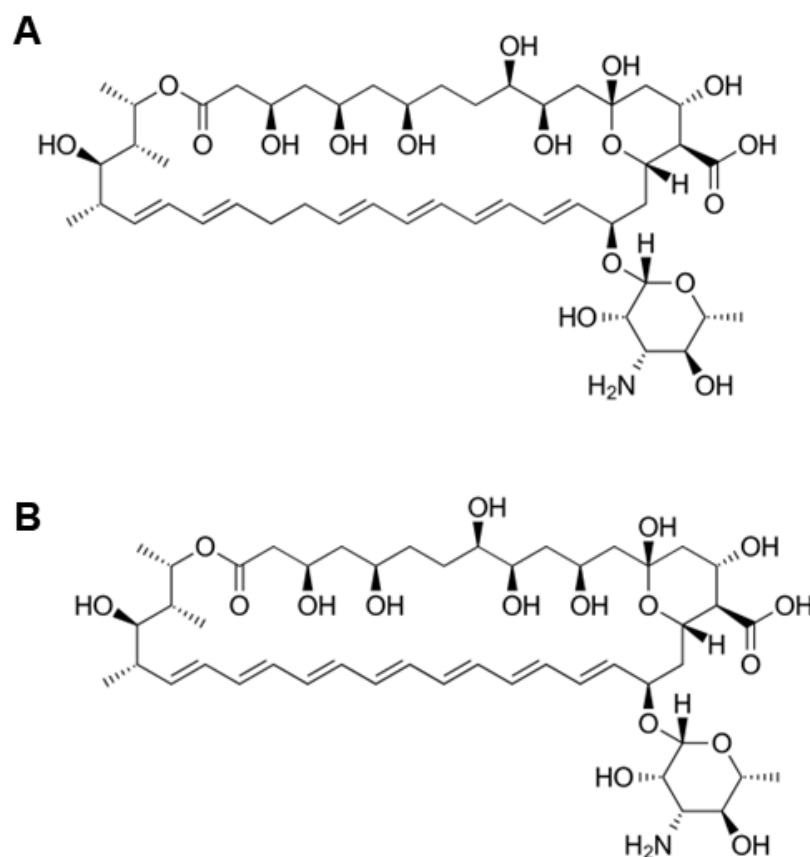
Figura 3: Estrutura molecular do ergosterol



Fonte: Estrutura molecular adaptado da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

Os antifúngicos pertencentes a esse grupo são a anfotericina B e a nistatina (Figura 4). A nistatina é de uso tópico e é utilizado na administração de infecções fúngicas como a candidíase oral e sistêmica em recém-nascido, lactantes e pacientes imunocomprometidos. Possui atividade contra várias espécies de leveduras e fungos filamentosos. Porém, contém um espectro mais estreito que a anfotericina B (LYU et al., 2016). A anfotericina B é o principal medicamento utilizado para as infecções fúngicas, principalmente nas infecções invasivas graves. Contudo, a anfotericina B é tóxica e pode causar nefrotoxicidade. Para diminuir essa toxicidade foram formuladas várias versões, como a desoxicolato de anfotericina B (TAKEMOTO; KANAZAWA, 2017).

Figura 4: Estrutura molecular da nistatina (A) e anfotericina B (B).



Fonte: Estrutura molecular adaptado da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016)

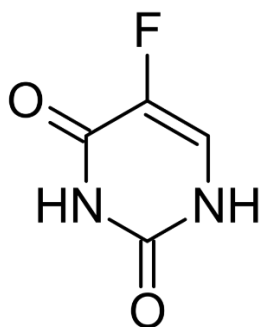
A resistência à anfotericina B ocorre devido a uma mutação no gene *ERG3*, codificador da C-5 esterol desaturase, enzima responsável na biossíntese do ergosterol. A resistência também pode estar relacionada ao aumento da atividade da catalase, diminuindo a susceptibilidade ao dano oxidativo (ARONSON, 2012).

2.1.4.2 Análogos de Pirimidina

O antifúngico 5-flucitosina é o único que representa a classe da Pirimidina. 5-flucitosina converterá em 5-fluorouracil (Figura 5) por uma citosina desaminase, que causará a incorporação dessa citosina ao DNA e RNA, assim, inibindo a função da divisão celular (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Esse antifúngico é utilizado em combinação com a anfotericina B por causa do alto índice de resistência. Em espécies do gênero *Candida*, a enzima

uracil fosforiltransferase é inibida tornando incapaz de converter 5-fluorouracil em 5-fluorouridina monofosfato, causando a resistência contra a esse fármaco (KAUSHIK; KEST, 2018).

Figura 5: Estrutura molecular da 5-fluorouracil.

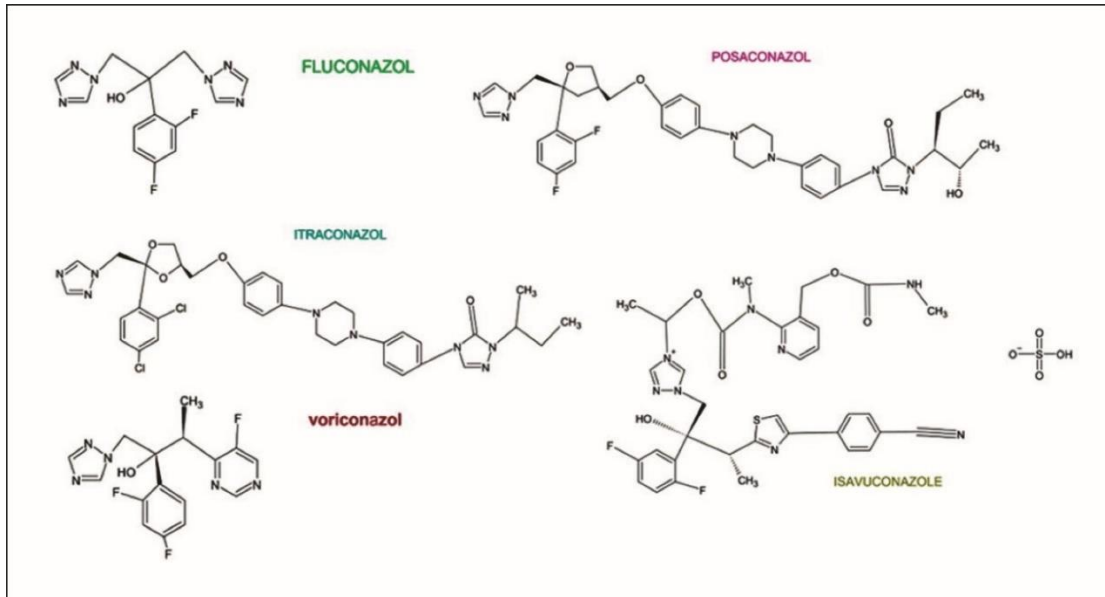


Fonte: Estrutura molecular adaptado da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

2.1.4.3 Triazóis

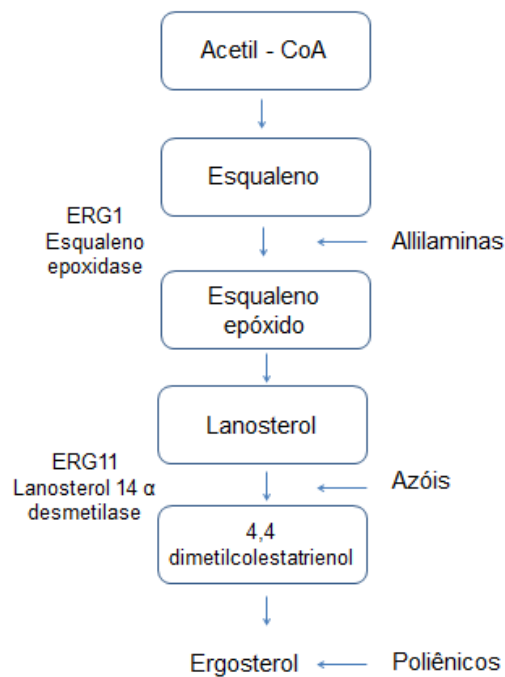
Os triazóis formam a maior classe de antifúngicos, que incluem: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isoconazol (Figura 6) (KRÓL; NAWROT; BARTOSZEWICZ, 2018). São compostos sintéticos heterocíclicos que inibem a desmetilase do citocromo P450 14 α -lanosterol fúngico, codificada pelo gene ERG11 (CYP51) que catalisa a última etapa da biossíntese do ergosterol (Figura 7). Quando ocorre a inibição da enzima, ocorrerá também a diminuição do ergosterol na membrana, consequentemente diminuindo a função da membrana da célula (Figura 8). Os antifúngicos dessa classe se ligam em um grupo de nitrogênio no anel azólico inibindo a desmetilação de C-14 do lanosterol, ocorrendo à substituição dos esteróis metilados na membrana fúngica inibindo seu crescimento ou levando a lise celular (PALARETI et al., 2016).

Figura 6: Estrutura química do fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol.



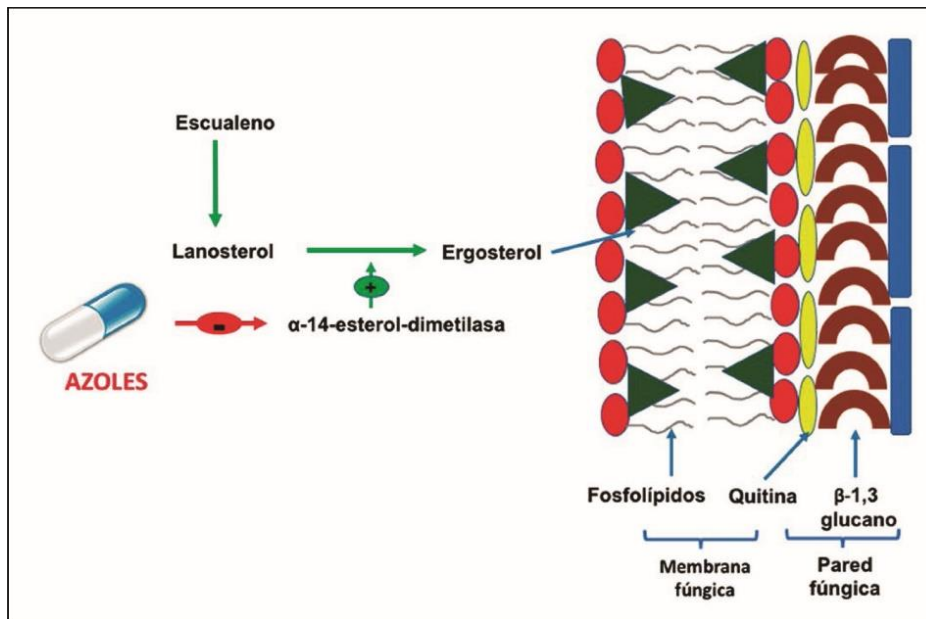
Fonte: NOCUA-BÁEZ et al. (2020).

Figura 7: Biossíntese do Ergosterol e os principais alvos dos antifúngicos allilaminas, azóis e poliênicos.



Fonte: Adaptado de (RAMPONI, 2013).

Figura 8: Mecanismo de ação dos azólicos, tendo como alvo a enzima α -14-esterol-dimetilase responsável pela fase final da biossíntese do ergosterol.



Fonte: NOCUA-BÁEZ et al. (2020).

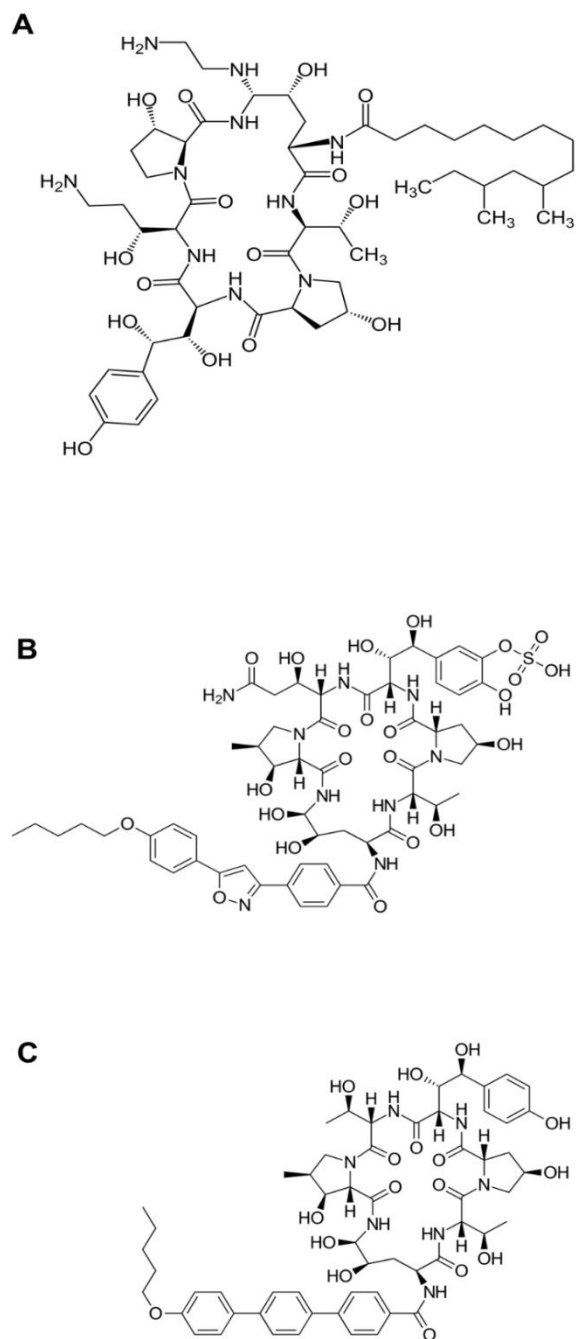
O principal mecanismo de ação dos micro-organismos aos azóis é a superexpressão das bombas de efluxo da membrana celular. As bombas responsáveis pela redução do acúmulo de azóis dentro da célula são as bombas ABC e os transportadores principais facilitadores (PRASAD et al., 2015). Outro mecanismo atuante é a alteração da enzima alvo ERG11, substituindo aminoácidos, que evitará a ligação do fármaco ao alvo, causando à resistência ao Fluconazol (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

2.1.4.4 Equinocandinas

As equinocandinas possuem três agentes fungicidas: caspofungina, micofungina e anidulafungina (Figura 9). Essas substâncias causam a inibição da β – (1,3) glucano sintase, um complexo enzimático que fica localizado na membrana plasmática das células fúngicas (AZANZA PEREA, 2016). A enzima β – (1,3) glucano sintase é essencial para os fungos e é composta de duas subunidades: FKS1, uma subunidade catalítica, e RHO, uma proteína de ligação ao GTP, que é um regulador da atividade da glucano sintase. As equinocandinas substituem o fluconazol em tratamentos mais evasivos

principalmente em ambientes da unidade de terapia intensiva (UTI) (PFALLER et al., 2019).

Figura 9: Estrutura química da caspofungina (A), micafungina (B) e anidulafungina (C).



Fonte: Estrutura molecular adaptado da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

Os genes FK1 e FK2 estão relacionados à resistência às equinocandinas. Quando ocorre a mutação, pode ocorrer uma diminuição da sensibilidade da enzima à droga. Os aminoácidos presentes em SER645 apresentam alterações fenotípicas resistentes mais pronunciadas (KRITIKOS et al., 2018). Um estudo realizado na Suíça mostrou a resistência de *C. albicans* e *C. glabrata* às equinocandinas permanece em nível baixo, apesar de um aumento significativo no uso desse agente, e essa resistência ocorreu após associação à exposição individual à pré - equinocandinas de duração prolongada (PAPPAS et al., 2015).

2.1.5 Potencial biológico e farmacológico de produtos naturais marinhos

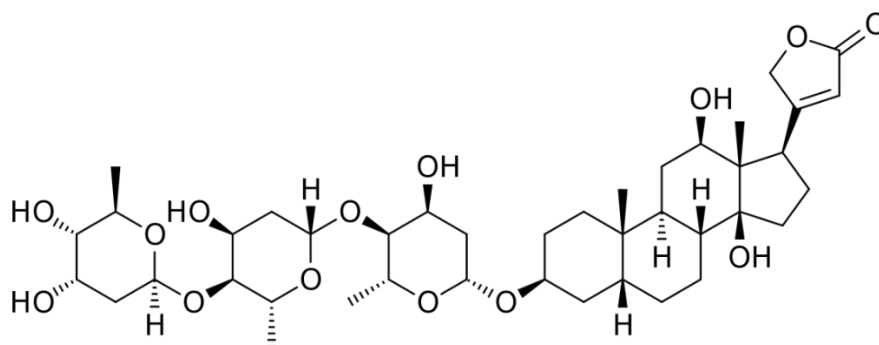
A natureza dispõe de recursos que os humanos utilizam para combater um largo espectro de doenças. Extratos de animais, plantas, micro-organismos e minerais eram os principais produtos para o tratamento de doenças, sendo as plantas o principal para o desenvolvimento de produtos utilizados na medicina tradicional antes do século XX (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Os produtos de origem natural possui uma variabilidade química estrutural e funcional devida o metabolismo necessário para a adaptação destes produtos a diversas situações de estresse ambiental, como agente físico-químico e biológico (ROBBINS et al., 2019). Os organismos vivos para conseguirem sobreviver e se adaptar às condições ambientais ativam mecanismos bioquímicos e genéticos para produção e liberação de metabólitos secundários. Por causa dessa necessidade de sobrevivência, conseqüentemente, essa produção se torna uma fonte renovável de metabólitos especializados (POLLOCK et al., 2018).

Os primeiros registros documentados sobre as propriedades terapêuticas dos produtos naturais ocorreram aproximadamente 2600 a.C., na Mesopotâmia. Foram relatados o uso de, em torno, 1000 substâncias extraídas de plantas, como óleos essenciais das espécies *Commiphora* sp. (mirra), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Cupressus sempervirens* (cipreste), que são utilizados na atualidade para diversas patologias (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). No antigo Egito, em 2900 a.C., foram registrados mais de 700 medicamentos, principalmente de origem vegetal. Na medicina chinesa, vem sendo registrado desde 1100 a.C. tratamentos a base de fitoterápicos, sendo

registrado por Shennong Herbal (100 a.C.) 365 medicamentos e por Tang Herbal (659 d.C.) com 850 fitoterápicos (JÜTTE et al., 2017).

No século XX, com o avanço das pesquisas sobre o uso dos fármacos, foram descobrindo qual o efeito que o medicamento ocasionava no corpo e como ocorreria a interação da molécula do fármaco com a macromolécula biológica, como as proteínas. A partir disso, concluiu-se que compostos químicos isolados, em vez de extratos puros e semi-puros de organismos e minerais, eram responsáveis pela atividade dos fármacos. Desde então, muitas moléculas bioativas foram descobertas e identificados na sua forma estrutural química, como por exemplo, a Digoxina (Figura 10) oriunda de flor *Digitalis lanata* (KATZ; BALTZ, 2016).

Figura 10: Estrutura molecular da digoxina.

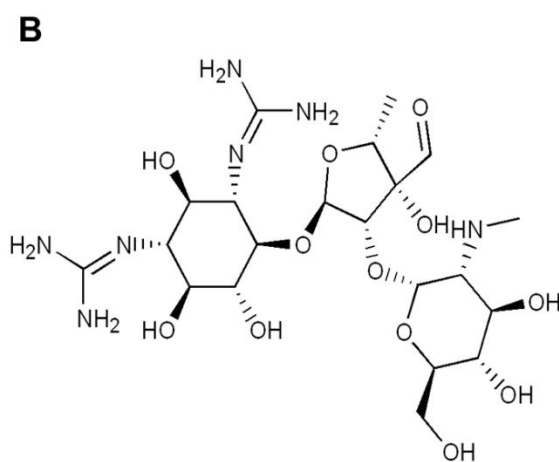
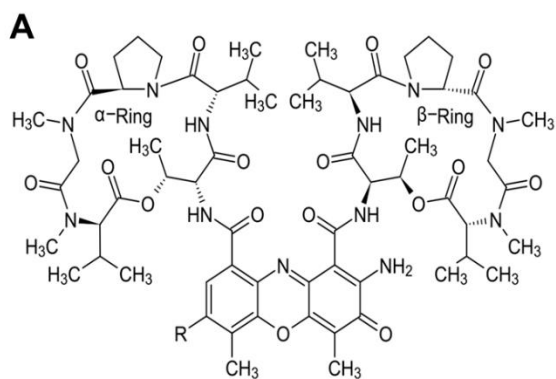


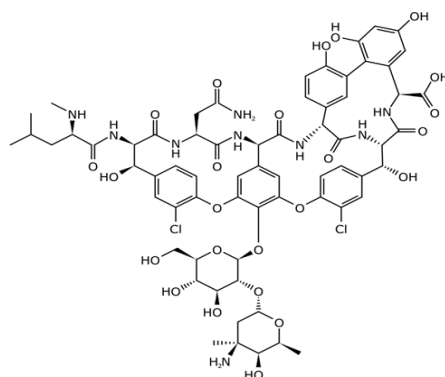
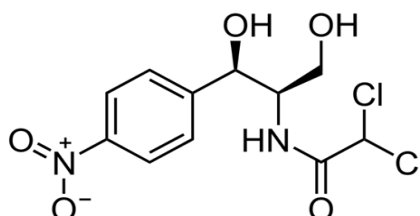
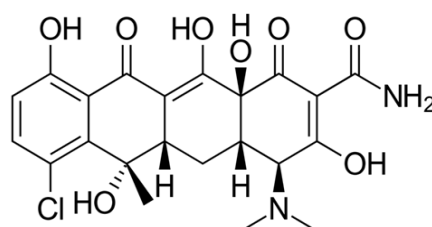
Fonte: Estrutura molecular adaptada da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

Em 1928, Fleming revolucionou a área da farmacologia e da medicina com a descoberta da penicilina, um antibiótico produzido pelo fungo filamentoso *Penicillium notatum* (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Esse acontecimento trouxe pesquisas intensivas para a busca de novos compostos ativos. Na década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, com o uso intensivo da penicilina, indústrias farmacêuticas investiram em pesquisas para obter extratos de micro-organismos, como fungos e bactérias, para atuarem contra bactérias patogênicas, assim, resultando na descoberta de compostos como a actinomicina, estreptomicina, vancomicina, cloranfenicol e clortetraciclina (Figura 11), (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). Com isso, nas três

décadas conseqüentes a indústria farmacêutica intensificou pesquisas de produtos naturais a partir de fontes microbianas.

Figura 11: Estrutura molecular da actinomicina (A), estreptomicina (B), vancomicina (C), cloranfenicol (D) e clortetraciclina (E).



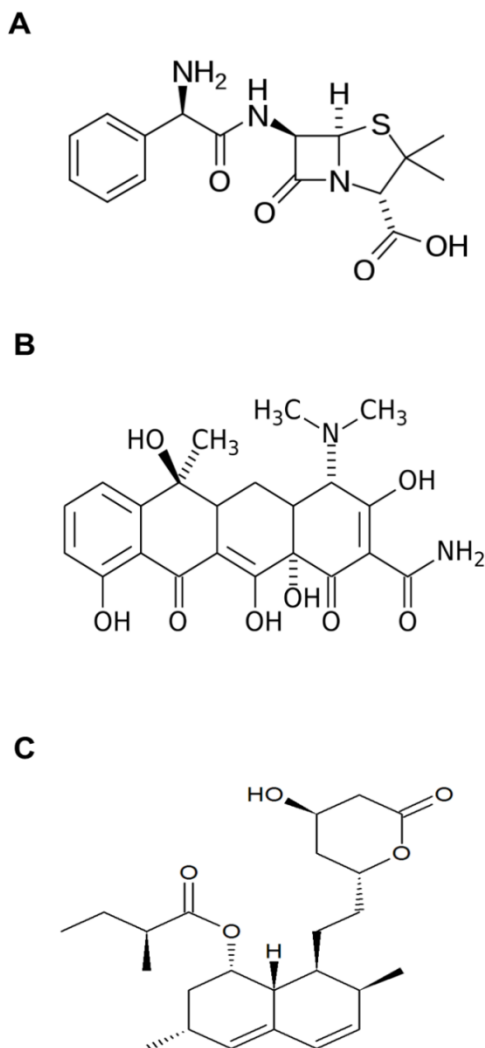
C**D****E**

Fonte: Estrutura molecular adaptada da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

Na década de 40, precisamente entre os anos 1942-1944, aumentou o número de estudos para descobrir novos antibióticos e compostos com outras atividades a partir de micro-organismos e de outras fontes de produtos naturais (KATZ; BALTZ, 2016). Com os esforços, surgiram produtos como agentes antibacterianos (como a penicilina da espécie *Penicillium*; cefalosporina da espécie *Cephalosporium acremonium*; aminoglicosídeos como estreptomicina e tetraciclina), agentes hipocolesterolêmicos (como mevastatina de *Penicillium*)

e lovastatina (*Aspergillus*), agentes antiparasitários como os ivermectinos (*Streptomyces*) (Figura 12) (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 12: Estrutura molecular da penicilina (A), tetraciclina (B) e lovastatina (C).

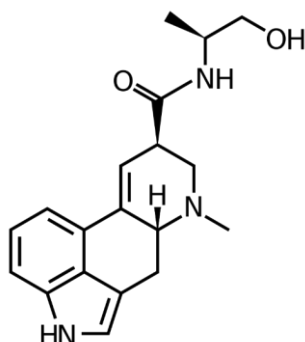


Fonte: Estrutura molecular adaptada da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

Na década de 70, estudos relacionados às bactérias hipersensíveis aos β -lactâmicos detectados nos testes de inibição de β -lactamase e do teste de especificidade de metabólitos mostraram novas resistências aos antimicrobianos (BUSH; BRADFORD, 2016). Com isso, novas pesquisas foram realizadas e todas resultaram na descoberta de novas classes estruturais de

antibióticos como os carbapenêmicos, monobactâmicos e as nocardinas. Outros fármacos descobertos a partir de micro-organismos foram a anfotericina B, sintetizado a partir de *Streptomyces nodosus*, a ergometrina (Figura 13), oriunda da *Claviceps purpurea* e a nistatina produzida por *Streptomyces noursei* (KATZ; BALTZ, 2016).

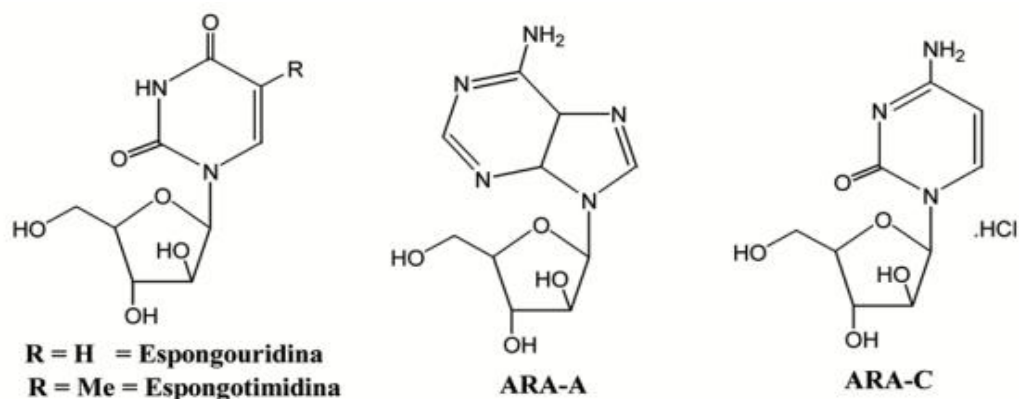
Figura 13: Estrutura molecular da ergometrina.



Fonte: Estrutura molecular adaptada da base de dados Pubchem (KIM et al., 2016).

As indústrias farmacêuticas vêm buscando alternativas de substâncias ativas como micro-organismos presentes em ecossistemas extremos, como regiões polares e oceanos, por acreditar no ineditismo de compostos encontrados nessas condições ambientais (CHOUDHARY et al., 2017). Com isso, as buscas por moléculas ativas de fontes como organismos marinhos surgiram na década de 50 com o isolamento dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina, da esponja caraíbas *Cryptotethya crypta*, isolados por Bergmann e Feeney, aprovado pela *Food Drug Administration* (FDA) e que levou ao desenvolvimento dos agentes antivirais e anticâncer, ARA-A (Vidarabina) e ARA-C (Citarabina) (Figura 14), utilizados até o presente momento (SOUZA et al., 2007).

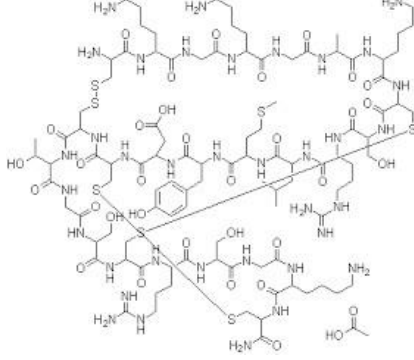
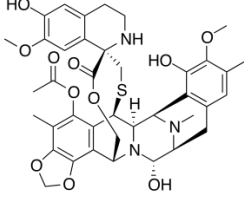
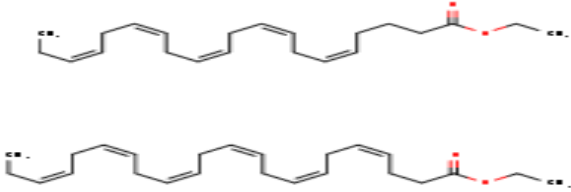
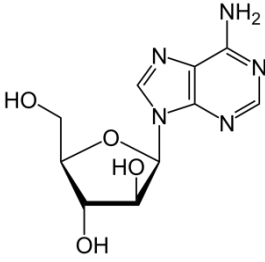
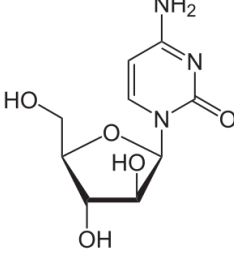
Figura 14: ARA-A e ARA-C, medicamentos utilizados até hoje, inspirados nos modelos naturais espongouridina e espongotimidina, isolados da esponja caraíbas *Cryptotethya crypta*.

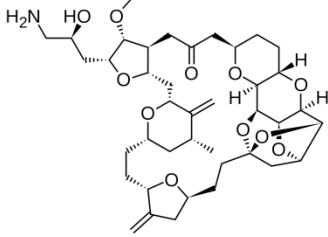
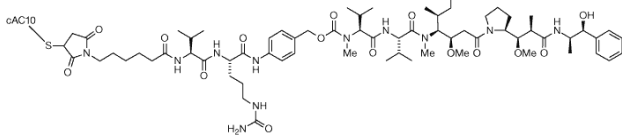


Fonte: SOUZA et al. (2007).

A FDA só voltou a aprovar novos fármacos em 2004, depois da “crise” dos anos 90 (diminuição da busca de produtos naturais). O analgésico ziconotida (Prialt®) é um peptídeo isolado do molusco *Conus magnus* na década de 80 e utilizado para dores crônicas. Em 2007, a FDA aprovou o uso da trabectedina (Yondelis®), um alcaloide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata*, e utilizado no tratamento de sarcomas e doenças ovarianas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Atualmente, existem sete agentes terapêuticos no mercado que possuem suas moléculas ativas de origem marinha (Tabela 2): além dos dois citados acima, o antiviral vidarabina (ARA-A®), os antitumorais citarabina (ARA-C®), mesilato de eribulina (HALAVEN®), brentuximabe vedotina, e regulador da hipertrigliceridemia ésteres de ômega-3 (Lovarza®) (BLUNT et al., 2012).

Tabela 2: Produtos naturais marinhos aprovados como fármacos. Nome do princípio ativo, estrutura molecular e atividade biológica.

Princípio ativo	Estrutura molecular	Atividade biológica
Ziconotida		Analgésica
Trabectedina		Antitumoral
Ésteres de ômega-3		Regulador da hipertrigliceridemia
Vidarabina		Antiviral
Citarabina		Antitumoral

Eribulina		Antitumoral
Brentuximabe		Antitumoral

Fonte: Adaptado de (BLUNT et al., 2012).

Trabalhar com organismos marinhos, como esponjas e corais, apresenta limitações como o crescimento lento do animal, disponibilidade de alimentos para produção de metabólitos, dependência da estação do ano, produção dos metabólitos em quantidades pequenas e alto custo de cultivo (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Deste modo, pesquisas voltadas para a associação entre organismos marinhos e micro-organismos tem sido o foco, principalmente por esses organismos (bactéria, fungos e microalgas) estarem presentes nas estruturas teciduais dos invertebrados marinhos (COTTIER; HALL, 2020).

No Brasil, os estudos com os organismos marinhos iniciaram-se na década de 60 (BERLINCK et al., 2017). A primeira substância extraída foi o colesterol de um invertebrado marinho. Por muito tempo, os estudos e pesquisas eram direcionados para substâncias químicas de esponjas e ascídias, visto que o Brasil possui uma área costeira marítima de 8000 km e tão pouco explorada, o pesquisador Berlinck e colaboradores (2004) incentivaram a busca de produtos naturais no ambiente marinho do Brasil.

Apenas na década de 90 foram iniciados os estudos com regulação genética e os processos enzimáticos envolvidos na biossíntese dos metabólitos secundários. Os estudos envolveram o isolamento e a elucidação estrutural de novas moléculas com atividades biológicas, desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, análises recentes sobre as pesquisas dessas moléculas bioativas, vêm demonstrando que grupos de pesquisas no Brasil vêm

augmentando os esforços na busca por produtos naturais produzidos por micro-organismos (BERLINCK et al., 2017).

Dentre a maior biodiversidade existente no ambiente marinho na produção de produtos naturais, destacam-se os fungos, não apenas pelos metabólitos secundários complexos, mas, principalmente, pela possibilidade de processos fermentativos em grande escala, para obtenção de moléculas ativas suficientes para os estudos clínicos e pré-clínicos para formação de novos fármacos. Portanto, promover a pesquisa interdisciplinar e a busca por moléculas inéditas tem sido o maior incentivo dos pesquisadores do Brasil.

2.1.6 Organismos marinhos, micro-organismos associados e a produção de metabólitos secundários

A diversidade de organismos que necessitam compartilhar o mesmo habitat permitiu que ao longo do processo evolutivo ocorresse um equilíbrio entre eles. Esse equilíbrio é demonstrado por meio da associação entre micro-organismos e animais (principalmente invertebrados marinhos como as esponjas e corais). Esponjas, por exemplo, possuem aproximadamente 60% de sua biomassa constituída por micro-organismo (bactérias, fungos, microalgas, vírus, etc) (SWEET; BULLING, 2017).

Compartilhar o mesmo ambiente fez com que esses organismos desenvolvessem meios de sobreviverem para ocupar seu espaço e conseguir seu alimento (GROTTOLI et al., 2018). Assim, foi adquirida por esses organismos rotas químicas capazes de produzir substâncias bioativas que auxiliam na competição por espaço, adaptação ao meio, proteção contra predadores, radiação UV, ou seja, a produção de substâncias naturais ativas são respostas evolutivas para a sobrevivência. Essas substâncias são denominadas de metabólitos secundários como os alcaloides, terpenóides, policetídeos, peptídeos, esteroides e etc. (WANG et al., 2016a).

Com a associação entre os micro-organismos (fungos e bactérias) e os invertebrados marinhos (esponjas e corais), acredita-se que a produção dos metabólitos secundários seja proveniente dos micro-organismos que vivem em simbiose com esses animais. Assim, essas biomoléculas podem apresentar

atividades biológicas importantes, destacando principalmente atividade antifúngica (BONN et al., 2017).

As esponjas são metazoários filtradores e sedentários, são animais bentônicos sésseis, possuem um sistema composto por conócitos que promovem o bombeamento da água por um sistema de canais essenciais para sua fisiologia, essas células capturam moléculas orgânicas presente na água, auxiliam na troca de materiais como a excreção, nutrição, respiração e reprodução, entre as esponjas e o meio (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Por causa desse mecanismo, não só as esponjas como também os corais, tornam um habitat ideal para micro-organismos simbiotes, principalmente fungos, bactérias e microalgas (SILVEIRA et al., 2017).

Os corais são cnidários marinhos que formam associação com micro-organismos, que podem habitar no esqueleto, gastroderme, epiderme e camada externa de muco do animal, essas relações interespecies formam um metaorganismo (POLLOCK et al., 2018). Essa comunidade microbiana (fungos, algas, bactérias, arqueias, vírus e microeucariontes) irão fornecer substâncias essenciais para a saúde dos corais (PERNICE et al., 2020). Essa associação desempenha papéis importantes, como anteriormente citado, através da ciclagem de nutrientes e proteção contra patógenos potenciais, auxiliando o hospedeiro a aumentar a capacidade de resistir ao estresse ambiental (PEIXOTO et al., 2017).

Micro-organismos podem beneficiar organismos marinhos evitando doenças específicas e inibindo o desenvolvimento de patógenos. Além de beneficiar o hospedeiro, a produção de metabólitos secundários faz com que possam ter aplicações biotecnológicas (ROSADO et al., 2019).

As substâncias bioativas produzidas por fungos geralmente vêm de duas vias metabólicas, a PKS, que produz policetídeo tipo I e II, e o NRPS. Há grupos de genes que biossintetizam compostos bioativos, como, os peptídeos sintetase ribossomicamente modificado pós-tradução (RIPPs). (LOUREIRO et al., 2018). Nos invertebrados (coral e esponja), essas vias biossintéticas dos micro-organismos são ativadas por interação complexas, como competição por espaço, ou resposta fisiológica do hospedeiro aos estresses ambientais. Essas

vias são predominantes em micro-organismos associados a invertebrados marinhos (LOUREIRO et al., 2018).

Dependendo das condições ambientais, os metaorganismos podem responder ativamente a várias mudanças do ambiente, podendo controlar a mudança na abundância e diversidade de micro-organismos associados. Essas mudanças afetam vias de biossíntese. Por exemplo, a quantidade de carbono absorvido ou a falta de absorção pode ativar as vias PKS/NRPS e ocorrer a produção dos metabólitos secundários (WEBSTER; REUSCH, 2017). Um estudo realizado por SANG et al. (2019) relatou que na última década foram isolados 245 substâncias bioativas originadas do metabolismo de fungos e bactérias associadas aos corais. Porém, ainda é desconhecida a maioria das estruturas químicas dessas substâncias. Contudo, a maioria apresenta atividades antimicrobianas e antibiofilme, principalmente contra micro-organismo clinicamente importante, como *Escherichia coli*, *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *A. fumigatus*.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Revisar a produção de metabólitos secundários de fungos marinhos associados a invertebrados marinhos com atividade antimicrobiana no período de 2015-2020 e investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos com atividade antifúngica contra agentes infecciosos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática sobre compostos antimicrobianos de fungos marinhos entre os anos de 2015 e 2020;
- Verificar a predominância da espécie de fungo produtor de metabólitos secundários com atividade biológica;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos brutos e fracionados obtidos a partir de fungos marinhos contra as espécies de leveduras patogênicas *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

4. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura científica e para reunir os dados acerca de metabólitos secundários de fungos marinhos com atividade antifúngica foram realizadas buscas nas bases de dados: *Pubmed* e *Science Direct*. O período de dados limites de publicação foi entre 2015 e 2020.

Os descritores utilizados nas buscas incluíram: fungos marinhos (marine fungi), invertebrados marinhos (marine invertebrates), produtos naturais (natural products), atividade antifúngica (antifungal activity), metabólito secundário (secondary metabolite), antifúngicos (antifungals), corais (corals), esponjas (sponges), ascídios (ascidians).

Os artigos foram analisados baseados em três etapas: i) leitura dos títulos dos artigos pesquisados nas bases de dados com as palavras-chaves utilizadas e que possuíam termos relacionados com metabólitos de fungos marinhos, ii) após a seleção dos artigos, foi feita uma leitura dos resumos baseados nos critérios de inclusão, ou seja, que relatava informações como espécie e/ou gênero de fungos marinhos e metabólitos produzidos e iii) foram avaliados os textos dos artigos na sua forma integral para obter informações para concluir os objetivos desta revisão, sendo essa análise quantitativa e qualitativa, representados em forma de gráficos e tabelas.

4.1 Critério de inclusão

A seleção dos artigos analisados passou por critério de inclusão baseando-se nas informações que envolviam a identificação da espécie de fungos marinhos, de qual substrato os fungos foram extraídos, os metabólitos secundários produzidos e suas estruturas químicas.

- Fungos marinhos: todas as espécies que produziram metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

- Substrato: fungos marinhos associados a corais, esponjas e ascídias.

- Metabólito secundário: todos os metabólitos com atividade antimicrobiana.

- Estrutura química: compostos de fungos marinhos classificados de tipos estruturais, que inclui terpenóides, alcaloides, policetídeos, peptídeos e outros.

4.2 Critério de exclusão

Os artigos que não apresentavam a identificação dos fungos produtores dos compostos, os metabólitos secundários não tinham sido identificados e não relatavam sua estrutura química foram excluídos. Artigos duplicados ou repetidos encontrados na base de dados, trabalhos publicados que tinham formato de capítulo, revisões, editoriais e projetos também foram excluídos. Apenas artigos científicos foram utilizados neste trabalho.

4.3 Obtenção dos micro-organismos

Os fungos marinhos foram obtidos a partir da micoteca do Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) da UFAL, preservados e mantidos em óleo mineral estéril a 4°C e por meio do método Castellani, um método que assegura a viabilidade, pureza, patogenicidade e estabilidade de organismos fúngicos. Esse método consiste na inoculação das amostras das cepas e colocadas em frascos de vidros, contendo água destilada esterilizada (DIOGO et al., 2005). Os fungos foram isolados de amostras da esponja e do coral, coletados no recife de coral da Ponta Verde em Maceió-AL. Foram isolados e identificados por PAULINO; FÉLIX; LANDELL, 2020. Os fungos marinhos da ponta verde (FMPV) identificados foram *Aspergillus flavus* (FMPV01, FMPV04 e FMPV11), *Aspergillus ruber* (FMPV02), *Aspergillus niger* (FMPV03), *Phomar* sp.(FMPV05), *Aspergillus tubingensis* (FMPV06), *Hyphopichia* sp.(FMPV07), *Cladosporium colambiae* (FMPV08), *Trichoderma harzianum* (FMPV09), *Aspergillus sydowii* (FMPV10), *Curvularia* sp.(FMPV12), *Trichoderma longibrachiatum* (FMPV13), *Microsphaeropsis arundinis* (FMPV14) e *Penicillium citrinum* (FMPV15 e FMPV16).

4.4 Obtenção dos extratos brutos

Para reativar as linhagens, estas foram cultivadas em placas de Ágar Batata Dextrose (BDA) por um período de sete dias a temperatura de 25-28 °C. Os fungos foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido composto por glicose 1%, extrato de levedura 0,1%, cloreto de potássio 0,1%, cloreto de sódio 0,1%, e incubados a 25-28 °C por um período de 14 dias. Após esse período os cultivos foram filtrados sob vácuo através de

um papel de filtro em um funil Buchner para separar o filtrado da cultura de micélio. Em seguida, o micélio dos fungos foi extraído por metanol, formando uma fração metanólica e o sobrenadante foi extraído com acetato de etila gerando uma fração aquosa e orgânica. Obtendo 16 extratos de fungos marinhos. Foram selecionados dois extratos, FMPV02 e FMPV11, dos fungos *A. ruber* e *A. flavus*, respectivamente, esses fungos foram isolados da esponja *Tedania ignis* (FMPV02) e do coral *Palythoa variabilis* (FMPV11). Os extratos foram liofilizados (SCOPEL et al., 2013) no Laboratório de Biofilme e Diversidade Microbiana (LaBDIM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os extratos foram submetidos à cromatografia em Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare) eluídos com água (H₂O - 100%), Acetonitrila (Ac - 100%) e Metanol (MeOH - 5%; 10%; 20%; 30%; 50%; 70% e 100%).

4.5 Teste para atividade antifúngica - Concentração inibitória mínima (CIM)

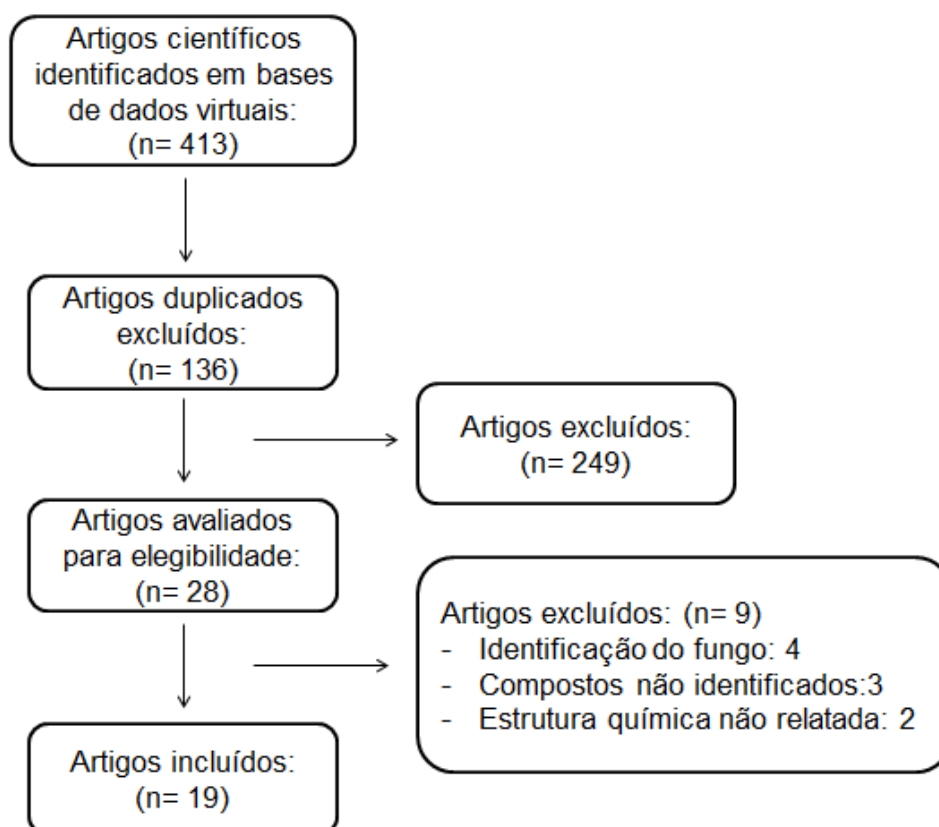
O teste foi realizado baseado no protocolo (M27-A2) (PFALLER et al., 2012) pelo NCCLS (Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada). Foram testadas, inicialmente, as leveduras patogênicas *C. neoformans* (ATCC 40283), *C. gatti*, *C. haemulonni* e *C. albicans* (ATCC 90028). Foi feito um preparo do inóculo da levedura em solução salina 0,85%, seguindo o padrão de escala Mc Farland que corresponde à turbidez a 0,5, com absorbância entre 0,11 e 0,15 a 600 nm. A suspensão foi inoculada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) em placas de 96 poços. Após, foram adicionados 100 µl de extrato aos poços, com concentração inicial de 400mg/ml e concentração final de 25 mg/ml. As placas foram, então, incubadas por 48 h a uma temperatura de 35 °C. Os antifúngicos anfotericina B (16µg/ml) e fluconazol (64 µg/ml) foram utilizados como controle. Após o período de incubação, a determinação da CIM, para analisar a sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos, foi lida de forma visual analisando o ponto de inibição do crescimento do micro-organismo, analisando qual concentração mais baixa irá impedir o crescimento visível. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada cepa utilizada.

**CAPÍTULO 1: REVISÃO SISTEMÁTICA DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS DE FUNGOS MARINHOS, 2015-2020.**

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta revisão sistemática foram identificadas 413 citações nas bases de dados *Pubmed* e *Science Direct*. Foram excluídos 136 por serem duplicados. Com a realização da primeira etapa (revisão dos títulos e abstracts), 249 artigos foram excluídos tendo um aproveitamento de 28 artigos. Após a leitura na íntegra dos artigos, foram excluídos 9 estudos da revisão: 4 estudos não identificavam quais espécies e/ou gêneros produziram os metabólitos secundários, 3 estudos não identificavam os metabólitos isolados e 2 estudos que não apresentavam as estruturas químicas dos compostos. Assim, 19 estudos atenderam aos critérios de inclusão. O processo de revisão está descrito graficamente na figura 15.

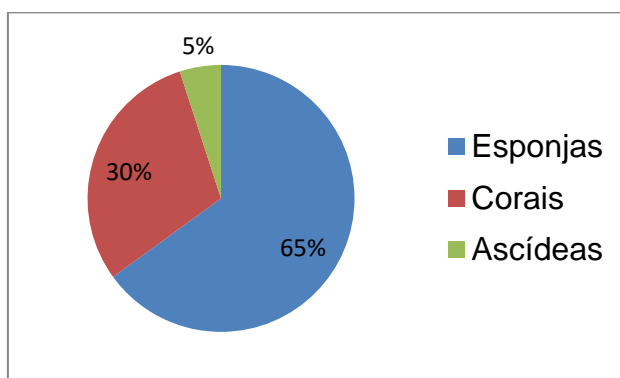
Figura 15: Diagrama da revisão sistemática realizada a partir das bases de dados *Pubmed* e *Science Direct* entre os anos de 2015 e 2020.



Fonte: Elaborado pela autora

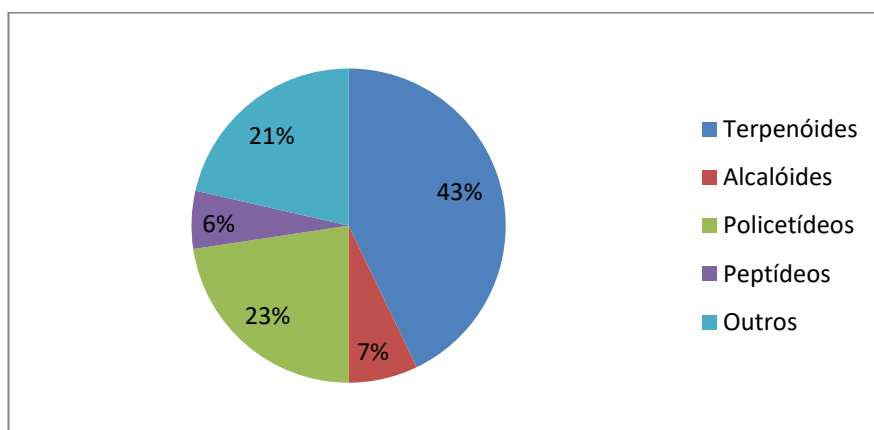
Esta revisão relata 84 novos compostos antimicrobianos (Tabela 3) derivados de fungos marinhos associados aos invertebrados marinhos como: esponjas (65%), corais (30%) e ascídias (5%) (Figura 16), classificados em cinco tipos estruturais (Figura 17), tais como terpenóides (43%), policetídeos (23%), alcalóides (7%), peptídeos (6%) e outros (21%). Uma grande parcela dos compostos produzidos foi isolada dos fungos *Aspergillus* (38%) seguido do *Penicillium* (19%) (Figura 18). Alguns metabólitos, como mariniafunginas B (ZHANG et al., 2019b) e adametizina A (LIU et al., 2015) apresentaram excelente atividade antimicrobiana comparada ao controle positivo. Sendo assim, tais compostos são estruturas potentes para drogas antimicrobianas.

Figura 16: Habitats dos fungos marinhos isolados.



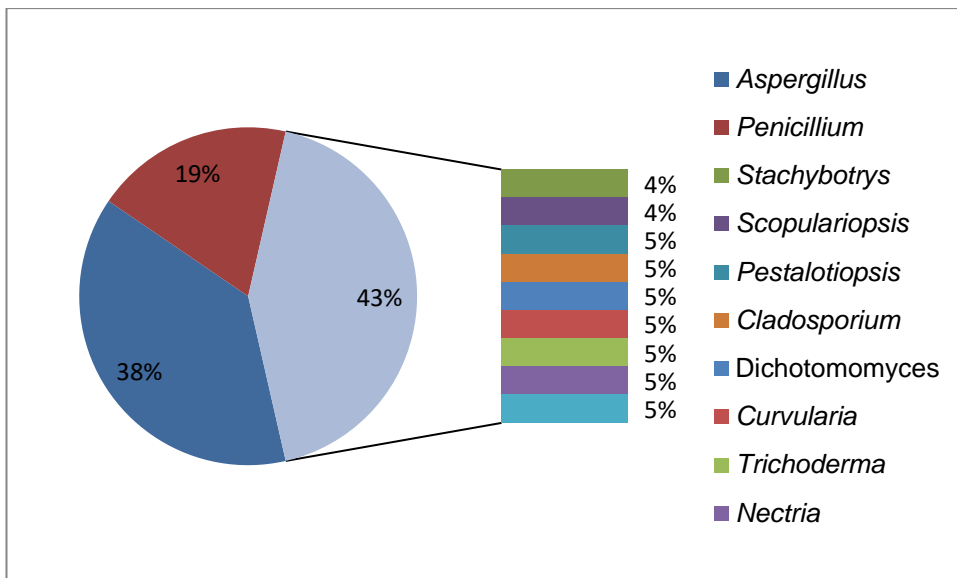
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17: Metabólitos antimicrobianos isolados de fungos marinhos baseado em sua estrutura molecular.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18: Fontes de metabólitos fúngicos marinhos com atividade antimicrobiana.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 3: Novos metabólitos antimicrobianos produzidos por fungos marinhos em 2015-2020

Metabólitos	Espécie/gênero	Substrato	Estrutura molecular	Atividade	Local	Autores/ano
Esperadinas B-D(1-3) C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃ (4)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium cyclopium</i>	Esponja <i>Agelas</i> aff.	Alcaloides	Antifúngico Antibacteriano Antiviral	China	(MA et al., 2015)
Nectriapironas C-D (5-6)	<i>Nectria</i> sp.	Esponja <i>Gelliodes carnosa</i>	Terpenóides	Antibacteriano	China	(GONG et al., 2015)
Adometizinas A-B (7-8) Adametacorenóis A-B (9-10)	<i>Penicillium adametzioides</i>	Esponja Não identifica	Terpenóides	Antifúngico Antibacteriano	China	(LIU et al., 2015)
Estaquibotricodermona A (11) Estaquibogrisefenona B A-B (12-13)	<i>Stachybotrys</i> sp.	Esponja Não identifica	Terpenóides	Antiviral	China	(QIN et al., 2015)
Penicilosídeos A-B (14-15)	<i>Penicillium</i> sp.	Tunicado <i>Didemnum</i> sp	Outros	Antifúngico Antibacteriano	Egito	(MURSHID et al., 2016)
Austalides S-U (16-18)	<i>Aspergillus areolatus</i>	Esponja Não identifica	Terpenóides	Antiviral	China	(PENG et al., 2016)
3β,7β,15α,24-tetrahydroxoleon-12-ene-11,22-diona(19) 15α,22β,24-trihidroxioleon-11,13,diene-3-ona (20) 6-hidroxi-2,7-dimetil-1,4-naftoquinona (21)	<i>Scopulariopsis</i> sp.	Coral <i>Stylophora</i> sp.	Terpenóides Policetídeos	Antibacteriano	Egito	(ELNAGGAR et al., 2017)
Heterocornóis A-L (22-33)	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	Esponja <i>Phakellia fusca</i>	Policetídeos	Antifúngico Antibacteriano	China	(LEI et al., 2017)
Ácido diorcinólico (34) B-d-glucopironosil aspergiluseno A (35)	<i>Aspergillus sydowii</i>	Esponja <i>Stelletta</i> sp.	Terpenóides Outros	Antibacteriano	Coreia	(LIU et al., 2017)
Cladosporisteróide A-C (36-38) (3R)-3-(2-hidroxiopropil)-6,8-di-hidroxi-3,4-di-hidroisocumarina (39)	<i>Cladosporium</i> sp.	Esponja <i>Callyspongia</i> sp.	Outros	Antiviral	China	(PANG et al., 2018)
Amida dicotomocejs A-D (40-43) Dicocetídeo A (44) Dicetopiperozinas dicocerazinas A-B (45-46)	<i>Dichotomomyces cejpii</i>	Coral <i>Lobophytum crassum</i>	Terpenóides Alcaloides Policetídeos	Antibacteriano	China	(CHEN et al., 2017)
Luteoreto E (47) Versicolactona G (48) (3E,7E)-4,8-dimetil-undecano-3,7-	<i>Aspergillus terreus</i>	Coral <i>Sarcophyton subviride</i>	Terpenóides Outros	Antibacteriano	China	(LIU et al., 2018)

dieno-1,11diol (49)						
Sinulariapeptídeos A-E (50-54)	<i>Simplicillium</i> sp.	Coral <i>Sinularia</i> sp.	Peptídeos	Antifúngico Antibacteriano	China	(DAI et al., 2018)
Isadiidroauroglaucina (55) Flavoglaucina (56) Eritromicina (57) Phycion (58) Neocinulina (59) Echinulin (60)	<i>Aspergillus ruber</i>	Coral <i>Gorgonia</i> sp.	Outros	Antibacteriano	China	(LIANG et al., 2018)
Mariniafunginas B-G (61-66) Sordaricina B (67)	<i>Curvularia hawaiiensis</i>	Coral <i>Palythoa haddoni</i>	Terpenóides	Antifúngico	China	(ZHANG et al., 2019b)
Brasilianoídes G-L (68-73) Neoaustina (74)	<i>Penicillium brasilianum</i>	Esponja não identificada	Terpenóides	Antibacteriano	China	(ZHANG et al., 2019)
Aspergilusena D (75) 2-hidroxi-1-(hidrometil)-8-metoxi-3-metil-9H-xanten-4-1 (76) 2- hidroxi-1-(hidrometil)-7,8-dimetoxi-3-metil-9H-xanten9-ona (77) Ácido 3-(2,5 dimetilbenzo[d][1,3] diaxol-2-il)propanoico (78) 2-(5-hdroxi-4-metilpentil)-2-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-ácido carboxílico (79)	<i>Aspergillus sydowii</i>	Esponja <i>Phakellia fusca</i>	Terpenóides Policetídeos	Antiviral Antibacteriano	China	(LIU et al., 2019)
Ácido harzianólico (80) Harzianona E (81) 3,7,11-tribidroxil5-cicloneerato (82)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Coral não identificado	Terpenóides	Antifúngico Antibacteriano	China	(SHI et al., 2020)
Aspericácidos A-B (83-84)	<i>Aspergillus</i> sp.	Esponja <i>Haliclona</i> sp.	Policetídeos	Antifúngico	China	(LIU et al., 2020)

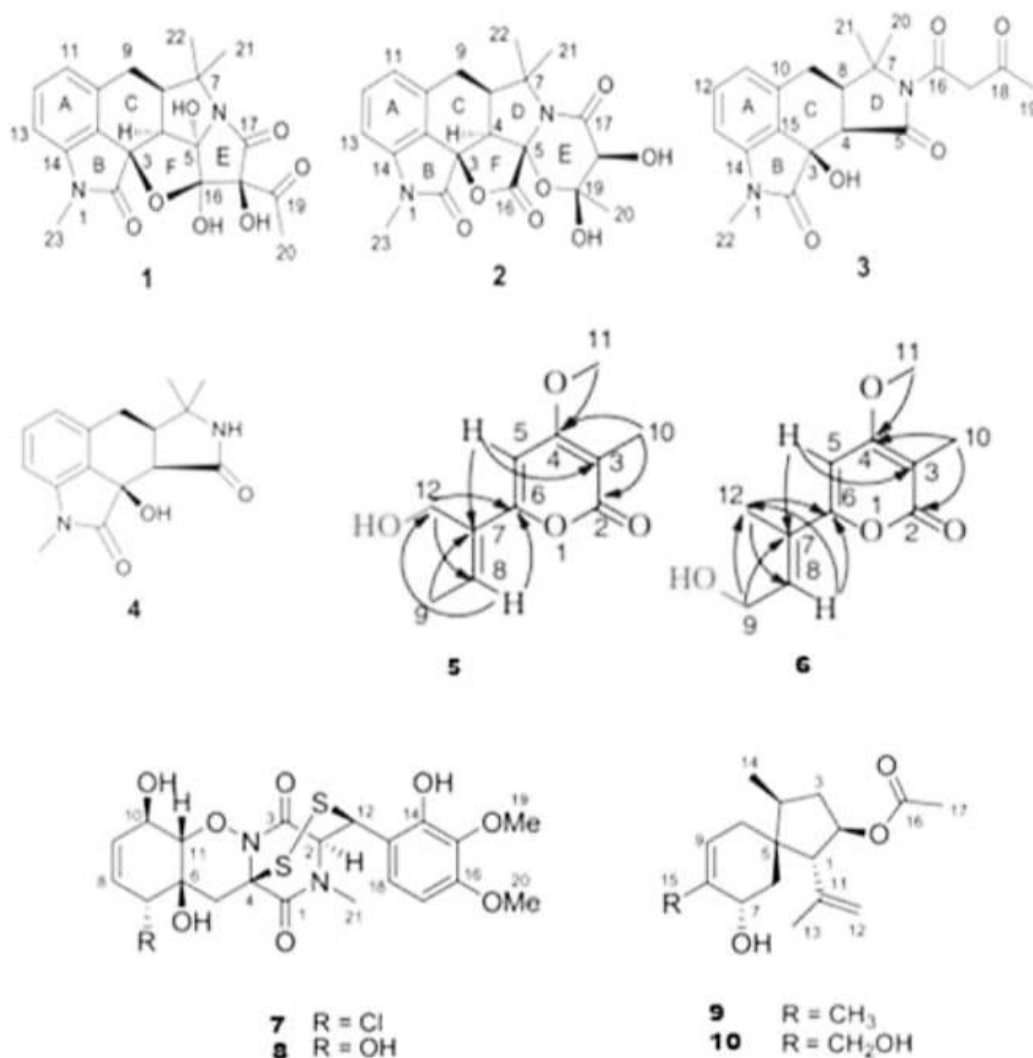
Fonte: Elaborado pela autora

Em 2015, MA et al. (2015), isolaram com ETOAc dois novos alcaloides de ácido ciclo-piazônico (CPA) hexocíclico, os compostos esperadina B (1) e o esperadina C (2) e um alcaloide oxindol tetacíclico, esperadina D (3) a partir dos metabólitos de *Aspergillus flavus* associado ao tecido interno da esponja *Agelas* aff., das Ilhas Xisha, China. O composto 2 possui esqueleto 6/5/6/5/5/6 com sistema de anel hexacíclico sendo o primeiro com a unidade 5,6-dihidroxi-4-oxo-1,3-oxazinano. Já o composto 3 é instável em MeOH degradando-se em um novo composto denominado C₁₆H₁₈N₂O₃ (4). Os compostos 1-3 foram rastreados quanto à bioatividade demonstrando baixa atividade antiviral contra influenza H₁N₁ (IC₅₀>100mM) e apresentou baixa atividade antibacteriana e antifúngica, com valores de CIM > 400µg/ml.

A análise química do micélio do fungo *Nectria* sp., isolado da esponja *Gelliodes carnosus*, do sul do mar da China (GONG et al., 2015), resultou em duas novas pironas monoterpénóides, netriapirona C (5) e netriapirona D (6). Estudos anteriores já relatavam a netriapirona como um antibiótico ativo contra *S. aureus*, apresentando CIM de 30 mg/mL. Os novos compostos (5-6) apresentaram baixa atividade antibacteriana na dose de 500 mg/disco contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* pelo método de difusão em disco.

O fungo *Penicillium admetzioides*, isolado do tecido de uma esponja marinha não identificada, da Ilha de Hainan, na China (LIU et al., 2015), produziu dois novos derivados de bistiodicetopiperazina (os compostos admetizina A (7) e admetizina B (8)) e dois novos sesquiterpenos (admetacorenóis A e B (9-10)). Os novos compostos foram avaliados quanto à atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* e contra fungos fitopatogênicos. O composto 7 apresentou atividade significativa contra *S. aureus*, com valores de CIM entre 8 e 32 µm/mL, enquanto o composto 8 mostrou atividade contra *S. aureus* com valor de CIM de 64 µg/mL. Os compostos 7 e 8 apresentaram estruturas químicas iguais ao substituírem o Cl em c-7 acarretando um aumento na atividade antibacteriana. Em contrapartida, os compostos 9 e 10 não apresentaram atividade significativa (IC₅₀>10µM).

Figura 19: Estrutura química dos compostos 1-10.



Fonte: MA et al. (2015), GONG et al. (2015) e LIU et al. (2015).

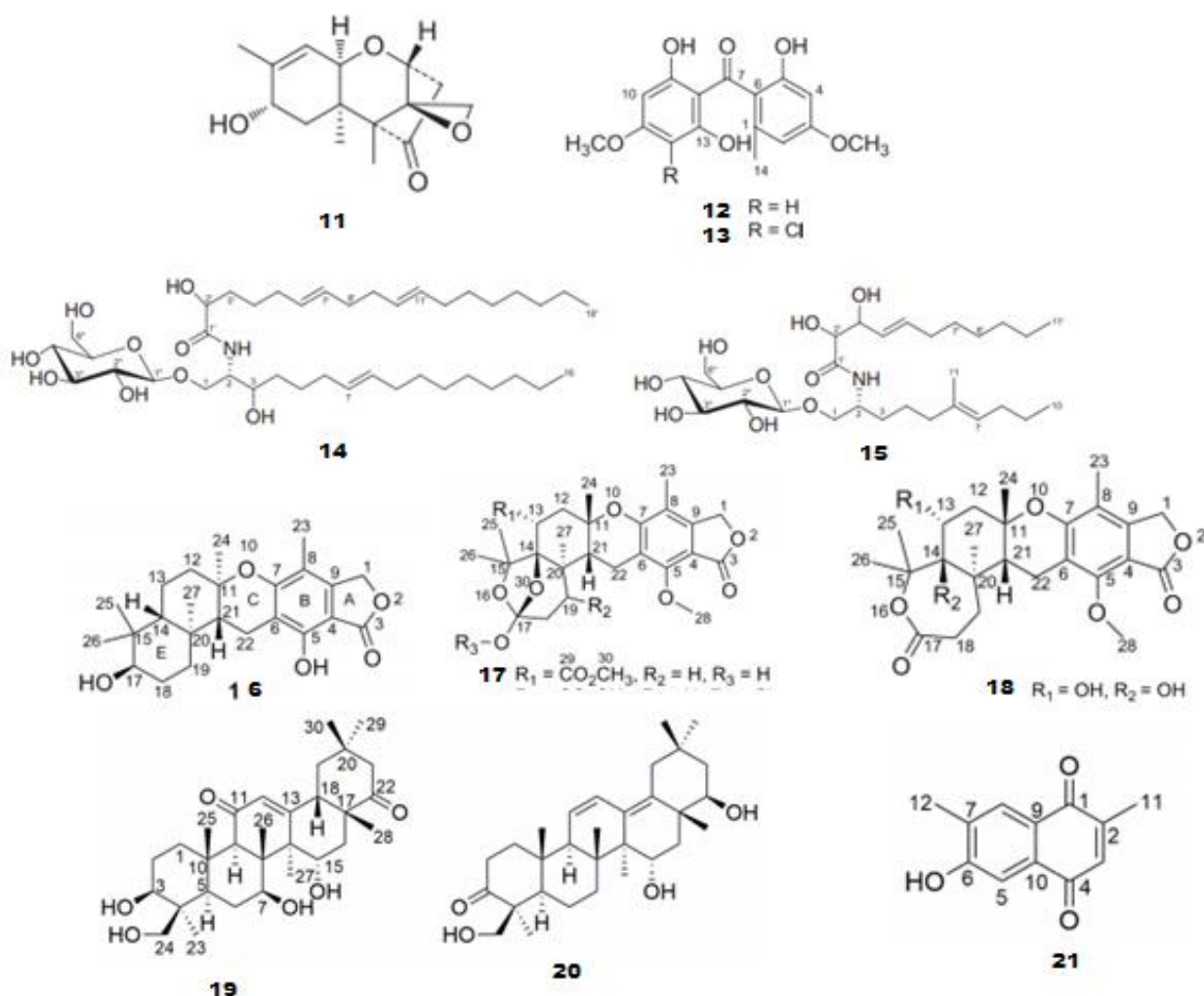
Um sesquiterpenóide, Estaquibotricodermona A (11) e duas xantonas, Estaquibogrisefenona A-B (12-13) foram purificadas a partir do fungo *Stachybotrys* sp. associado a uma esponja não identificada, coletada na Ilha Xisha, China (QIN et al., 2015). Os três compostos foram avaliados quanto à sua atividade antiviral e o composto 11 se mostrou inativo, já os compostos 12 e 13 exibiram atividade significativa contra o vírus intestinal EV71 com valores de IC₅₀ de 30,1 e 50 µM, respectivamente.

Os penicilosídeos A e B (14-15) são dois novos cerebrosídeos isolados do fungo *Penicillium* sp. isolado do tunicado *Didemnum*, coletado do mangue em Sharm El-Sheikh, no Mar Vermelho da costa do Egito (MURSHID et al., 2016). Os compostos 14 e 15 apresentaram atividade antifúngica significativa contra *C. albicans* e atividade antibacteriana também significativa contra *S. aureus* e *E. coli*. A análise antimicrobiana foi determinada por meio da zona de inibição no método de difusão em disco, onde o composto 14 apresentou atividade contra *C. albicans* com inibição de 23 mm e o composto 15 apresentou inibição de 19 mm (*S. aureus*) e 20 mm (*E. coli*).

Os estudos de PENG et al. (2016) demonstraram compostos com atividade antiviral contra o vírus influenza A (H₁N₁). Esses compostos foram obtidos do fungo *Aspergillus aureolatus*, isolado de uma esponja não identificada das Ilhas Xisha, China. Pertencente à família meroterpenóides, os três compostos isolados foram identificados como austalídeos S-U (16-18). Os austalídeos podem ser divididos em quatro subfamílias de acordo com o sistema de anel, podendo ser tetracíclico 5/6/6/6, penta cíclico 5/6/6/6/6, penta cíclico 5/6/6/6/7 e de anéis hexacíclicos 5/6/6/6/5/6. O composto 16 é o primeiro austalídeo com anel de terpeno fundido ao anel cromático possuindo o sistema de anel pentacíclico 5/6/6/6/6. Apesar dos austalídeos terem um histórico antimicrobiano, apenas o composto 18 apresentou atividade antiviral significativa com valores de IC₅₀ de 90µM.

O fungo *Scopulariopsis* sp. foi isolado de um coral duro, *Stylophora* sp., coletado no litoral de Ain El-Sakhna, Mar Vermelho, Egito (ELNAGGAR et al., 2017). A análise química resultou em dois novos triterpenóides e um derivado da naftoquinona. Os compostos foram identificados como 3β,7β,15α,24-tetrahidroxioleon-12-ene-11,22-diona (19), 15α,22β,24-trihidroxioleon-11,13,diene-3-ona (20) 6-hidroxi-2,7-dimetil-1,4-naftoquinona (21) e foram testados quanto à atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Mycobacterium tuberculosis* apresentando baixa atividade testado em uma dose de 10 µg/mL.

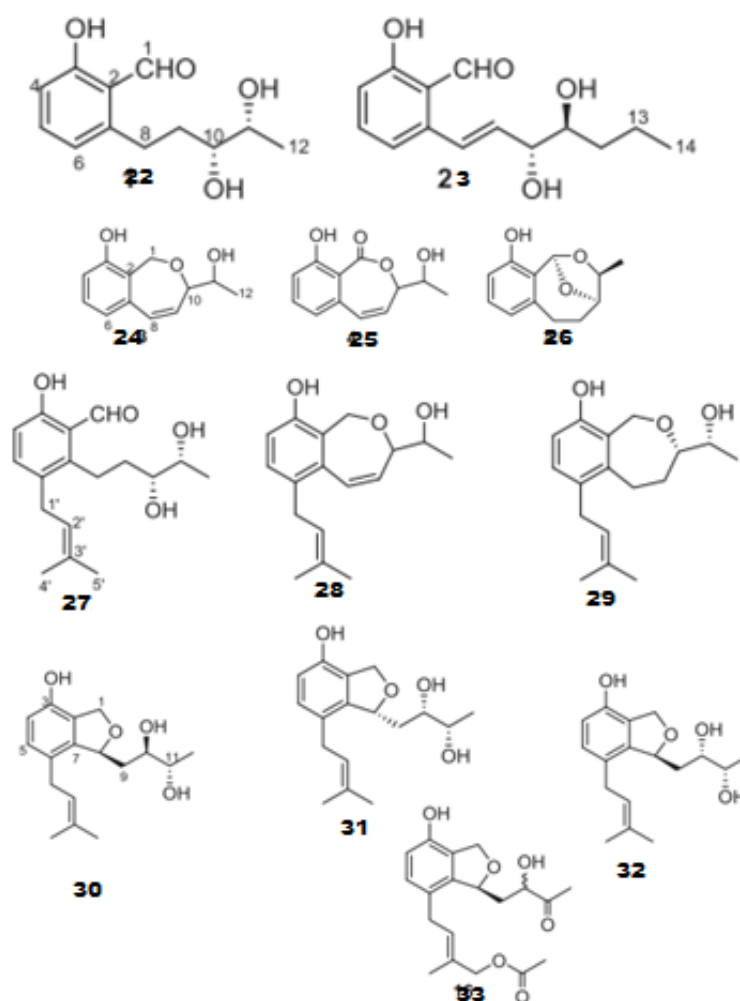
Figura 20: Estrutura química dos compostos do 11-21.



Fonte: QIN et al. (2015), MURSHID et al. (2016), PENG et al. (2016) e ELNAGGAR et al. (2017).

Com esforços contínuos na busca de metabólitos secundários a partir do fungo *Pestalotiopsis heterocornis* associado a uma esponja *Phakelia fusca*, da Ilha Xisha, China, doze derivados de policetídeos, heterocornóis A-L (22-33) foram isolados por LEI et al. (2017) e testados suas atividades antibacteriana e antifúngica. Como resultado, obtiveram atividade significativa dos compostos AC (22-24) e FH (27-29) contra bactéria Gram-positiva *S. aureus* e *B. subtilis* com valores de CIM entre 25 a 100 µm/mL, porém apresentando atividade antifúngica fraca com valores de CIM de 100 µg/mL.

Figura 21: Estrutura química dos compostos 22-33.



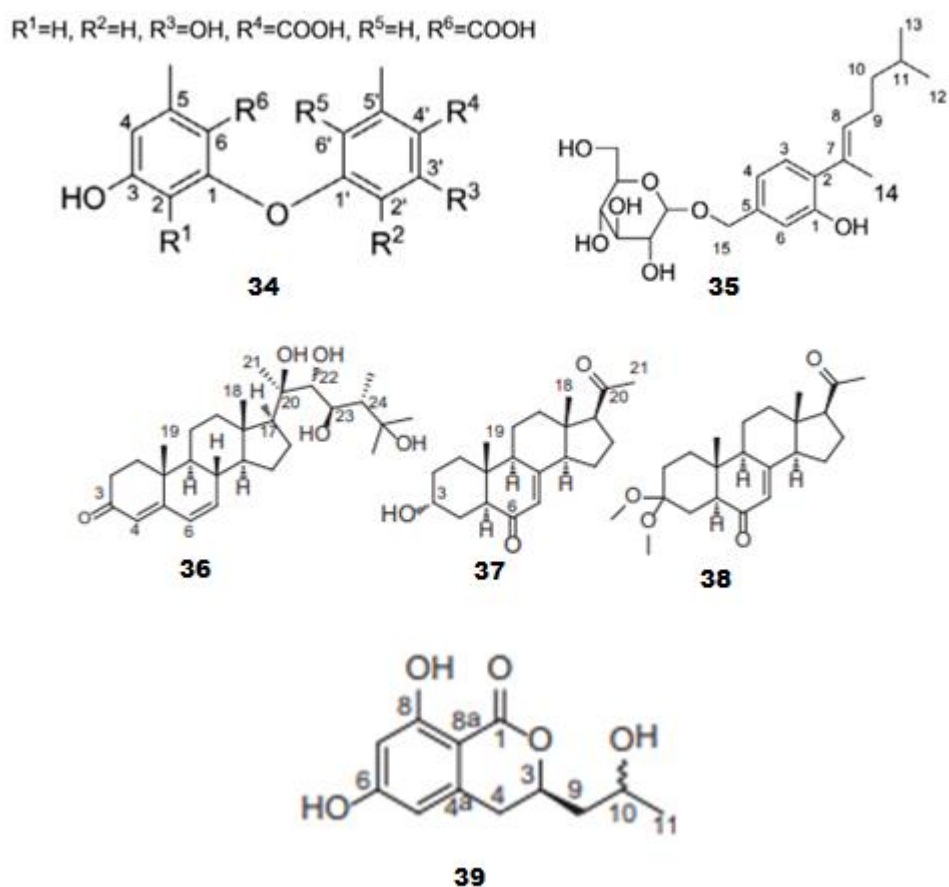
Fonte: (LEI et al., 2017).

O ácido diorcinólico (34) e o β -D-glucopiranosil aspergiluseno A (35) são dois novos metabólitos isolados do fungo *Aspergillus sydowii* extraído da esponja *Stelletta* sp., coletada na Coreia. O composto 34 é o primeiro glicosídeo de bisabalano fenólico sesquiterpenos a apresentar atividade antibacteriana contra *S. aureus*, porém não significativo (LIU et al., 2017). Três novos esteróis altamente oxigenados, cladosporesteróide A-C (36-38) e uma diidroisocumarina, (3R)-3-(2-hidroxiopropil)-6,8-di-hidroxi-3,4-di-hidroisocumarina (39) foram isolados do fungo *Cladosporium* sp. associado a esponja

Callypongia sp., coletada na China. Foram testadas suas atividades antivirais contra a cepa viral H₃N₂, porém apenas o composto 37 obteve atividade fraca com IC₅₀ de 16,5 µM comparado ao controle positivo que possui valor IC₅₀ de 34µM (PANG et al., 2018).

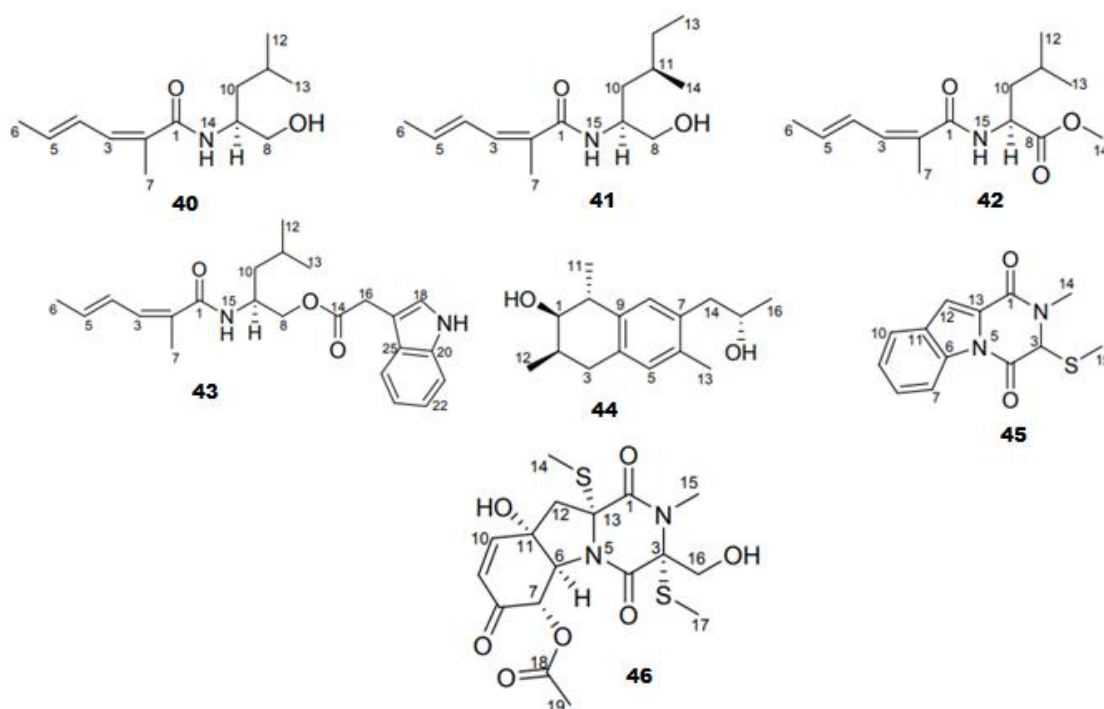
CHEN et al. (2017) isolaram o fungo *Dichotamomyces cejpilii* do coral *Labophytim crossum*, coletado na China. Em seu cultivo, os pesquisadores adicionaram L-triptofano e L-fenilalamina, obtendo uma produção de 28 compostos, entre eles, sete compostos são inéditos. Quatro são amida, dicotomocejs A-D (40-43), um policetídeo, dicocetídeo A (44) e duas dicetopiperazinas, dicocerazinas A-B (45-46). Os compostos foram testados contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Acinetabacter de bauman*, porém com nenhum efeito inibitório significativo observado.

Figura 22: Estruturas químicas dos compostos 34-39.



Fonte: LIU et al. (2017) e PANG et al. (2018).

Figura 23: Estrutura química dos compostos 40-46.



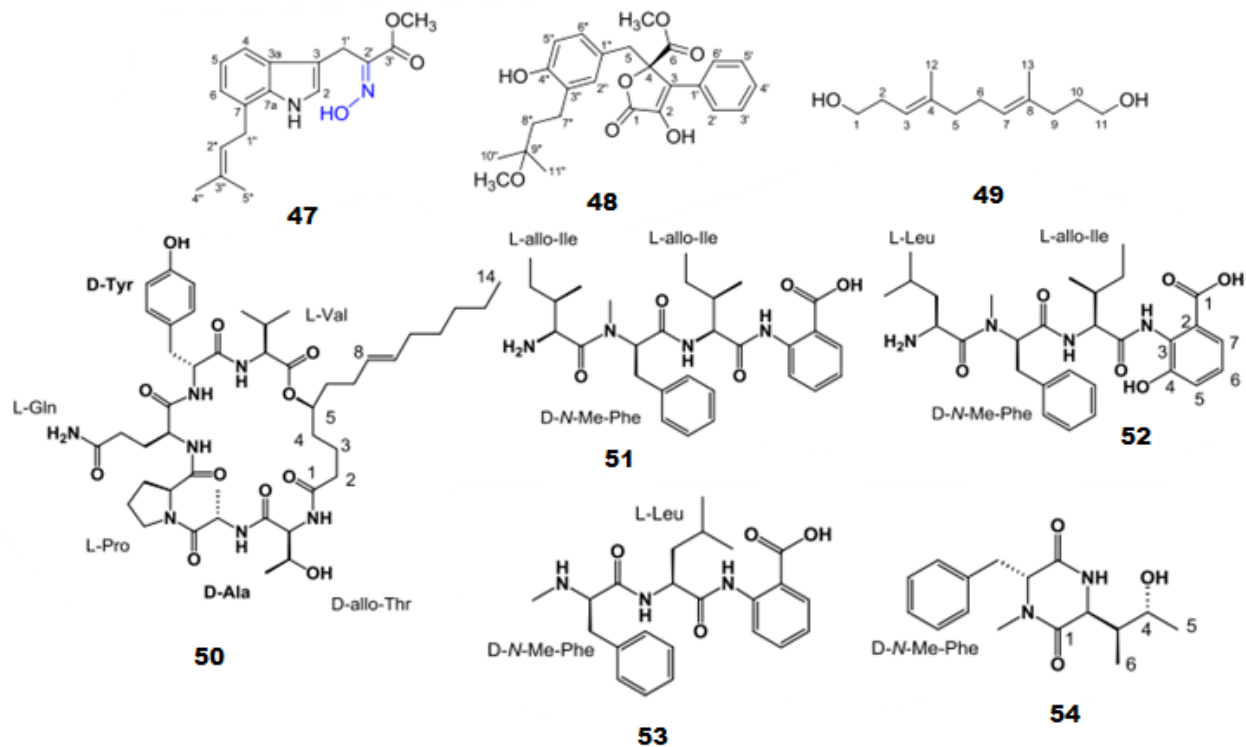
Fonte: CHEN et al. (2017).

Três compostos foram purificados a partir do fungo *Aspergillus terreus* associado ao coral *Sarcophyton subviride*, coletado na costa da Ilha Xisha no mar da China. Os compostos identificados, um derivado de triptofano prenilado, luteoreto E (47), um derivado de butenolídeo, versicolactona G (48) e um álcool alifático linear, (3E,7E)-4,8-dimetil-undecano-3,7-dieno-1,11-diol (49) foram testados contra *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus*. Todavia sem atividade significativa e com valores de CIM > 100 µg/mL (LIU et al., 2018).

Sinulariapeptídeos A-E (50-54) são cinco novos peptídeos isolados do fungo *Simplicillium* sp. isolado do coral *Sinularia* sp., coletado da Ilha Yongxing, China. Esses compostos foram identificados como ciclo depsipeptídeos, ou seja, três peptídeos lineares e um dipeptídeo cíclico que não foram descritos. Os compostos foram testados quanto sua atividade antifúngica, apenas os compostos 50 e 54 apresentaram zonas de inibição contra *Colletotrichum*

oceanum e *Pyricularia oryzae* cav, com valores de CIM entre 4,9 e 9,8µg/mL, tendo actidiona como controle positivo (CIM = 10 µg/mL) (DAI et al., 2018).

Figura 24: Estruturas químicas dos compostos 47-54.



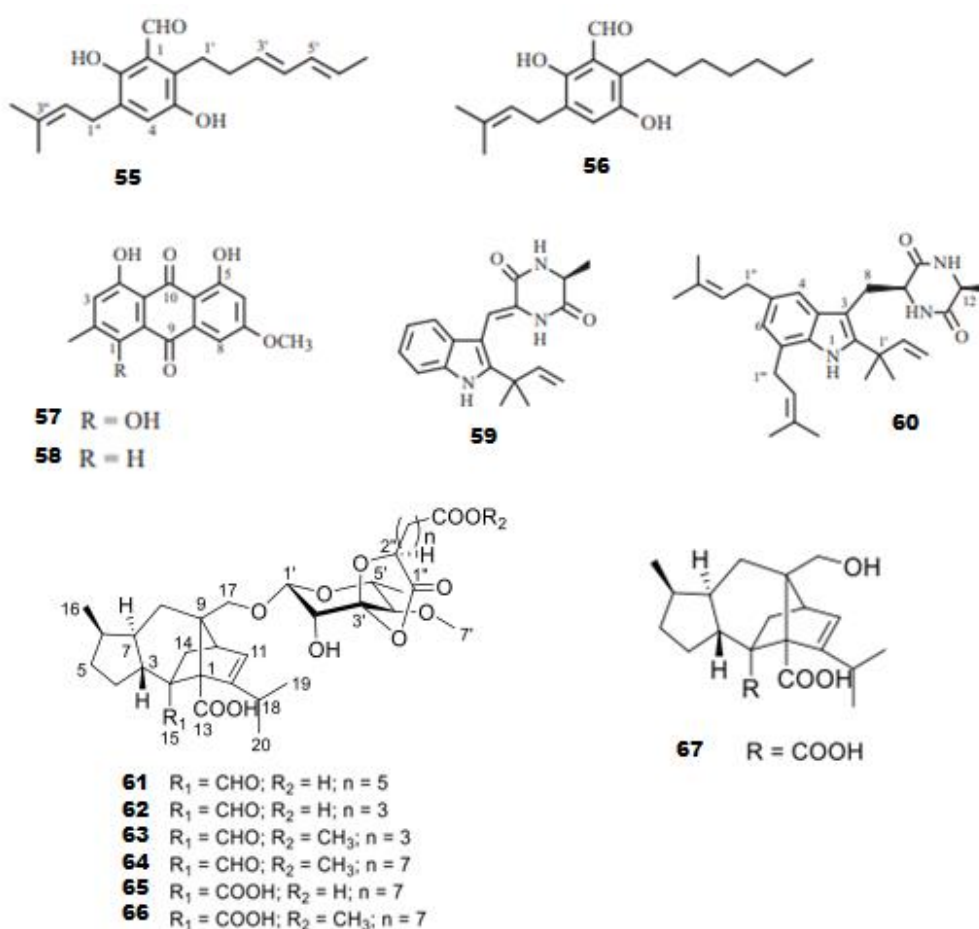
Fonte: LIU et al. (2018) e DAI et al. (2018).

LIANG et al. (2018) coletaram corais Gorgônia na Ilha Xisha, na China e isolaram desses corais o fungo *A. ruber*. Ele foi extraído três vezes com ETOAc e três vezes com CH₂Cl₂-MeOH, sendo isolados seis compostos: isodiidroauraglaucina (55), flavoglaucina (56), eritromicina (57), physcio (58), neoecinulina (59) e echinulin (60). Os compostos foram testados contra cinco cepas bacterianas patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus cereus* e *salmonella typhimurium*, porém apenas os compostos 56 e 60 apresentaram atividade antibacteriana fraca com valor de IC₅₀ de 50 µM. Em contrapartida, os compostos 55 e 56 foram avaliados quanto à atividade antiviral contra HSV-1 apresentando atividade significativa com valores de EC₅₀ de 4,73 e 6,95µM, respectivamente.

Seis novos compostos, moriniafungina B-G (61-66), que são glicosídeos de terpenícos tetracíclicos de sordorina e um novo diterpenos tetracíclico de

sordaricina, sordaricina B (67) foram isolados a partir do fungo *Curvularia hawaiiensis* obtido a partir do coral *Palythoa haddoni*, coletado na China e extraído por ETOAc apresentaram atividade antifúngica. Os compostos (61-66) são os primeiros casos de sordarina que possuem um anel espiro 1,3-dioxolan-4-ona, algo raro na natureza. Os compostos foram testados quanto à suas atividades antibacterianas, antiviral e antifúngica. Os compostos 61-64 apresentaram forte atividade antifúngica contra *C. albicans* com valor de CIM de 2,9 μ M (ZHANG et al., 2019).

Figura 25: Estruturas químicas dos compostos 55-67.

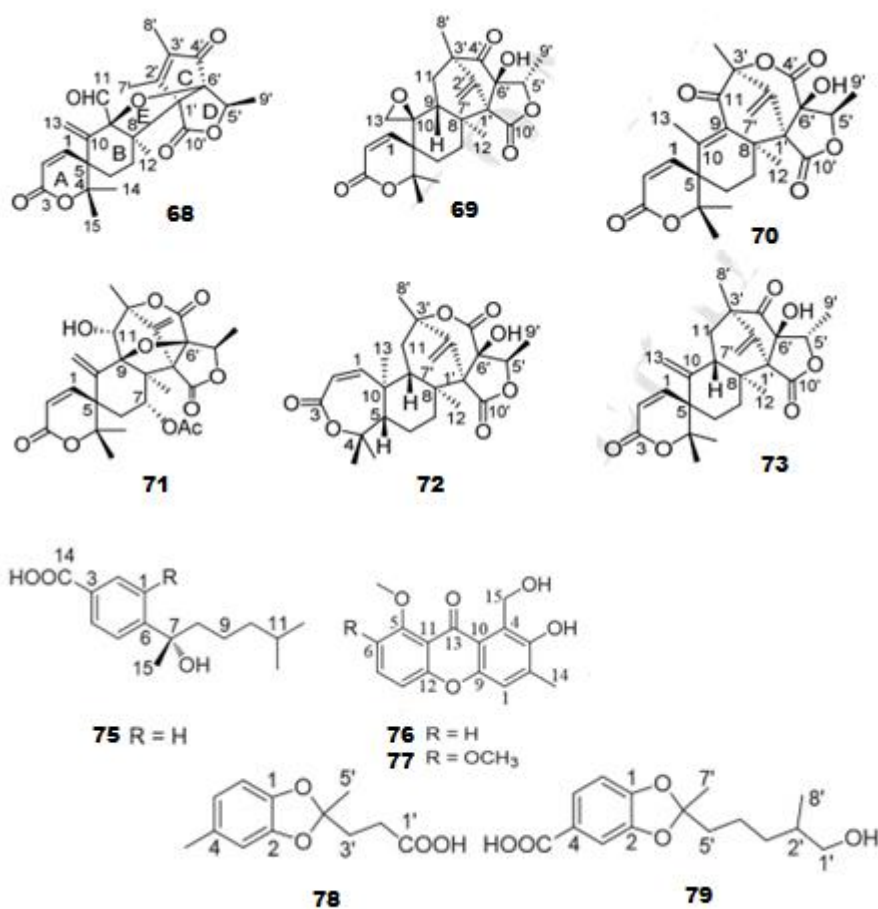


Fonte: LIANG et al. (2018) e ZHANG et al. (2019b).

Um estudo baseado em análise de bioinformática dos *clusters* de genes sintéticos em associação com a detecção do qRT-PCR fez com que ZHANG et al., (2019) buscassem meroterpenóides produzidos pelo fungo marinho *Penicillium brasilianum*. O fungo *P. brasilianum* foi isolado de uma esponja não identificada, coletada na Ilha Weizhou, China e teve seus metabólitos extraídos com o solvente ETOAc. Seis brasilionoides G-L(68-73) foram isolados desta cepa fúngica. As análises demonstraram que o composto 68 é caracterizado por um penta cíclico 6/6/5/5/5 e o composto 72 com um sistema penta cíclico 7/6/6/6/5, ambos incomum na natureza. Todos os compostos foram testados quanto à atividade antibacteriana e apenas o composto 73 exibiu inibição contra a invasão de bactérias nas células hospedeira.

O fungo *Aspergillus sydowii* foi isolado da esponja *Phakellia fusca*, na Ilha Xisha na China (LIU et al., 2019) e extraído com ETOAc. Através da análise química, isolaram cinco novos compostos, um sesquiterpenoide do tipo bisabolano, aspergiluseno D (75), duas novas xantonas, 2-hidroxi-1-(hidrometil)-8-metoxi-3-metil-9H-xanten-4-1 (76) 2- hidroxi-1-(hidrometil)-7,8-dimetoxi-3-metil-9H xanten9-ona (77) e dois novos derivados de catecol, Ácido 3-(2,5 dimetilbenzo[d][1,3] diaxol-2-il)propanoico (78) 2-(5-hdroxi-4-metilpentil)-2-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-ácido carboxílico (79). Os testes dos compostos quanto à sua atividade antiviral contra o vírus influenza A e antibacteriana contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *A. baumannii*, *E. coli* e *K. pneumoniae* resultou em uma atividade antibacteriana não significativa. Em contrapartida, os compostos 75 e 79 apresentaram inibição seletiva contra dois subtipos de vírus influenza A com valores de IC₅₀ variando de 1,11 µM a 4,70 µM.

Figura 26: Estruturas químicas dos compostos 68-79.

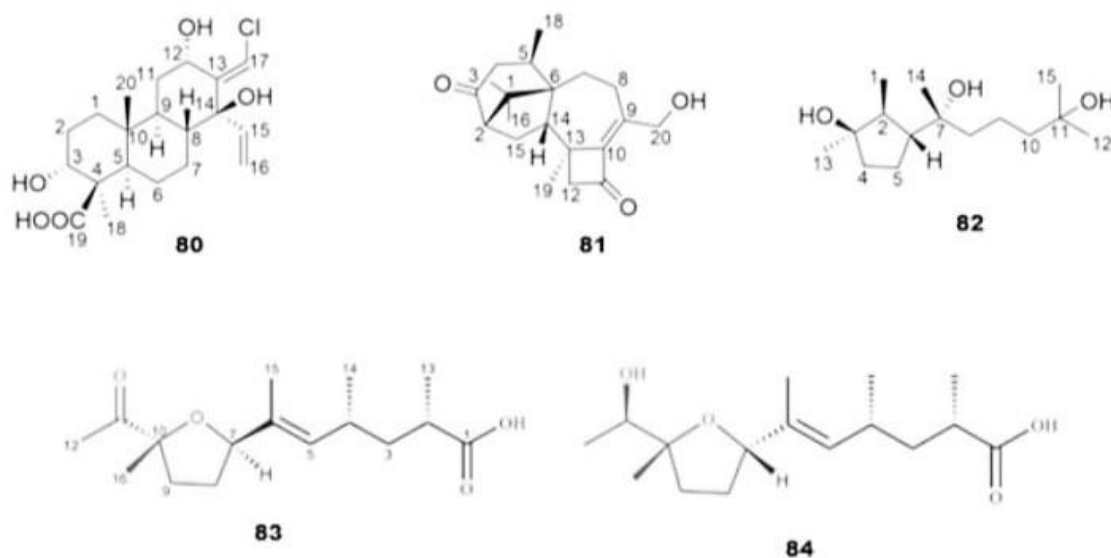


Fonte: ZHANG et al. (2019) e LIU et al. (2019).

O fungo *Trichoderma harzianum* derivado de um coral mole não identificado das Ilhas Xisha da China. Em busca de novos compostos, os pesquisadores SHI et al. (2020) utilizaram a manipulação química epigenética para “despertar genes adormecidos”, fazendo mudanças nas estruturas dos metabólitos secundários por meio de um inibidor de histona desacetilase (HDAC). Assim, três novos terpenóides foram isolados dessa cepa fúngica, ácido harzianólico A (80), que é um cleistantano diterpenóide, um harzianona E (81) que é um harzianol diterpenóide e um ciclonerano sesquiterpenóide, 3,7,11-trihidroxcloranona (82). Testados para sua atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e atividade antifúngica contra *C. albicans*. Porém não apresentaram atividade significativa.

O fungo *Aspergillus* sp. associado a uma esponja *Haliclona* sp., coletada em Lingshui, província de Hainan, China (LIU et al., 2020) foi isolado e produziu dois compostos incomuns derivados da tetrahidrofurano, possuindo um anel de tetrahidrafurano 2,5-dissubstituído acoplado a uma cadeia de ácido graxos insaturado, denominados apsericácidos A e B (83-84). Os compostos foram testados para atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* e o composto 83 apresentou atividade in vitro com CIM = 50 µg/mL, porém o composto 84 não apresentou atividade significativa com valores de CIM de 128 µg/mL.

Figura 27: Estrutura química dos compostos 80-84.



Fonte: SHI et al. (2020) e LIU et al. (2020).

**CAPÍTULO 2: PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR FUNGOS MARINHOS DO LITORAL DE ALAGOAS**

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em um trabalho anterior, o qual foi realizado teste de atividade antifúngica, por meio da técnica de CIM, foi demonstrado que no total de 16 extratos de fungos marinhos isolados de invertebrados marinhos coletados no recife de coral da Praia da Ponta Verde, Maceió AL (Tabela 4), dez apresentaram atividade antifúngica (Tabela 5), onde cinco apresentaram atividade contra *C. albicans*, dois para *C. haemulonii*, 10 para *C. neoformans* e 2 para *C. gatti*.

Tabela 4: Espécies de fungos marinhos isolados a partir de invertebrados marinhos coletados no recife de coral da Praia de Ponta Verde, Maceió-AL.

Código	Espécie
FMPV 001	<i>Aspergillus flavus</i>
FMPV 002	<i>Aspergillus ruber</i>
FMPV 003	<i>Aspergillus niger</i>
FMPV 004	<i>Aspergillus flavus</i>
FMPV 005	<i>Phoma</i> sp.
FMPV 006	<i>Aspergillus tubingensis</i>
FMPV 007	<i>Hyphopichia</i> sp.
FMPV 008	<i>Cladosporium colombiae</i>
FMPV 009	<i>Trichoderma harzianum</i>
FMPV 010	<i>Aspergillus sydowii</i>
FMPV 011	<i>Aspergillus flavus</i>
FMPV 012	<i>Curvularia</i> sp.
FMPV 013	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
FMPV 014	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>
FMPV 015	<i>Penicillium citrinum</i>
FMPV 016	<i>Penicillium citrinum</i>

Fonte: PAULINO; FÉLIX; LANDELL, 2020.

Tabela 5: Extratos de fungos marinhos que obtiveram atividade inibitória contra espécies patogênicas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

fungos	Extratos de fungos marinhos
<i>Candida albicans</i>	FMPV 01; FMPV 02; FMPV 06; FMPV 11 e FMPV 14
<i>Candida haemulonii</i>	FMPV 02 e FMPV 11
<i>Cryptococcus neoformans</i>	FMPV 01; FMPV 02; FMPV 04; FMPV 06; FMPV 08; FMPV 09; FMPV 10; FMPV 11; FMPV 13; FMPV 14
<i>Cryptococcus gatti</i>	FMPV 02 e FMPV 11

Fonte: Elaborado pela autora.

Dos 16 extratos brutos de fungos marinhos testados, foram selecionados dois extratos brutos (FMPV02 e FMPV11) que foram eficazes na inibição das espécies *C. neoformans*, *C. gatti*, *C. albicans* e *C. haemulonii*. Esses extratos brutos foram então fracionados, utilizando os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (CH₃CN) e água (H₂O).

As frações ativas foram submetidas ao ensaio de CIM e ambas mostraram um valor alto de inibição, mostrados na tabela 6. Portanto, os extratos foram testados contra os isolados clínicos *C. neoformans* ATCC 32045 e *C. albicans* ATCC 90028 e mostraram resultados positivos e significativos, apresentando valores de CIM entre 0,5 mg/mL e 2 mg/mL em ambos os isolados. Em um estudo semelhante do fungo *Curvularia hawaiiensis* do coral *Palythoa haddoni*, coletado na China, apresentou atividade inibitória contra *C. albicans* com valores de CIM de 2,9 µM (ZHANG et al., 2019). Outro estudo realizado por DAI et al. (2018) isolando o fungo *Simplicillium* sp. do coral *Sinularia* sp., na China. Foi avaliada sua atividade antifúngica contra *Colletotrichum oceanum* com valores de CIM de 4,9 µg/L.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) das frações de fungos marinhos associados a invertebrados marinhos (corais) coletados no recife de coral da praia de Ponta Verde, Maceió/AL.

	MeOH	CH ₃ CN	H ₂ O	MeOH	CH ₃ CN	H ₂ O
<i>C. neoformans</i> ATCC 32045	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/ml	1 mg/mL
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1 mg/mL	2 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	0,5 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

Na revisão sistemática os gêneros mais predominantes foram *Aspergillus* e *Penicillium*. Corroborando com os estudos de PAULINO, 2020 que confirma a predominância no litoral alagoano dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Cladosporium*. Em 2015, XU et al (2015), em seus estudos já afirmava a predominância do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* como fungos marinhos que mais sintetizam compostos antimicrobianos.

Os fungos marinhos podem ser amplamente encontrados em todos os ecossistemas da terra, abrangendo ambientes aquáticos, podendo ser facilmente achados associados a sedimentos, algas, macro e micro organismos e invertebrados marinhos (GROSSART et al., 2019). Apresentando atividades antimicrobianas, citotóxicas, anti-inflamatórias (LI et al., 2019a), inibidores de proteínas e indutores (XIE et al., 2019). Como o estudo de (LI et al., 2018) que isolou o fungo *A. versicolor* derivado da lama do mar da China, obtendo alcaloides, aspervesiamidas A-H, apresentando atividades anti-inflamatórias com efeito inibidor contra iNOS com valor de IC₅₀ de 5,39 µM.

Os fungos marinhos *Aspergillus* e *Penicillium* são grandes produtores de terpenóides e policetídeos LI et al. (2019) isolaram dois meroterpenóides polioxigenados, aperterpenos N e O e dois análogos de terretoninas A e G, do fungo *A. terreus* derivado da alga marinha *Laurencia okamurai*, coletada na costa de Qingdao, China. Os metabólitos aperterpenos apresentaram atividade inibitória contra a neuraminidase da influenza com valores de IC₅₀ 18 nM. E os metabólitos terretonina A e G apresentaram atividade antibacteriana contra

Micrococcus luteus e *S. aureus*, com valores de CIM de 32 e 8 µM/mL, respectivamente.

O fungo *Penicillium verruculosum* derivado da ascídia *Polycarpa aurata*, Indonésia, produziu dois novos merosesquiterpenos, verreculídeos A e B, inibidores da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) com valores de IC₅₀ entre 8,4 e 23,1 µM (YAMAZAKI et al., 2015). Um estudo semelhante feito por KONG et al. (2019) que isolaram quatro terpenóides indólicos, penerpenos A-D, também possuíram atividade inibitória contra a proteína tirosina fosfatase com IC₅₀ 18,8 µM, porém o fungo *Penicillium* sp. Foi isolado de um molusco bivalve, *Meretrix lusoria*, coletado em Haikou Bay, China.

Pesquisadores têm utilizados agentes modificadores epigenéticos com auxílio de análise de bioinformática dos *clusters* de genes que resulta em alterações significativas dos metabólitos secundários desenvolvendo novos compostos. Como no estudo de WANG et al. (2016b) que utilizaram da manipulação química epigenética aplicada ao fungo marinho *Aspergillus* sp. obtendo três novos sesquiterpenos do tipo eremofilano, dihidrobipolaroxina B, dihidrobipolaroxina C e dihidrobipolaroxina D e um análogo conhecido, dihidroploroxina. O cultivo foi tratado com inibidor de histona desacetilase (ácido suberohidroxâmico) e inibidor do DNA metiltransferase (5-azacitidina) exibindo inibição na produção de óxido nítrico sem efeitos citotóxicos.

Em um estudo mais recente de WU et al., (2020) utilizaram a mesma metodologia dos agentes epigenéticos, usando inibidores da desacetilase de histona e o inibidor da metiltransferase de DNA do fungo *A. versicolor*, isolado do tecido fresco da parte interna da gorgonia *D. gemmacea*, coletada no recife de coral da Ilha Xisha no mar da China. Obtendo dois novos derivados de nucleosídeos, kipukasins K e L que apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* com valores de CIM de 8-16 µg/mL e atividade anti-incrustante.

Um estudo antigo de MUKHERJEE, (2012) relata que o gênero *Trichoderma* também é produtor de metabólitos com atividade antimicrobiana incluindo pironas, terpenos, policetídeos e derivados de polipeptídios, produzindo mais de cem metabólitos. Apresentando atividade para infecção por

Candida sp. como ergoconina A agindo como inibidor da formação de glicanas na parede celular fúngica.

Com esforço para descobrir compostos naturais com aplicações terapêuticas e biológicas, pesquisadores também utilizaram fungos do gênero *Trichoderma* para isolar novos metabólitos. Como os estudos de REHMAN et al. (2020) que isolaram seis novos sorbicilinoídes (tricoreeseiona A e B, tricodermolida B, 13-hidroxitricodermolida, 24-hidroxi-tricodimerol e 15-hidroxi-bisvertinol). Sorbicilinoíde foi isolado pela primeira vez como uma impureza na penicilina. Esse composto possui atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, eliminação de radicais e antidiabéticos. Os novos compostos foram isolados do fungo *Trichoderma reesei* derivado do tecido fresco interno de uma esponja não identificada, coletada na China. A análise química demonstrou atividade citotóxica contra as linhas celulares A549, MCF-7 e HCT 116 com valores de IC₅₀ entre 5,1 e 13,7 µm/mL.

Pesquisadores, (SHI et al., 2020), também utilizaram manipulação química epigenética para produzir terpenóides do fungo *Trichoderma harzianum* derivado de um coral mole não identificado, coletado do recife de coral da Ilha Xisha no mar da China. Ao utilizar o inibidor de histona os compostos originais diterpenóides harziane foram transformados em sesquiterpenóides ciclonerano, produzindo três novos compostos. Um composto derivado de cleistantano diterpenóide, o ácido harzianólico; um harziane diterpenóide, o harzianona E e um sesquiterpeno cyclonerane, 3,7,11-tri-hidroxi-cycloneran. Foram realizadas atividades antibacterianas contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; e atividade antifúngica contra *C. albicans*, porém sem nenhuma atividade significativa.

7. CONCLUSÃO

As doenças infecciosas têm se tornado comum ao longo do tempo. Literatura recente vem demonstrando o aumento dos casos, a gravidade e complexidade das doenças. Atualmente, o uso de medicamentos sintéticos é utilizado nos tratamentos terapêuticos. No entanto, os efeitos colaterais são recorrentes e bastante prejudiciais ao ser humano, principalmente com o uso prolongado e de doses elevadas.

A revisão sistemática no período de 2015-2020 demonstrou um aumento na identificação de produtos naturais com ações antimicrobianas, produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus* (38%) e *Penicillium* (19%), tendo como principais estruturas os terpenóides e policetídeos. Como, por exemplo, a mariniafunginas B (61) onde seu valor de IC₅₀ teve um valor significativo frente aos agentes infecciosos.

Os experimentos apresentados nesta dissertação para investigar a potencialidade biotecnológica dos fungos marinhos revelaram a atividade antifúngica dos fungos filamentosos *Aspergillus ruber* e *Aspergillus flavus*. Os fungos estavam associados a invertebrados marinhos, esponja *Tedania ignis* e do coral *Palythoa variabilis*, presentes no litoral da costa do nordeste brasileiro, contra micro-organismos patogênicos. Apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Cryptococcus*.

Os resultados possibilitam um aprofundamento nos estudos farmacológicos das substâncias com potencial ativo biológico, já que muitas drogas comercializadas, como o fluconazol, vêm apresentando ineficácia nos tratamentos. Os resultados obtidos também permitem a continuidade e uma excelente perspectiva da continuidade dos estudos, tanto pelas substâncias ativas encontradas, que poderão futuramente ser isoladas e identificadas. E analisar também as atividades químicas e biológicas dos extratos fracionados. Dessa forma, é perceptível a riqueza dos compostos bioativos provenientes de fungos associados a invertebrados marinhos com capacidade antimicrobiana e suas vantagens futuras para uso contra patogenias humanas.

8. REFERÊNCIA

- ABRAMO, J. M. et al. Individuality in music performance. **Assessment & Evaluation in Higher Education**, v. 37, n. October, p. 435, 2012.
- ALBARANO, L. et al. Genome mining as new challenge in natural products discovery. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 1–17, 2020.
- ALTAMIRANO, S.; JACKSON, K. M.; NIELSEN, K. The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. **Bioscience reports**, v. 40, n. 10, p. 1–16, 2020.
- AMEND, A. et al. Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2019.
- APPRILL, A. The Role of Symbioses in the Adaptation and Stress Responses of Marine Organisms. **Annual Review of Marine Science**, v. 12, p. 291–314, 2020.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397–409, 2018.
- ARENDRUP, M. C. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight and Associated Tentative. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–10, 2017.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 3, p. S445–S451, 2017.
- ARIAS, M. et al. Preparations for invasion: Modulation of host lung immunity during pulmonary aspergillosis by gliotoxin and other fungal secondary metabolites. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–12, 2018.
- ARONSON, J. K. Antifungal drugs. **Side Effects of Drugs Annual**, v. 34, p. 427–439, 2012.

- AZANZA PEREA, J. R. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 3, p. 140–144, 2016.
- BARBERO, H.; DÍEZ-POZA, C.; BARBERO, A. The oxepane motif in marine drugs. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, 2017.
- BARBOSA, F. et al. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 1, 2020.
- BERGMANN, W. CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXIX. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. 1III.I SPONGOTHYIMIDINE AND SPONGOURIDINE. n. 1318, p. 1501–1507, 1955.
- BERLINCK, R. G. S. et al. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 510–522, 2004.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2020.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, n. 2, p. 144–222, 2012.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, n. 3, p. 235–294, 2017.
- BONN, R. F. et al. Metagenomic binning reveals versatile nutrient cycling and distinct adaptive features in alphaproteobacterial symbionts of marine sponges. **FEMS microbiology ecology**, n. April 2018, 2017.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. n. Table 1, 2016.
- CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2301–2317, 2010.

CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 2019.

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. The cAMP/protein kinase A pathway regulates virulence and adaptation to host conditions in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–15, 2019.

CHAABANE, F. et al. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

CHEN, Y. X. et al. Diverse secondary metabolites from the marine-derived fungus *Dichotomomyces cejpilii* F31-1. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, p. 3–15, 2017.

CHOUDHARY, A. et al. Current Status and Future Prospects of Marine Natural Products (MNPs) as Antimicrobials. **Marine Drugs**, v. 15, n. 9, p. 272, 2017.

CHOWDHARY, A. et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: Role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 891–899, 2018.

CHROUMPI, T.; MÄKELÄ, M. R.; DE VRIES, R. P. Engineering of primary carbon metabolism in filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. May, p. 107551, 2020.

COLLEMARE, J.; SEIDL, M. F. Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi: Is the picture complete? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 6, p. 591–607, 2019.

CORSI-VASQUEZ, G.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. *Candida auris*: What have we learned so far? **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 559–564, 2019.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

COTTIER, F.; HALL, R. A. Face/Off: The Interchangeable Side of *Candida*

Albicans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. January, 2020.

CUOMO, C. A.; RHODES, J.; DESJARDINS, C. A. Advances in cryptococcus genomics: Insights into the evolution of pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–7, 2018.

DAI, Y. et al. Peptides from the Soft Coral-associated Fungus *Simplicillium* sp. SCSIO41209. **Phytochemistry**, v. 154, n. February, p. 56–62, 2018.

DAYANAND, K. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2018.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

DIAZ, J. H. The Disease Ecology, Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Emerging *Cryptococcus gattii* Complex Infections. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 31, n. 1, p. 101–109, 2020.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada * Fungi preservation in distilled water *. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 6, p. 591–595, 2005.

ELNAGGAR, M. S. et al. Two new triterpenoids and a new naphthoquinone derivative isolated from a hard coral-derived fungus *Scopulariopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 116, p. 126–130, 2017.

FELÍCIO, R. DE; OLIVEIRA, A. L. L. DE; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39–42, 2012.

FERNANDES, K. E. et al. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule-Inducing Conditions. **mSphere**, v. 1, n. 6, p. 1–13, 2016.

FORZZA, R. C. et al. Os fungos do Brasil. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Vol. 1**, p. 43–48, 2010.

GABALDÓN, T.; FAIRHEAD, C. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal. **Current Genetics**, v. 65, n. 1, p. 93–98, 2019.

GABALDÓN, T.; GÓMEZ-MOLERO, E.; BADER, O. Molecular Typing of *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 755–764, 2020.

GABALDÓN, T.; NARANJO-ORTÍZ, M. A.; MARCET-HOUBEN, M. Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 6, p. 1–10, 2016.

GERSTEIN, A. C. et al. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. **mBio**, v. 6, n. 5, p. 1–14, 2015.

GONG, T. et al. Two new monoterpenoid α -pyrones from a fungus *Nectria* sp. HLS206 associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 6, p. 633–637, 2015.

GOZARI, M. et al. Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 112957, 2020.

GROSSART, H. P. et al. Fungi in aquatic ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 339–354, 2019.

GROSSMAN, N. T.; CASADEVALL, A. Physiological differences in *Cryptococcus neoformans* strains in vitro versus in vivo and their effects on antifungal susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1–33, 2017.

GROTTOLI, A. G. et al. Coral physiology and microbiome dynamics under combined warming and ocean acidification. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–22, 2018.

GURUCEAGA, X. et al. Fumagillin, a Mycotoxin of *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, biological activities, detection, and applications. **Toxins**, v. 12, n. 1, 2019.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus*

- gattii/Cryptococcus neoformans species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 2015.
- HEE-SOO PARK, SOO CHAN LEE, MARIA E. CARDENAS, J. H. Calcium-calmodulin-calcineurin signaling: A globally conserved virulence cascade in eukaryotic microbial pathogens. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 1570–1573, 2018.
- HUANG, G. et al. Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 6–16, 2019.
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. Figure 1, p. 72–80, 2019.
- JEFFERY-SMITH, A. et al. *Candida auris*: A review of the literature. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–18, 2018.
- JIN, L. et al. Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. **Marine drugs**, v. 14, n. 4, 2016.
- JÜTTE, R. et al. Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, n. June, p. 220–225, 2017.
- JUVVADI, P. R. et al. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 186–197, 2017.
- KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155–176, 2016.
- KAUSHIK, A.; KEST, H. The Role of Antifungals in Pediatric Critical Care Invasive Fungal Infections. **Critical Care Research and Practice**, v. 2018, 2018.
- KIM, S. et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

- KÖHLER, P.; CORNELLY, O. A.; VEHRESCHILD, J. J. Fungal infections. **Internist**, v. 60, n. 7, p. 684–689, 2019.
- KONG, F. D. et al. Penerpenes A-D, Four Indole Terpenoids with Potent Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activity from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. KFD28. **Organic Letters**, v. 21, n. 12, p. 4864–4867, 2019.
- KRISTANC, L. et al. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418–430, 2019.
- KRITIKOS, A. et al. Accuracy of Sensititre YeastOne echinocandins epidemiological cut-off values for identification of FKS mutant *Candida albicans* and *Candida glabrata*: a ten year national survey of the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 11, p. 1214.e1-1214.e4, 2018.
- KRÓL, J.; NAWROT, U.; BARTOSZEWICZ, M. Anti-candidal activity of selected analgesic drugs used alone and in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 2, p. 327–331, 2018.
- KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÓN, T. Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens. **Genes**, v. 9, n. 9, 2018.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2017.
- LAMOTH, F.; KONTOYIANNIS, D. P. The *Candida auris* alert: Facts and perspectives. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 4, p. 516–520, 2018.
- LAURITANO, C.; IANORA, A. Chemical Defense in Marine Organisms. **Marine drugs**, v. 18, n. 10, 2020.
- LEBLANC, E. V. et al. Structure-guided approaches to targeting stress responses in human fungal pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 42, p. 14458–14472, 2020.

- LEI, H. et al. Polyketide derivatives from a marine-sponge-associated fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. **Phytochemistry**, v. 142, p. 51–59, 2017.
- LI, F. et al. New cyclopiane diterpenes with anti-inflammatory activity from the sea sediment-derived fungus *Penicillium* sp. TJ403-2. **Chinese Chemical Letters**, v. 3, p. 6–10, 2019a.
- LI, H. et al. Asperversiamides, Linearly Fused Prenylated Indole Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 15, p. 8483–8492, 2018.
- LI, H. L. et al. Structure, absolute configuration and biological evaluation of polyoxygenated meroterpenoids from the marine algal-derived *Aspergillus terreus* EN-539. **Phytochemistry Letters**, v. 32, n. January, p. 138–142, 2019b.
- LIANG, T. M. et al. Secondary Metabolites Isolated from the Gorgonian-Derived Fungus *Aspergillus ruber* and Their Antiviral Activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 3, p. 559–561, 2018.
- LIONAKIS, M. S. Primary immunodeficiencies and invasive fungal infection: When to suspect and how to diagnose and manage. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 531–537, 2019.
- LIU, M. et al. Bioactive secondary metabolites from the marine-associated fungus *Aspergillus terreus*. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 525–530, 2018.
- LIU, N. et al. Structurally diverse sesquiterpenoids and polyketides from a sponge-associated fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO41301. **Fitoterapia**, v. 135, n. March, p. 27–32, 2019.
- LIU, Q. et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–62, 2017a.
- LIU, S. et al. New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4. **Natural Product Research**, v. 31, n. 14, p. 1682–1686, 2017b.
- LIU, Y. et al. Bisthiodiketopiperazines and Acorane Sesquiterpenes Produced

by the Marine-Derived Fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on Different Culture Media. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1294–1299, 2015.

LIU, Y. et al. New antifungal tetrahydrofuran derivatives from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. LS78. **Fitoterapia**, v. 146, n. May, p. 104677, 2020.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, 2017.

LOCKHART, S. R.; GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 177–181, 2019.

LOUREIRO, C. et al. Exploration and exploitation of the environment for novel specialized metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 206–213, 2018.

LYU, X. et al. efficacy and safety of nystatin for the treatment of oral candida. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1161–1171, 2016.

MA, X. et al. Speradines B-D, oxygenated cyclopiazonic acid alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus flavus* MXH-X104. **Tetrahedron**, v. 71, n. 21, p. 3522–3527, 2015.

MACHELEIDT, J. et al. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. September, p. 371–392, 2016.

MADA, P. K.; JAMIL, R. T.; ALAM, M. U. *Cryptococcus*. In: Treasure Island (FL): [s.n.].

MARTÍN, J. F. et al. Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: Impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, 2019.

MOHR, K. History of Antibiotics Research. **Assessment & Evaluation in Higher Education**, v. 37, n. October, p. 435, 2016.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary

metabolism in Trichoderma - A genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35–45, 2012.

MURSHID, S. S. A.; BADR, J. M.; YOUSSEF, D. T. A. Penicillosides A and B: New cerebrosides from the marine-derived fungus *Penicillium* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 29–33, 2016.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1443–1476, 2019.

NASCIMENTO, E. et al. *Cryptococcus neoformans* and *C. Gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: Antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. March, 2017.

NEVILLE, B. A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M. E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, p. 1–13, 2015.

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.

NILSSON, R. H. et al. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 95–109, 2019.

NOCUA-BÁEZ, L. C. et al. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 219–230, 2020.

NWEZE, J. A. et al. Antibiotics development and the potentials of marine-derived compounds to stem the tide of multidrug-resistant pathogenic bacteria, fungi, and protozoa. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, 2020.

OLIVEIRA ET AL. Brazilian Marine Microalgae and Cyanobacteria. **Molecules**, v. 25, p. 1–20, 2020.

PALARETI, G. et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of

results obtained in the DULCIS study. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

PANG, X. et al. Three new highly oxygenated sterols and one new dihydroisocoumarin from the marine sponge-derived fungus *Cladosporium* sp. SCSIO41007. **Steroids**, v. 129, n. December, p. 41–46, 2018.

PAPPAS, P. G. et al. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 409–417, 2015.

PAULINO, G. V. B. et al. Diversity of culturable yeasts associated with zoanthids from Brazilian reef and its relation with anthropogenic disturbance. **Marine Pollution Bulletin**, v. 123, n. 1–2, p. 253–260, 2017.

PAULINO, G. V. B.; FÉLIX, C. R.; LANDELL, M. F. Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 103–111, 2020.

PEIXOTO, R. S. et al. Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–16, 2017.

PENG, J. et al. Austalides S-U, new meroterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus aureolatus* HDN14-107. **Marine Drugs**, v. 14, n. 7, p. 1–9, 2016.

PERNICE, M. et al. Down to the bone: the role of overlooked endolithic microbiomes in reef coral health. **ISME Journal**, v. 14, n. 2, p. 325–334, 2020.

PFALLER, M. A. et al. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S79–S94, 2019.

PFALLER, M. A. . et al. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição**. [s.l: s.n.]. v. 22

POLLOCK, F. J. et al. Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis

- and cophylogeny. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.
- PRASAD, R. et al. The ABCs of *Candida albicans* multidrug transporter Cdr1. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1154–1164, 2015.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.
- QIN, C. et al. Sesquiterpenoids and xanthenes derivatives produced by sponge-derived fungus *Stachybotry* sp. HH1 ZSDS1F1-2. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 2, p. 121–125, 2015.
- RAMOS, L. S. et al. *Candida haemulonii* complex: Species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 111–115, 2015.
- RAMPONI, F. Drogas Antigúngicas. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.
- REHMAN, S. U. et al. Sorbicillinoid Derivatives From Sponge-Derived Fungus *Trichoderma reesei* (HN-2016-018). **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–10, 2020.
- REIS, L. Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2018.
- RENGASAMY, K. R. et al. Bioactive compounds in seaweeds: An overview of their biological properties and safety. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, n. September, p. 111013, 2020.
- ROBBINS, S. J. et al. A genomic view of the reef-building coral *Porites lutea* and its microbial symbionts. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2090–2100, 2019.
- ROHLFS, C.; BELEM, M. J. C. O Genero *Zoanthus* No Brasil. 1. Caracterizacao E Revisao Anatomica De *Zoanthus Sociatus* (Cnidaria, Zoanthinaria, Zoanthidae). **Iheringia Serie Zoologia**, v. 77, n. 77, p. 135–144, 1994.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On commensalism of candida. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27–30, 2020.

ROSADO, P. M. et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. **ISME Journal**, v. 13, n. 4, p. 921–936, 2019.

RUIZ-GAITÁN, A. et al. Detection and treatment of *Candida auris* in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 4, p. 295–305, 2019.

SANG, V. T. et al. **Coral and coral-associated microorganisms: A prolific source of potential bioactive natural products.** [s.l: s.n.]. v. 17

SCOPEL, M. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from the South Brazilian Coast. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 211–216, 2013.

SHI, T. et al. Terpenoids From the Coral-Derived Fungus *Trichoderma harzianum* (XS-20090075) Induced by Chemical Epigenetic Manipulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–12, 2020.

SILVA, L. N. et al. Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-*albicans* *Candida* species. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 7, p. 1–12, 2018.

SILVEIRA, C. B. et al. Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 4, p. 575–595, 2017.

SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2010.

SOUZA, M. V. N.; GONÇALVES, R. S. B.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L. . L.; C., C. H. DA. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer Natural Products in Advance Clinical Trials Applied

to Cancer. **Revista Fitos**, v. 3, p. 25–42, 2007.

SPARROW, F. K. **Ecology of freshwater fungi**. [s.l: s.n.].

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 1023–1052, 2016.

SWEET, M. J.; BULLING, M. T. On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n. January, p. 1–11, 2017.

TAKAHASHI, J. A.;* LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVAHUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Artigo Fungos Filamentosos e Química : Velhos Conhecidos , Novos Aliados Fungos Filamentosos e Química : Velhos Conhecidos , Novos Aliados Jacqueline A . Takahashi , a , * Gesiane da S . Lima , a Gabriel F . dos Santos , a. v. 9, n. 6, 2017.

TAKEMOTO, K.; KANAZAWA, K. AmBisome: relationship between the pharmacokinetic characteristics acquired by liposomal formulation and safety/efficacy. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 3, p. 186–194, 2017.

TAN, X. et al. Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dyosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5929, 2018.

TELES, A. M. et al. Triagem fitoquímica de extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2020.

TIMMERMANS, B. et al. Adhesins in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 1–16, 2018.

TORTORELLA, E. et al. Antibiotics from deep-sea microorganisms: Current discoveries and perspectives. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 1–16, 2018.

VERDES, A.; HOLFORD, M. Beach to Bench to Bedside: Marine Invertebrate Biochemical Adaptations and Their Applications in Biotechnology and Biomedicine. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 65, p. 359–376,

2018.

WANG, C. Y. et al. Antifouling phenyl ethers and other compounds from the invertebrates and their symbiotic fungi collected from the South China Sea. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016a.

WANG, L. et al. Eremophilane sesquiterpenes from a deep marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. SCSLOW2, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents. **Molecules**, v. 21, n. 4, 2016b.

WANG, Z. A.; LI, L. X.; DOERING, T. L. Wall and capsule. **Glycobiology**, v. 28, n. 10, p. 719–730, 2018.

WATKINS, R.; KING, J.; JOHNSTON, S. Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 65, 2017.

WEBSTER, N. S.; REUSCH, T. B. H. Microbial contributions to the persistence of coral reefs. **ISME Journal**, v. 11, n. 10, p. 2167–2174, 2017.

WU, J. S. et al. Epigenetic Agents Trigger the Production of Bioactive Nucleoside Derivatives and Bisabolane Sesquiterpenes From the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–9, 2020.

XIE, C. L. et al. Metabolomic investigations on *nesterenkonia flava* revealed significant differences between marine and terrestrial actinomycetes. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, 2018.

XIE, C. L. et al. Andrastone A From the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium allii-sativi* Acts as an Inducer of Caspase and RXR α -Dependent Apoptosis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. October, p. 1–7, 2019.

XU, L. et al. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3479–3513, 2015.

YAMAZAKI, H. et al. Verruculides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from an Indonesian ascidian-derived *Penicillium verruculosum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p.

3087–3090, 2015.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

ZHANG, J. et al. DMOA-based meroterpenoids with diverse scaffolds from the sponge-associated fungus *Penicillium brasilianum*. **Tetrahedron**, v. 75, n. 14, p. 2193–2205, 2019a.

ZHANG, M. Q. et al. Sordarin Diterpene Glycosides with an Unusual 1,3-Dioxolan-4-one Ring from the Zoanthid-Derived Fungus *Curvularia hawaiiensis* TA26-15. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 9, p. 2477–2482, 2019b.