

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Micro-organismos marinhos como fonte de metabólitos bioativos: atividade anti-
Trichomonas vaginalis, antibiofilme e antibacteriana

FRANCIANE RIOS SENGER

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Micro-organismos marinhos como fonte de metabólitos bioativos: atividade anti-
Trichomonas vaginalis, antibiofilme e antibacteriana

Dissertação apresentada por **Franciane
Rios Senger** para a obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dr^a. Tiana Tasca
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2016, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr Marilise Brittes Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Karine Rigon Zimmer
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rios Senger, Franciane
Micro-organismos marinhos como fonte de
metabólitos bioativos: atividade anti-Trichomonas
vaginalis, antibiofilme e antibacteriana / Franciane
Rios Senger. -- 2016.
127 f.

Orientadora: Tiana Tasca.
Coorientador: Alexandre José Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Fungos marinhos. 2. Atividade anti-Trichomonas
vaginalis. 3. Atividade antibiofilme. 4. Atividade
antibacteriana. I. Tasca, Tiana, orient. II. Macedo,
Alexandre José, coorient. III. Título.

Aos meus amores, Ival, Cleci, Ian e Diego,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos queridos professores Dra. Tiana Tasca e Dr. Alexandre José Macedo, minha gratidão pela oportunidade de realizar mestrado. Vocês são exemplos de profissionais competentes, dedicados e éticos que levarei para sempre em coração. Obrigado pela confiança depositada e além de tudo pela amizade incondicional.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana Amanda, Brenda, Camila, Dariana, Fernanda, Graziela, Lúcia, Márcia, Mariana Dias, Nicolas, Odelta, Patrícia, Ana, Anelise, Danielle, Flavia, Laura, Mariana Paz, Muriel, Sharon e em especial Rodrigo. Agradeço muito pela amizade, carinho, companheirismo, por sempre estarem ao meu lado nas comemorações e frustrações. Com toda certeza são amigos que levarei para a vida.

À Capes pelo auxílio financeiro e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À todos os colaboradores que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus amados pais Ival e Cleci, pelo apoio em todas as etapas da minha vida, guiando meus passos e por não medirem esforços para tornar meus sonhos realidade. Vocês são um exemplo na minha vida, não existem palavras para descrever o amor que sinto por vocês. A minha mãezinha, por sempre ter me apoiado e amado em todos os momentos, meu agradecimento especial, seu amor ficará para sempre dentro do meu coração.

Ao meu amor, Diego, por fazer parte da minha vida e permanecer ao meu lado em todos os momentos, sempre com muito carinho e dedicação.

Ao meu irmão querido, pelo amor, amizade, carinho, sempre alegrando meus dias.

Aos meus avós João e Iria e minha tia do coração Dulci pelo exemplo de vida e amor. Obrigado pela paciência, compreensão, por serem tão maravilhosos.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram um agradecimento especial.

A todos os meus familiares que me incentivaram a tornar essa jornada realidade.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Nos últimos anos, os metabólitos isolados de fungos marinhos vêm ganhando considerável atenção em razão de possuírem estruturas químicas únicas com diversas atividades biológicas já descritas, incentivando novas pesquisas na área. A tricomoníase é a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo, estando associada a sérias consequências à saúde, sendo relatado um aumento no número de isolados clínicos resistentes ao tratamento de escolha. Infecções causadas por bactérias com diferentes mecanismos de resistência, representam um grande desafio para a saúde pública atual, acarretando em altas taxas de mortalidade e morbidade. As bactérias patogênicas dispõem de fatores de virulência, como a formação de biofilme, que agravam infecções tornando-as persistentes. Devido ao potencial biológico dos produtos de origem marinha e a importância dessas infecções, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*T. vaginalis*, antimicrobiana e antibiofilme de moléculas obtidas da fermentação de fungos associados a organismos marinhos. As 14 cepas fúngicas foram isoladas de esponjas e corais marinhos, obtidos da costa do estado de Alagoas, Brasil. Após produção do metabólito, o micélio foi separado do meio. O micélio foi extraído com metanol e o meio com acetato de etila. As frações foram submetidas aos ensaios de atividade anti-*T. vaginalis*, antimicrobiana e antibiofilme (inibição da formação e erradicação). As frações que demonstraram atividade foram submetidas ao ensaio de hemólise, avaliação da citotoxicidade (HMVII e Vero) e toxicidade em modelo de *Galleria mellonella*. A fração que demonstrou os melhores resultados nos ensaios de atividade foi submetida ao fracionamento bioguiado. As frações orgânicas dos fungos *Aspergillus niger* (FMPV 03) e complexo *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* (FMPV 09) foram ativas frente ao *T. vaginalis* ATCC 30236, com valores de MIC de 2 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. Quando investigadas, essas frações mantiveram a atividade frente ao isolado clínico resistente ao metronidazol (TV-LACM2R), apresentado os mesmo valores de MIC encontrados para o isolado ATCC. Para a atividade antimicrobiana, as frações orgânicas do *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), complexo *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* (FMPV 09) e *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) foram ativas contra *S.*

epidermidis ATCC 35984. Ainda, frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 somente as frações orgânicas do *Aspergillus niger* (FMPV 03) e *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06) demonstraram atividade. Neste ensaio, para ambas as bactérias, os valores de MIC não ultrapassaram 1,5 mg/mL. A atividade destas frações também foi observada frente às mesmas bactérias no ensaio de antif formação de biofilme, já que ocorreu a morte das células. A habilidade de erradicar biofilmes foi detectada somente para a fração orgânica do fungo *Aspergillus flavus* (FMPV 01), o qual foi capaz de remover 52% do biofilme já formado de *S. epidermidis* ATCC 35984. A ausência de hemólise dos eritrócitos foi observada em todas as frações ativas estudadas. Na avaliação da citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens celulares HMVII e Vero, apenas a fração orgânica do *Aspergillus niger* (FMPV 03), não apresentou efeito citotóxico. No entanto, no ensaio de avaliação da toxicidade *in vivo*, nenhuma das amostras testadas causou redução na sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. Então, a fração orgânica do fungo *Aspergillus niger* (FMPV 03) foi submetida ao fracionamento bioguiado utilizando coluna RP-18. Sete frações foram obtidas, sendo que a primeira (100% água), foi ativa contra *T. vaginalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Quando submetida à Cromatografia em Camada Delgada (CCD), demonstrou quatro bandas que foram coradas com anisalaldeído-ácido sulfúrico e ninhidrina. Além disso, a fração 100% água não demonstrou redução da sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*, nas três concentrações testadas. Portanto, a gama de atividades relatadas corrobora o potencial dos fungos marinhos na produção de moléculas bioativas.

Palavras-chave: Fungos marinhos, atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, atividade antimicrobiana, atividade antibiofilme.

ABSTRACT

In recent years, the isolated metabolites from marine fungi have been attracted considerable attention due to unique chemical structures with diverse biological activities, encouraging further research in the area. Trichomoniasis is the most prevalent non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide. This has been linked to serious health consequences and an increase in the number of clinical isolates resistant to the treatment of choice has been reported. Infections caused by bacteria with different resistance mechanisms represent a major challenge to the current public health, resulting in high rates of mortality and morbidity. Pathogenic bacteria present virulence factors, such as biofilm formation, which might enhance the persistence of infections. Due to the biological potential of marine products and the importance of these infections, the aim of this study was to evaluate the anti-*T. vaginalis*, antimicrobial and antibiofilm activities of the obtained molecule from the fermentation of fungi associated with marine organism. The 14 fungal strains were isolated from sponges and corals marine obtained from the coast of Alagoas, Brazil. After production of the metabolite the mycelium was separated from the medium. The mycelium was extracted with methanol and the medium with ethyl acetate. The fractions were subjected to the assays anti-*T. vaginalis*, antimicrobial and antibiofilm (inhibition of the formation and eradication) activities. The fractions that showed activity were subjected to the assays of hemolysis, cytotoxicity evaluation (HMVII and Vero) and toxicity *Galleria mellonella* model. The fraction which showed the best results in activity assays was subjected to fractionation bioguided. The organic fraction of *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) were active against *T. vaginalis* ATCC 30236 with MIC values of 2 mg/mL and 1 mg/mL, respectively. When investigated, these fractions maintained activity against resistant clinical isolate to metronidazole (TV-LACM2R), presented the same MIC values found to isolate ATCC. For the antimicrobial activity, the organic fractions of *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) and *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) were active against *S. epidermidis* ATCC 35984. Even, against *P. aeruginosa* ATCC 27853 only the organic fractions of *Aspergillus*

niger (FMPV 03) and *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06) demonstrated activity. In this test, for both bacteria, MIC values did not exceed 1.5 mg/mL. The activity of these fractions was also observed across the same bacteria in the antibiofilm formation assay, since cell death occurred. The ability to eradicate biofilms was detected only for the organic fraction of the fungus *Aspergillus flavus* (FMPV 01) which was able to remove 52% of the already formed biofilm of *S. epidermidis* ATCC 35984. The absence of hemolysis of red cells was observed in all active fractions studied. In the assessment of cytotoxicity *in vitro* against the cell lines HMVII and Vero, only the organic fraction of *Aspergillus niger* (FMPV 03), showed no cytotoxic effect. However, in the test evaluation of *in vivo* toxicity, none of the samples tested caused a reduction in the survival of the larvae of *Galleria mellonella*. Then, the organic fraction of the fungus *Aspergillus niger* (FMPV 03) was submitted to bioguided fractionation using RP-18 column. Seven fractions were obtained, of which the first (100% water), was active against *T. vaginalis*, *S. epidermidis* e *P. aruginosa*. When subjected to thin layer chromatography (TLC) showed four bands were stained with ninhydrin and anisaldehyde-sulfuric acid. In addition, 100% water fraction showed no reduction of the survival of larvae of *Galleria mellonella* at the three concentrations tested. Therefore, the range of activities reported corroborates the potential of marine fungi to produce bioactive molecules.

Keywords: Marine-associated fungi, anti-*Trichomonas vaginalis* activity, antimicrobial activity, antibiofilm activity.

SUMÁRIO

I. Introdução	17
II. Estado da Arte.....	21
II.1 Produtos naturais	23
II.1.1 Produtos naturais de origem marinha	23
II.1.2 Organismos marinhos e micro-organismos associados	25
II.1.2.1 Fungos marinhos: generalidades e composto bioativos.....	28
II.2 <i>Trichomonas vaginalis</i>	30
II.2.1 Tricomoníase.....	32
II.3 Infecções bacterianas e biofilmes patogênicos	34
II.3.1 Importância clínica das infecções associadas ao biofilme.....	39
II.3.2 Bactérias de importância médica formadoras de biofilme	41
II.3.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	41
II.3.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
II.3.3 Estratégias de combate a biofilmes.....	42
III. Objetivos	45
IV. Artigos Científicos	49
IV. CAPÍTULO 1 – Anti - <i>Trichomonas vaginalis</i> , antibiofilm and antimicrobial activities of bioactive metabolites produced by marine-associated fungi.....	51
IV. CAPÍTULO 2 – Anti - <i>Trichomonas vaginalis</i> and antimicrobial activities from metabolites of marine-associated <i>Aspergillus niger</i> fungus.....	75
V. Discussão Geral.....	89
VI. Conclusões Gerais.....	101
VII. Perspectivas	105
VIII. Referências.....	109
IX. Anexos	121
IX. 1 Licenças para uso das figuras	123

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre, possuindo uma diversidade biológica inestimável. Em diversos ecossistemas, como em recifes de corais e no fundo do mar, estima-se que essa diversidade biológica seja ainda maior do que em florestas tropicais (Ebada et al., 2008).

A associação de micro e macro-organismos é uma característica promissora dos ecossistemas marinhos. Muitos invertebrados marinhos podem conter diversos micro-organismos, como fungos e bactérias, vivendo em simbiose. Acredita-se que os metabólitos secundários marinhos que são frequentemente isolados sejam produzidos por esses micro-organismos marinhos associados (Konig et al., 2006).

O potencial para produção de metabólitos bioativos por fungos já foi provado há diversos anos quando, em 1928, Alexandre Flemming descobriu a penicilina produzida por fungos do gênero *Penicillium*, a qual resultou no tratamento de diversas infecções bacterianas (Kjer et al., 2010).

Os produtos naturais de origem marinha, especialmente os produzidos por fungos marinhos, despertam um grande interesse devido às suas estruturas únicas e diversas atividades biológicas já descritas, podendo-se destacar, atividade antitumoral, antibacteriana, antioxidante, antiviral, antiinflamatória e antiprotozoária (Mayer e Hamann, 2005; Rateb e Ebel, 2011; Chen et al., 2014; Blunt et al., 2015).

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado que parasita o trato urogenital humano, sendo o agente etiológico da tricomoníase a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo (WHO, 2012). A doença está associada a sérias consequências à saúde as quais incluem predisposição ao câncer cervical e de próstata, complicações na gravidez, infertilidade, atuando, ainda, como um cofator na aquisição e transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Sorvillo et al., 2001; Van Der Pol et al., 2008). Dois fármacos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da tricomoníase, o metronidazol e o tinidazol (Helms et al., 2008). No entanto, o número de isolados de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol vem aumentando, requerendo novas alternativas para o tratamento desta doença negligenciada (Sobel et al., 1999; Secor et al., 2014).

As doenças infecciosas são as principais causas de morte no mundo (Rasko e Sperandio, 2010), sendo que altas taxas de mortalidade estão relacionadas a infecções causadas por bactérias, ressaltando a importância da pesquisa de novas moléculas com atividade antibiótica.

De acordo com o *National Institutes of Health* aproximadamente 80% das infecções humanas são associadas a biofilmes bacterianos, especialmente os que envolvem biomateriais. Biofilmes são agregados bacterianos complexos que vivem aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, cobertos por uma matriz exopolimérica composta de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A formação de biofilme é um processo chave na sobrevivência em diversos ambientes, representando um modo de crescimento protegido, já que permite que as células sobrevivam a ambientes hostis e também se dispersem para colonizar novas superfícies, estando relacionado à persistência das infecções (Macedo e Abraham, 2009; Wu et al., 2015). Nesse sentido, sabe-se que a formação de biofilmes agrava uma série de infecções, tornando-as muitas vezes persistentes. Dessa forma, a busca por moléculas que possam inibir a adesão bacteriana e formação de biofilme são de grande importância e também uma alternativa aos antibióticos que já não são capazes de eliminar todas as infecções hospitalares.

II. Estado da Arte

II.1 Produtos naturais

Desde a pré-história o homem tem utilizado produtos naturais para tratar diversos problemas de saúde. Há registros da utilização de plantas com fins medicinais na Mesopotâmia, cerca de 2600 anos a.C. Dentre as plantas utilizadas estavam *Cedrus*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora myrrha* e *Papaver somniferum*, as quais, ainda hoje, são utilizadas para o tratamento de doenças como: tosses, resfriados, infecções parasitárias e inflamação (Newman et al., 2000; Halberstein, 2005; Gurib-Fakim, 2006).

Produtos naturais são fontes de diversas moléculas funcionalmente relevantes, devido à imensa variedade de metabólitos secundários provenientes de espécies microbianas e plantas. Apesar do grande número de moléculas derivadas de química combinatória, atualmente os produtos naturais continuam demonstrando um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Cerca de 35% das drogas aprovadas são provenientes de produtos naturais ou derivados semi-sintéticos (Ngo et al., 2013).

O ambiente marinho apresenta uma enorme biodiversidade e isso reflete na variedade de metabólitos secundários encontrados em animais marinhos, plantas e micro-organismos (Konig et al., 2006).

II.1.1 Produtos naturais de origem marinha

Os oceanos constituem uma rica diversidade química e biológica, contendo aproximadamente 230.000 espécies marinhas já descritas (*World Register of Marine Species - WoRMS*), cobrindo mais de 70% da superfície terrestre (Simmons et al., 2005). O Brasil possui mais de 7.000 km de costa marítima (IBGE), constituindo uma reserva de moléculas a serem descobertas.

O crescimento do interesse pelos organismos marinhos nas últimas cinco décadas, levou a descoberta de um número surpreendente de novas estruturas com atividades diversas (Saleem et al., 2007).

Na década de 50, Bergmann e Feeney (1951) isolaram os nucleosídeos esponouridina (Figura 1a) e espongotimidina (Figura 1b), a partir da esponja *Cryptotethya crypta*. Mais tarde, em estudo de análogos sintéticos dessas substâncias chegou-se ao desenvolvimento do agente antiviral vidarabina (ARA-A) (Figura 1c) e do agente anticâncer citarabina (ARA-C) (Figura 1d), sendo os primeiros produtos marinhos a atingirem o mercado para uso clínico.

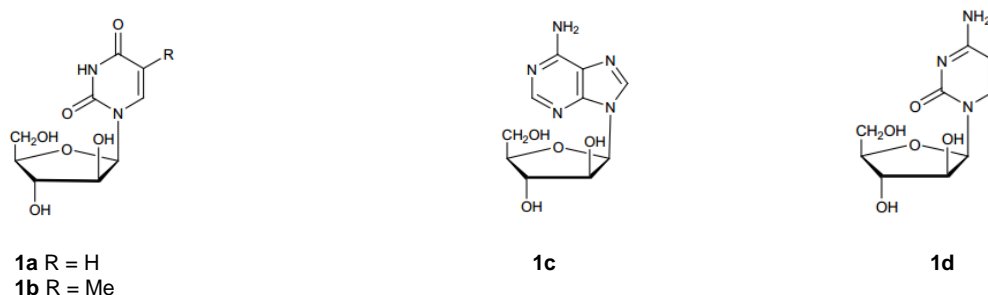


Figura 1: a Estrutura da esponouridina, b Estrutura da espongotimidina, c Vidarabina e d Citarabina.

O ziconotídeo, aprovado pelo FDA, é um equivalente sintético de um peptídeo isolado originalmente a partir do caracol marinho *Conus magus*. O ziconotídeo é um potente analgésico utilizado para o tratamento da dor na medula espinhal (Williams et al., 2008; Mayer et al., 2010).

A trabectedina é um produto natural marinho isolado de *Ecteinascidia turbinata*, um tunicato encontrado no mar Mediterrâneo e Caribenho. A trabectedina é um alcaloide hidroisoquinolina e foi o primeiro agente anticâncer marinho aprovado na União Europeia para doentes com sarcoma de tecido mole (Rinehart et al., 1990; Wright et al., 1990; Verweij, 2009).

Isolada em 1986, a halicondrina B foi obtida da esponja *Halichondria okadae*, sendo completamente sintetizada em 1992. Foi realizada a síntese de seu análogo, mesilato de eribulina, sendo utilizado em ensaios contra câncer metastático de mama, o qual foi aprovado em 2010 para uso clínico (Aicher et al., 1992; Jain e Vahdat, 2011; Preston e Trivedi, 2012).

Nas últimas décadas, cerca de 20.000 novos compostos de origem marinha foram descritos. Uma grande fração desses metabólitos foi isolada de espécies de invertebrados marinhos, que consistem em cerca de 50% de toda biodiversidade marinha não microbiana existente nos oceanos. Embora diversos compostos com atividade tenham sido isolados de invertebrados

marinhos, existe a necessidade de estar constantemente fornecendo biomassa animal, podendo ocorrer variação do metabólito extraído. A utilização de micro-organismos marinhos torna-se uma alternativa vantajosa quando comparada aos invertebrados marinhos, devido à possibilidade de realização de processos fermentativos, facilitando a obtenção dos metabólitos em maior quantidade (Bugni e Ireland, 2004; Leal et al., 2014).

II.1.2 Organismos marinhos e micro-organismos associados

Os oceanos possuem uma grande biodiversidade de organismos e esse compartilhamento de ambiente permitiu que no processo evolutivo ocorresse a criação de associações bem equilibradas entre os organismos. Um exemplo dessas associações são as esponjas que hospedam um microbioma que pode atingir de 40-60% da sua biomassa total e densidades de 10^8 a 10^{10} bactérias por grama de peso da esponja (Graca et al., 2013).

Essa grande quantidade de organismos vivendo no mesmo ambiente fez com que estes desenvolvessem estratégias de sobrevivência para competir por espaço e alimento. Nutrientes, luz, correntes marinhas e temperatura representam componentes limitantes adicionais no crescimento, aumentando ainda mais a concorrência. Como resultado dessa competição, muitas espécies evoluíram rotas químicas para se defender contra a predação ou crescimento excessivo de espécies competidoras. Esta adaptação química produzida pelos organismos é chamada de metabólitos secundários, estes incluem os terpenoides, alcaloides, policetídeos, derivados do ácido chiquímico, esteroides e uma mistura de metabólitos de biogênese (Simmons et al., 2005).

Invertebrados marinhos (esponjas e corais, por exemplo) podem conter bactérias e fungos associados. Acredita-se que os metabólitos secundários marinhos são produzidos por esses micro-organismos que vivem em associação (Konig et al., 2006).

As esponjas (Filo Porifera) estão entre os mais antigos animais multicelulares (metazoários). Já foram descritas mais de 8.000 espécies de esponjas que habitam uma grande variedade de ecossistemas marinhos e de água doce, sendo encontradas em todas as regiões tropicais, temperadas e polares. As esponjas são organismos invertebrados sésseis, a presença e

abundância de espículas é variável: algumas espécies (por exemplo, das ordens *Lithistida* e *Astrophorida*) têm esqueletos siliciosos densos ou fundidos e, portanto, uma consistência dura, enquanto que outras espécies têm poucas ou nenhuma espícula, faltando, assim, defesas físicas. Estas últimas espécies evoluíram e possuem defesas químicas contra predadores e organismos indesejáveis (Laport et al., 2009).

As esponjas possuem uma estrutura com uma única camada de células flageladas (coanócitos) que promovem a circulação de água através de um sistema de canais que é fundamental para sua fisiologia, já que é através destes que são realizadas todas as trocas de materiais entre a esponja e o ambiente (Brusca e Brusca, 2007). Pela presença de um sistema aquífero, as esponjas constituem um ambiente ideal para os micro-organismos simbiotes (Li, 2009).

Segundo Blunt et al., (2015) as esponjas e seus micro-organismos associados são os maiores contribuintes de produtos naturais de origem marinha. Os autores avaliaram o número anual de publicações de novos compostos isolados de produtos naturais marinhos para cada filo nos últimos 50 anos, como demonstra a figura 02.

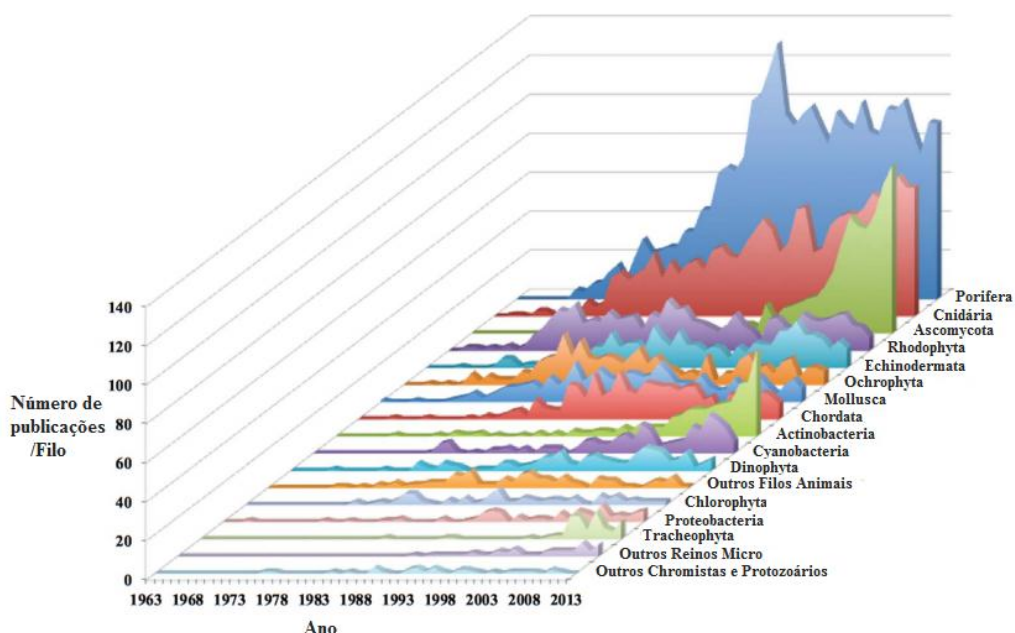


Figura 02. Publicações de compostos isolados de produtos naturais marinhos para cada filo desde 1963, adaptado de Blunt et al. (2015).

O filo Cnidária inclui organismos que estão entre os mais venenosos. Pertencente a este filo, a classe Anthozoa compreende anêmonas, corais com esqueleto calcário, corais moles e canetas do mar (Frazao et al., 2012).

Os corais também possuem micro-organismos vivendo de forma simbiótica. A bioatividade exibida por estes micro-organismos simbióticos é diversa e proporcionou ligações promissoras para a descoberta de moléculas com atividade, como, por exemplo, citotoxicidade, atividade antibiótica e atividade contra linhagens celulares de câncer humano (Rocha et al., 2011).

Os tecidos dos corais, o esqueleto e a camada de muco (Figura 03) contém uma população diversificada de micro-organismos, que conferem diversos benefícios para o hospedeiro como o suporte para nutrição do coral e a proteção contra patógenos (Leal et al., 2013).

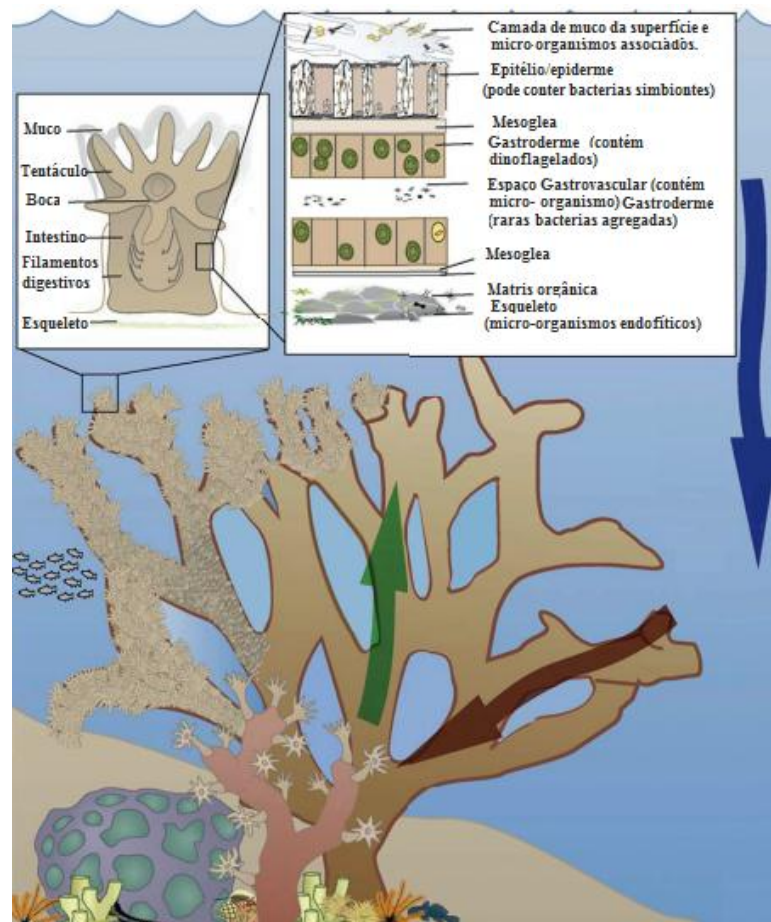


Figura 03. Diversidade da estrutura de corais marinhos. Adaptado de Leal et al. (2013).

II.1.2.1 Fungos marinhos: generalidades e composto bioativos

O Reino Fungi é o segundo maior grupo de organismos distribuído na natureza. Acredita-se que existam cerca 1,5 milhões de espécies fúngicas. Os fungos são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no gelo da Antártica, regiões tropicais, latitudes médias e extremo norte. Habitam o solo, a água doce, a superfície de rochas e a água do mar. Parasitam plantas, peixes, insetos e mamíferos, ou seja, praticamente todos os organismos vivos (Feofilova, 2001; Hawksworth, 2001).

Os fungos marinhos possuem grande potencial devido à diversidade dos metabólitos secundários produzidos com propriedades biológicas e farmacológicas promissoras. Estão divididos em dois grupos: obrigatórios e facultativos. Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente no ambiente marinho, já os facultativos são aqueles que a partir da água doce ou do meio terrestre são capazes de crescer e possivelmente esporular em ambiente marinho. Os fungos marinhos foram obtidos a partir de praticamente todos os habitats marinhos, dentre eles: matéria orgânica (solo, sedimentos, habitats de areia, substratos artificiais e colunas de água), comunidades microbianas marinhas, plantas marinhas (algas, ervas marinhas, etc), invertebrados marinhos (esponjas e corais, principalmente) e vertebrados marinhos (peixes). Uma das maiores limitações para a obtenção de metabólitos desses fungos deve-se ao fato de menos 1% destes serem cultiváveis fora do ambiente marinho (Kohlmeyer e Volkmann-Kohlmeyer, 1991; Rateb e Ebel, 2011).

Estima-se que existam de 7.000-10.000 espécies de fungos marinhos (Jones, 2011). Jones et al. (2009) relataram que existem 530 espécies de fungos marinhos obrigatórios, em 321 gêneros que incluem 424 espécies de Ascomycetos (251 gêneros), 94 espécies de fungos anamórficos (61 gêneros), e 12 espécies de Basidiomicetos (9 gêneros).

Muitos dos fungos isolados do ambiente marinho pertencem a gêneros bem conhecidos na superfície terrestre, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma* e *Fusarium*. Acredita-se que esse fato deve-se à adaptação fúngica ao ambiente marinho (Abraham e Loder, 1972; Proksch et al., 2008).

Fungos marinhos possuem um potencial promissor como fonte de novos produtos naturais bioativos devido à diversidade química de seus metabólitos. Podem-se destacar as atividades antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiprotozoária, antifúngica, antiproliferativa e anticolinesterásica (Saleem et al., 2007; Rateb e Ebel, 2011; Blunt et al., 2015; Wang et al., 2015).

O mais famoso derivado de fungo marinho isolado foi a cefalosporina C, obtida na década de 40, do fungo *Cephalosporium acremonium*, a partir de amostras do mar da região de Sardenha (Itália). Esta molécula foi precursora de um grupo de antibióticos (cefalosporinas) amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas (Abraham e Loder, 1972).

As publicações de novos compostos de fungos de origem marinha vêm se desenvolvendo (Figura 04), no entanto, ainda possuem um grande potencial futuro (Bugni e Ireland, 2004).

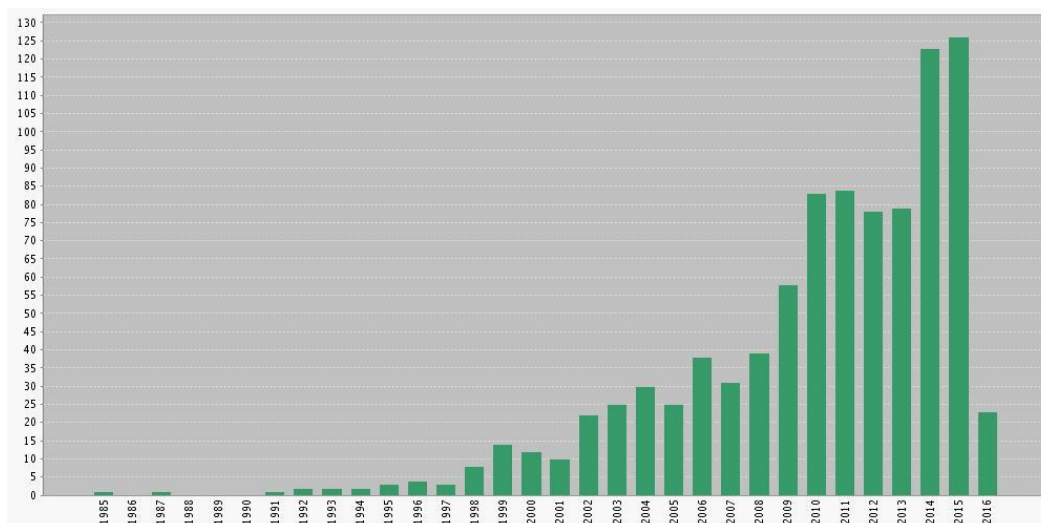


Figura 04. Publicações até março 2016 de compostos oriundos de fungos marinhos. (Dados disponíveis em Web of Science: <https://apps.webofknowledge.com/>).

Nos últimos anos, uma diversidade de compostos vem sendo isolados de fungos associados a organismos marinhos (figura 05), estes incluem terpenóides, alcalóides, policetídeos, peptídeos, derivados do ácido chiquímico, esteroide, dentre outros (Graca et al., 2013).

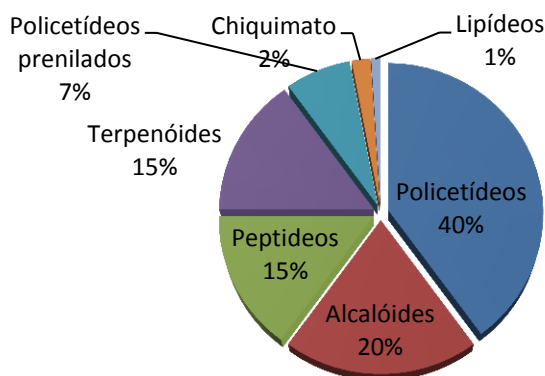


Figura 05: Novos compostos derivados de fungos marinhos até meados de 2010, divididos por tipos estruturais/bioquímicos. Adaptado de Rateb e Ebel, (2011).

Os policetídeos são os principais produtos isolados de fungos marinhos. Eles compreendem uma grande família estruturalmente diversa, sendo responsáveis por muitas das atividades atribuídas aos metabólitos secundários desses micro-organismos (Saleem et al., 2007).

O potencial na produção de biomoléculas por fungos de origem marinha e a extensão e riqueza da costa Brasileira, representam um campo promissor no descobrimento de moléculas com atividades biológicas, estimulando novas pesquisas com fungos derivados de organismos marinhos.

II.2 *Trichomonas vaginalis*

O protozoário *Trichomonas vaginalis* pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina e tem a capacidade de parasitar o trato geniturinário humano causando a tricomoníase (Schwebke e Burgess, 2004).

Tipicamente, em culturas axênicas o parasito apresenta forma piriforme, elipsoide ou oval, no entanto, quando aderido às células epiteliais vaginais (CEVs) adquire a forma ameboide. Como outros tricomonádídeos, o parasito apresenta apenas a forma trofozoítica, sem forma cística (Figura 06) (Petrin et al., 1998). Condições físico-químicas como: pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica podem afetar sua forma. É um protozoário muito

plástico, podendo formar pseudópodes para capturar alimentos e fixar-se em superfícies sólidas (Honigberg e Brugerolle, 1990). Em relação ao tamanho, mede em torno de 9,7 µm de comprimento e 7,0 µm de largura. Possui cinco flagelos, sendo quatro localizados na região anterior e o quinto incorporado à membrana ondulante. O núcleo localiza-se próximo à extremidade anterior, apresentando uma dupla membrana nuclear. O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina que se projeta a partir da pelta através do centro do trofozoíto, estendendo-se até a outra extremidade da célula. O complexo pelta-axóstilo pode participar do processo de divisão celular e promover a sustentação do trofozoíto (Benchimol, 2004). Nos tricomonádídeos ocorre a ausência de mitocôndria, porém, o parasito apresenta hidrogenossomos. Estes são grânulos densos que possuem função metabólica semelhante à mitocôndria, sendo que receberam este nome por produzirem hidrogênio molecular como produto final do metabolismo (Muller, 1993; Benchimol, 2009).

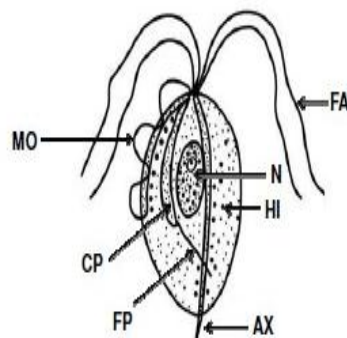


Figura 6: Aspectos morfológicos de trofozoítos de *T. vaginalis*. MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, AX: axóstilo, HI: hidrogenossomo, N: núcleo, FA: flagelos anteriores livres. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>

T. vaginalis necessita de diversos nutrientes para sua sobrevivência, dentre eles carboidratos, lipídeos, nucleotídeos púricos e pirimidínicos, ácidos graxos, vitaminas e sais inorgânicos. Os carboidratos são a principal fonte de energia, tendo seu metabolismo fermentativo sob duas condições: anaeróbica e aeróbica, sendo realizadas no citoplasma e nos hidrogenossomos (Mack e

Müller, 1980; Muller, 1988). Nos casos de limitação de carboidratos os aminoácidos realizam a manutenção da sobrevivência e crescimento do parasito, que necessita principalmente de arginina, havendo, ainda, os aminoácidos treonina, leucina e metionina que são utilizados na produção de energia (Petrin et al., 1998). O metabolismo lipídico de *Trichomonas vaginalis* inclui colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline, no entanto, o trofozoíto é incapaz de sintetizar ácidos graxos e esteroides, dependendo de formas exógenas (Beach et al., 1990; Beach et al., 1991). Além disso, *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos, rotas de salvação para aquisição dessas moléculas são utilizadas (Heyworth et al., 1982; Heyworth et al., 1984).

II.2.1 Tricomoníase

T. vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo. A estimativa global da tricomoníase é de uma incidência de aproximadamente 276 milhões de novos casos e uma prevalência de 187 milhões de adultos infectados, bem a frente dos casos de sífilis, gonorreia e clamídia (WHO, 2012). Cerca de 80% dos casos dessa infecção são assintomáticos, sendo que em mulheres essa infecção pode persistir por meses levando a casos crônicos (Poole e McClelland, 2013). Em mulheres, nos casos sintomáticos, a inflamação é caracterizada por corrimento tipicamente amarelo ou esverdeado, espumoso e purulento, irritação e prurido vulvar, dor abdominal e disúria. Além disso, pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, que conferem uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou *cérvice com aspecto de morango*, essa manifestação pode ser encontrada em aproximadamente 2,0 - 5,0% dos casos, sendo um sinal clínico específico desta patologia (Petrin et al., 1998).

Em homens, mais de 77% dos casos são assintomáticos (Sena et al., 2007). No entanto, em cerca de um quarto dos casos a infecção manifesta sintomas, dentre eles: uretrites, prostatites, epididimites e infertilidade (Krieger et al., 1993; Poole e McClelland, 2013).

Diferentemente do que se observa em muitos casos onde a infecção é facilmente tratada, a tricomoníase pode trazer sérias complicações à saúde, como: predisposição à doença inflamatória pélvica (Cherpes et al., 2006), câncer cervical (Viikki et al., 2000) e infertilidade (Grodstein et al., 1993); complicações na gravidez (Klebanoff et al., 2001), nascimento prematuro e baixo peso de recém-nascidos (Cotch et al., 1991; Cotch et al., 1997); além de atuar como um cofator para transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Sorvillo et al., 2001). Os mecanismos dessa associação ainda não são totalmente conhecidos, mas sugere-se que ocorra o comprometimento da mucosa pelo parasito e uma resposta inflamatória na região genital, fazendo com que ocorra o recrutamento de células alvo para o HIV, linfócitos T CD4, como principais fatores responsáveis pela relação *T. vaginalis* com o HIV (Lehker e Alderete, 2000). Além disso, estudos recentes demonstraram que a tricomoníase também está associada a susceptibilidade aumentada ao papiloma vírus humano (HPV) (Fichorova et al., 2012) e a tipos de câncer de próstata agressivos (Sutcliffe et al., 2010).

A cultura já foi o padrão ouro no diagnóstico da tricomoníase antes de métodos moleculares tornarem-se disponíveis. A cultura tem uma sensibilidade de 75%-96% e uma especificidade de até 100%. Atualmente recomenda-se o uso de testes altamente sensíveis e específicos para a detecção de *T. vaginalis*. Entre as mulheres, o Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (TAAN) é altamente sensível, com uma detecção de três à cinco vezes maior do que o exame direto a fresco (sensibilidade de 51% - 65%). O ensaio APTIMA (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA) para *T. vaginalis* é aprovado pelo FDA para a detecção do parasito em amostras vaginais, endocervicais ou de urinas. Este ensaio detecta RNA de amplificação mediada por transcrição com uma sensibilidade de até 95,3%-100% e especificidade de 95,2%-100% (Workowski & Bolan, 2015).

O tratamento da tricomoníase envolve a utilização de fármacos do grupo dos 5-nitroimidazóis, sendo o metronidazol e o tinidazol, os únicos fármacos recomendados pelo FDA, onde o primeiro é o fármaco de escolha para o tratamento dessa infecção (Helms et al., 2008). Esses fármacos penetram na célula por difusão, ocorrendo à redução do grupamento nitro pela enzima piruvato-ferredoxina óxido redutase encontrada nos hidrogenossomos,

formando radicais nitro citotóxicos, levando à quebra da fita de DNA, provocando a morte dos parasitos (Kulda, 1999). No entanto, efeitos adversos estão frequentemente associados a esses medicamentos, como: náuseas, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência (Miller e Nyirjesy, 2011). Além disso, o uso na gestação não é recomendado devido ao risco de efeitos carcinogênicos ao feto (Klebanoff et al., 2001).

Entretanto, a principal causa de falha no tratamento está nos casos de resistência de *T. vaginalis* frente a esses fármacos, visto que 9,6% dos isolados clínicos são resistentes *in vitro* ao metronidazol (Schwebke e Barrientes, 2006). Além disso, não existe um sistema de vigilância para a tricomoníase, não sendo uma doença de notificação compulsória, o que a torna uma infecção negligenciada (Secor et al., 2014). Nesse sentido, considerando a limitação no tratamento da tricomoníase, torna-se necessária a busca por novos compostos com atividade contra esse protozoário.

II.3 Infecções bacterianas e biofilmes patogênicos

Doenças infecciosas são a principal causa de morte no mundo, sendo que as infecções bacterianas contribuem para estas altas taxas de mortalidade (Rasko e Sperandio, 2010). Além disso, nas últimas décadas a associação das doenças infecciosas graves com elevadas taxas de resistência bacteriana vêm aumentado substancialmente (Jones, 2001). Nos Estados Unidos pelo menos dois milhões de pessoas adquirem infecções graves relacionadas com bactérias resistentes a um ou mais antimicrobianos, sendo que, pelo menos 23.000 pessoas morrem a cada ano como resultado direto dessa resistência (CDC, 2013). A resistência aos antimicrobianos está relacionada ao seu uso excessivo e incorreto, além da falta de desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica (Ventola, 2015).

Em geral, os antimicrobianos convencionais agem por meio de efeitos tóxicos ou inibindo o crescimento dos organismos. No entanto, alguns mecanismos que as bactérias desenvolveram para resistir a ação dos antimicrobianos são: (a) aumento na capacidade de degradar compostos antibacterianos; (b) diminuição da permeabilidade; (c) diminuição da afinidade

para o antibiótico e (d) aumento do efluxo de antibióticos (Hentzer e Givskov, 2003).

Devido ao aumento da prevalência de bactérias resistentes, há a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antibacterianos visando novas estratégias de combate às bactérias. Uma opção atrativa, apesar de ainda permanecer uma ideia teórica, seria atuar nos fatores de virulência bacterianos, como a formação de biofilme (Hett e Hung, 2009).

As bactérias existem em dois estados básicos de vida: na condição de células planctônicas, chamadas de células de vida livre, ou como parte de uma comunidade, na forma de biofilmes. Biofilmes vêm sendo descritos desde o século XVII, onde Anton van Leeuwenhoek, observou “animalculi” oriundos da superfície dos seus próprios dentes, porém, a teoria geral da existência dos biofilmes só foi promulgada em 1978 (Costerton et al., 1999).

Biofilmes são formados por complexas comunidades bacterianas, que vivem aderidas a uma superfície (biótica ou abiótica), embebidas a uma matriz exopolimérica formada por polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos, entre outros compostos. Bactérias em biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos e à ação do sistema imunológico, sendo relacionadas a infecções crônicas (Hett e Hung, 2009; Chua et al., 2014). No biofilme há diversos canais de água que atuam como um primitivo sistema circulatório, liberando nutrientes e removendo resto dos metabólitos (Davies, 2003).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que compreende diversas etapas. 1) pré-condicionamento da superfície por macromoléculas presentes no ambiente; 2) transporte de células planctônicas do meio circundante à superfície; 3) adesão inicial em uma superfície biótica ou abiótica; 4) migração de células formando microcolônias, com sinalização molecular – sistema *quorum sensing*; 5) produção da matriz exopolimérica; 6) maturação e desenvolvimento, com internalização de nutrientes, metabolismo dos mesmos e transporte de resíduos; e, 7) liberação de células planctônicas das camadas mais externas, para dispersão, multiplicação e colonização de novas superfícies (O'toole et al., 2000; Simoes et al., 2009), conforme a figura 07:

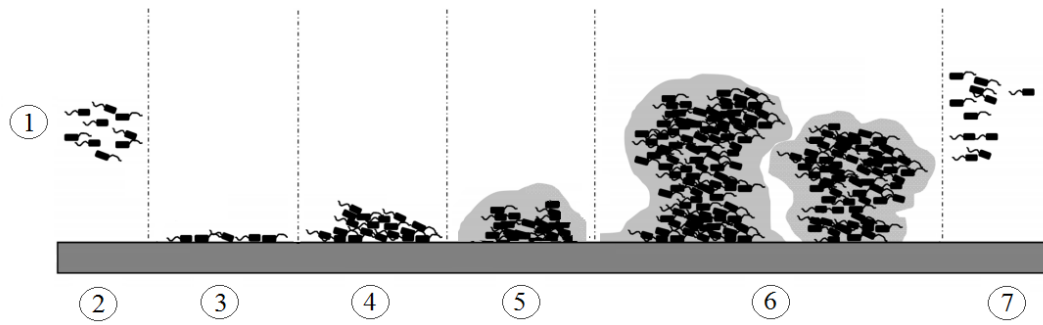


Figura 07. Esquema da formação do biofilme. Adaptado de Trentin et al. (2013).

O primeiro estágio na formação do biofilme é a adesão em uma superfície (biótica ou abiótica), sendo este um processo bastante complexo, podendo sofrer diversas variáveis dependendo da espécie bacteriana, composição da superfície, fatores ambientais e produtos gênicos. Esse processo possui duas etapas que inclui uma fase reversível, física instantânea, seguida por uma fase irreversível, molecular e celular tempo-dependente. A aderência primária (reversível) das bactérias em uma superfície abiótica é mediada por interações não específicas, depende da característica da superfície, já em superfícies bióticas é realizado por mecanismos de ancoramento específicos, como por exemplo, via adesinas (Dunne, 2002).

Na aderência primária (reversível) em superfícies abióticas, o organismo aproxima-se da superfície propulsionado aleatoriamente (por fluxo de um fluido sobre a superfície através de movimento Browniano ou força gravitacional) ou dirigido por quimiotaxia e motilidade (por flagelos e pili). Ao aproximar-se cerca de 1 mm da superfície a adesão dependerá de forças de atração ou repulsão (interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, forças hidrodinâmica) gerada entre as duas superfícies. Devido a maioria das bactérias e as superfícies inertes serem negativamente carregadas, as interações eletrostáticas tendem a favorecer a repulsão. Interações hidrofóbicas têm provavelmente maior influência sobre o resultado da adesão primária. Uma repulsão líquida entre duas superfícies pode ser superada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas localizados em estruturas que se prolongam a partir da superfície da célula, tais como os pili (Figura 08). A longevidade de adesão primária depende da soma total de todas essas variáveis, mas a química de superfície empurra o equilíbrio

a favor da adesão, prevendo que as substâncias orgânicas em solução irão concentrar-se perto de uma superfície e que os micro-organismos tendem a se reunir em ambientes ricos em nutrientes (Dunne, 2002; Pavithra e Doble, 2008).

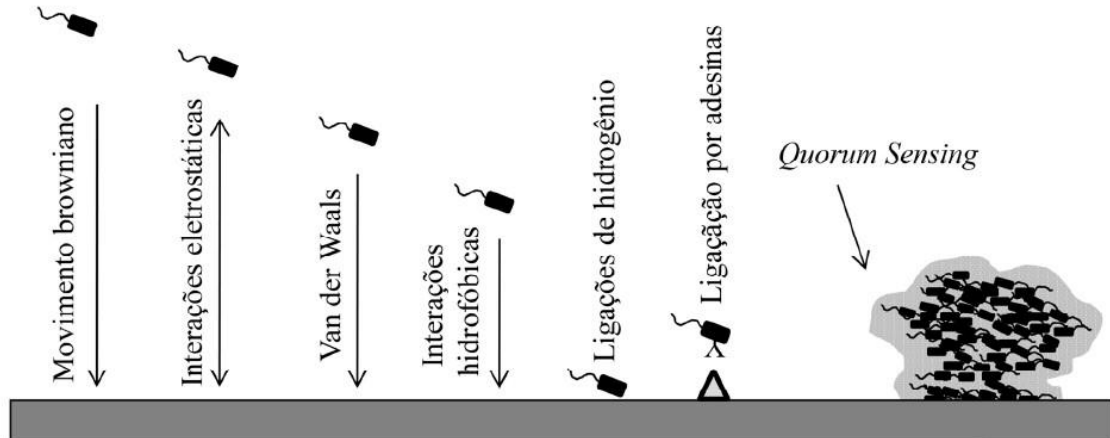


Figura 08. Interações envolvidas na adesão reversível de células bacterianas planctônicas a uma superfície abiótica. Adaptado de Trentin et al. (2013)

A adesão reversível entre a bactéria e a superfície pode ocorrer de maneira direta ou via filme condicionante, sendo este um filme orgânico com composição variável, dependendo do sítio de inserção, comumente é constituído pelas proteínas albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibronectina (figura 09) (Trentin et al., 2013).

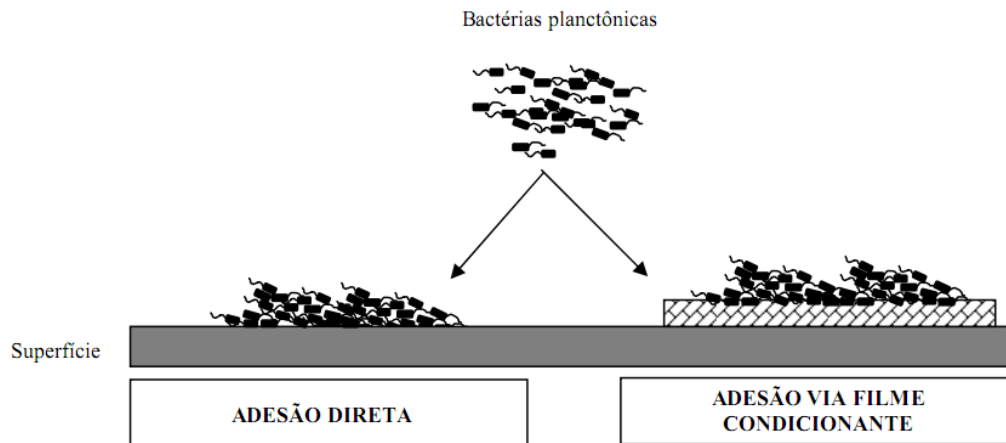


Figura 09. Adesão bacteriana direta ou via filme condicionante. Fonte: Trentin et al. (2013).

Durante a formação das microcolônias, à medida que aumenta a densidade bacteriana, ocorre a liberação de moléculas sinalizadoras denominadas de auto-indutores, para o meio extracelular. As bactérias são capazes de produzir, detectar e responder a essas sinalizações, caracterizando uma comunicação entre as células bacterianas, denominado *Quorum-sensing* (QS). Essa comunicação altera coletivamente a expressão de genes fazendo com que as bactérias atuem em sincronia, como por exemplo, na produção de matriz exopolimérica (EPS), na formação e manutenção do biofilme (Rutherford e Bassler, 2012; Trentin et al., 2013).

Na segunda fase da adesão, a fixação é mediada pela ligação entre adesinas específicas e a superfície. Nesse momento, os organismos consolidam o processo de adesão através da produção de EPS que complexa com os materiais de superfície e os ligantes específicos localizados na pili, nas fimbrias, ou em ambos. No fim da segunda etapa, a adesão torna-se irreversível, estando o micro-organismo ligado firmemente à superfície (Dunne, 2002).

Na maioria dos biofilmes, os micro-organismos representam menos de 10% do extrato seco, enquanto a matriz pode ser responsável por mais de 90%. EPS é responsável pela arquitetura tridimensional em forma de cogumelo, com áreas densas, poros, canais (circulam nutrientes e produtos de excreção) e coesão do biofilme, immobilizando as células e as mantendo próximas, permitindo intensas interações. Essa matriz protege os organismos

contra agressões, como dessecação, ação de antibióticos, radiação ultravioleta e ação de células imunes do hospedeiro (Flemming e Wingender, 2010). Quando o ambiente encontra-se desfavorável ou na necessidade de uma programação celular para a virulência, ocorre o desprendimento das células planctônicas ou pequenas partes do biofilme podendo colonizar outras superfícies (Trentin et al., 2013).

II.3.1 Importância clínica das infecções associadas ao biofilme

Segundo dados do *National Institutes of Health*, acredita-se que os biofilmes são responsáveis por 80% das infecções microbianas no corpo, podendo essas infecções ser teciduais ou associadas a dispositivos médicos, em diversas regiões do corpo, como demonstra a figura 10 (Davies, 2003).

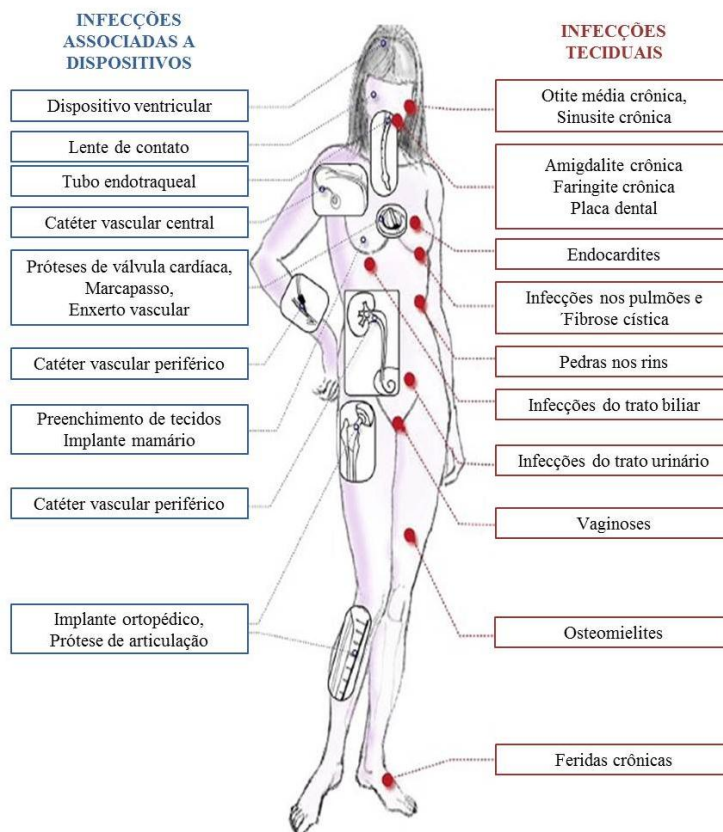


Figura 10. Infecções humanas causadas por biofilmes. Adaptado de Hoiby et al. (2015).

Quando em biofilmes, bactérias possuem de 10 a 1000 vezes mais tolerância aos agentes antimicrobianos, quando comparadas com a forma planctônica. Essa resistência pode ser explicada por vários fatores, dentre eles: a) a redução da penetração de antimicrobianos no biofilme, esse fato se dá pela presença do EPS na matriz do biofilme, o qual diminui de forma química e física a passagem do agente antimicrobiano pela matriz do biofilme; b) transferência horizontal de genes de resistência ligados a alteração dos alvos e a expressão de bombas de efluxo e enzimas que degradam ou neutralizam os antimicrobianos, o que eleva o potencial de virulência e persistência da infecção; c) crescimento lento de células no interior do biofilme (Figura 11), essas células são denominadas células dormentes ou *persisters* e encontram-se na base da estrutura dos biofilmes, onde há uma limitação de oxigênio e uma reduzida atividade metabólica (Mah e O' toole, 2001; Davies, 2003; Clinton e Carter, 2015).

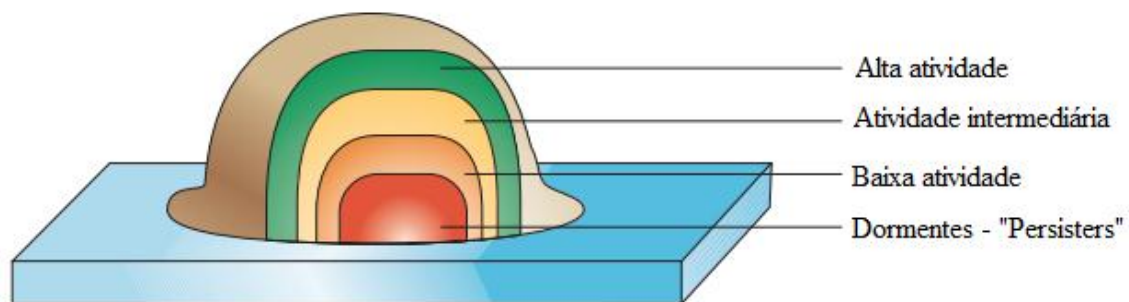


Figura 11. Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme. Adaptada de (Davies, 2003).

Devido a sua dificuldade, o tratamento dos biofilmes envolve a utilização a longo prazo de doses elevadas de antimicrobianos, frequentemente utilizando associação desses agentes com mecanismos de ação distintos. Quando um corpo estranho está envolvido, a remoção do material se faz necessária (Wu et al., 2015).

II.3.2 Bactérias de importância médica formadoras de biofilme

Os biofilmes podem apresentar uma ou diferentes espécies de micro-organismos, dentre as bactérias destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* como as principais causadoras de biofilmes encontradas na clínica (Moreau-Marquis et al., 2008; Antunes et al., 2011; Nordmann e Cornaglia, 2012; Sanchez et al., 2012; Otto, 2013). Dentre estes cabe ressaltar que *Staphylococcus* spp. são a principal fonte de infecções associadas a dispositivos médicos e *P. aeruginosa* é responsável pelo aumento da morbimortalidade em pacientes com fibrose cística (Costerton et al., 1999; Uckay et al., 2009; Antunes et al., 2011; Hoiby et al., 2015).

II.3.2.1 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são cocos Gram positivos conhecidos por causar infecções em humanos, podendo-se ressaltar as infecções associadas dispositivos médicos, como por exemplo em válvulas cardíacas (Otto, 2013). *Staphylococcus aureus* na forma de biofilme é causa de várias doenças como: osteomielite, endocardite, feridas crônicas e colonização de dispositivos médicos (Archer et al., 2011). Além de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* são frequentemente associados a esta infecção. *S. epidermidis* é a fonte mais comum de infecção em dispositivos médicos. Essa colonização relaciona-se ao fato de que essa bactéria é um colonizador da pele humana, facilitando a contaminação do dispositivo durante a inserção. Embora, na maioria dos casos, as infecções por *S. epidermidis* raramente evoluam ao óbito, são extremamente difíceis de tratar, representando uma sobrecarga ao sistema de saúde. Estima-se que os custos anuais relacionados à infecções em cateter por *S. epidermidis* sejam em torno de US\$ 2 bilhões por ano nos Estados Unidos. A dificuldade no tratamento está relacionada à presença de genes específicos que conferem resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilmes (Otto, 2008; Otto, 2013).

II.3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa e é considerado um patógeno oportunista, sendo comumente associada a infecções nosocomiais, acometendo cerca de 11-13,8 % dessas infecções, quando o isolamento microbiológico é realizado. As infecções adquiridas na comunidade incluem ceratites ulcerativas (geralmente associados ao uso de lentes de contato), otite externa (tipicamente em pacientes imunocomprometidos como aqueles com diabetes mellitus), infecções na pele e em tecidos moles. Em infecções nosocomiais é importante causa de pneumonias, infecções do trato urinário, infecções na corrente sanguínea e infecções na pele. Colonização e infecções recorrentes por *P. aeruginosa* são comuns em pacientes com fibrose cística. Esta bactéria possui resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, como β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, e fluoroquinolonas. Os mecanismos de resistência incluem bombas de efluxo, produção de β -lactamases e modificação da permeabilidade da membrana (Carmeli et al., 1999; Driscoll et al., 2007).

Outro agravante da infecção por este patógeno é sua capacidade em aumentar a morbidade e a mortalidade em pacientes com fibrose cística, sendo que vários fatores ambientais facilitam a formação de biofilme, dificultando o tratamento e agravando ainda mais o quadro dos pacientes portadores desta doença, havendo assim, a necessidade de medicamentos que atuassem erradicando o biofilme (Costerton et al., 1999; Hoiby et al., 2015). Quando em biofilme, *P. aeruginosa* pode secretar diversos exopolissacarídeos, dentre eles o alginato, um polissacarídeo composto de ácido glicurônico e manurônico, caracterizando o fenótipo mucoide (Alkawash et al., 2006). A conversão do fenótipo não mucoide para mucoide é associada a um declínio da função pulmonar e da sobrevivência de pacientes com fibrose cística, caracterizando um estado de persistência (Mann e Wozniak, 2012; Hay et al., 2014).

II.3.3 Estratégias de combate a biofilmes

A necessidade de combater os biofilmes patogênicos nos direciona a buscar estratégias capazes de prevenir (inibição da formação) ou erradicar biofilmes já formados. De um modo geral, a inibição da formação do biofilme pode ser alcançada pela inibição do crescimento bacteriano, utilizando

compostos bacteriostáticos ou bactericidas, ou pela utilização de compostos que bloqueiem a adesão bacteriana, por uma via que não envolva a morte da célula, caracterizando uma terapia antivirulência. Essas terapias não envolvem a morte bacteriana, mas a inibição de fatores de virulência (como o biofilme), mantendo as bactérias na sua forma planctônica, tornando-as susceptíveis a ação do sistema imunológico e dos antimicrobianos. Outra estratégia para inibição da formação dos biofilmes seria a utilização de biomateriais, que possuam em sua superfície características físicas de antiaderência ou que estejam recobertos por compostos que interfiram nos fatores de virulência da bactéria, impedindo sua fixação no mesmo (Trentin et al., 2013).

Para erradicar biofilmes já formados, as estratégias estão voltadas na busca de compostos que sejam capazes de desestruturar o biofilme, podendo ser utilizado um agente antimicrobiano em associação (Kokai-Kun et al., 2009). A utilização de proteases ou outras enzimas capazes de desintegrar a matriz do biofilme seria uma alternativa. Neste sentido, a utilização de enzimas como alginato liase (degrada o polímero alginato) coadministrada com gentamicina, colaborou para a erradicação do biofilme de *P. aeruginosa* mucoide (Alkawash et al., 2006).

III. Objetivos

O objetivo geral desta dissertação foi:

- Obtenção de moléculas provenientes de fungos associados a esponjas e corais marinhos que apresentem atividade anti-*T. vaginalis*, antibiofilme e antibacteriana.

Os objetivos específicos propostos foram:

- Produzir metabólitos a partir de fungos marinhos isolados de esponjas e corais marinhos;
- Avaliar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, antibiofilme e antibacteriana, das frações oriundas da fermentação dos fungos marinhos;
- Fracionar, isolar e elucidar as moléculas bioativas produzidas por microorganismos marinhos;
- Avaliar a citotoxicidade das frações bioativas *in vitro* frente a linhagens celulares e *in vivo* frente ao modelo de *Galleria mellonella*.

IV. Artigos Científicos

IV. CAPÍTULO 1 – Anti-*Trichomonas vaginalis*, antibiofilm and antimicrobial activities of bioactive metabolites produced by marine-associated fungi

Franciane Rios Senger, Rodrigo Campos, Melissa Landel, Camila Braz Menezes, Graziela Vargas Rigo, Laura Nunes Silva, Danielle Silva Trentin, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Biomedicine & Pharmacotherapy*

Anti-*Trichomonas vaginalis*, antibiofilm and antimicrobial activities of bioactive metabolites produced by marine-associated fungi

Franciane Rios Senger^{a,b}, Rodrigo Campos^{a,b}, Melissa Landel^c, Camila Braz Menezes^a, Graziela Vargas Rigo^a, Laura Nunes Silva^{a,b}, Danielle Silva Trentin^{a,b}, Alexandre José Macedo^{a,b}, Tiana Tasca^a.

Affiliation

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Centro de Biotecnologia do Estado de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brasil.

Corresponding Author

Dr. Tiana Tasca, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: tiana.tasca@ufrgs.br Phone: +55 51 3308 5325 Fax: +55 51 3308 5437

Abstract

In recent years, metabolites isolated from marine fungi have been attracted considerable attention due to unique chemical structures with diverse biological activities, encouraging further research in the area. Trichomoniasis is the most prevalent non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide. This disease has been linked to serious health consequences, and an increase in the number of clinical isolates resistant to nitroimidazoles has been reported. Infections caused by bacteria with different resistance mechanisms represent a major challenge to the current public health, resulting in high rates of mortality and morbidity. Pathogenic bacteria have virulence factors, such as the biofilm formation, which increase the persistence of infections. Due to the biological potential of marine products and the importance of these infections, the aim of this study was to evaluate the anti-*T. vaginalis*, antimicrobial and antibiofilm activities of the obtained molecule(s) from the fermentation of fungi associated with marine organism. The 14 fungal strains were isolated from sponges and corals marine obtained from the coast of Alagoas, Brazil. After production of the metabolite the mycelium was separated from the medium. The mycelium was extracted with methanol and the medium with ethyl acetate. The fractions were subjected to the assays anti-*T. vaginalis*, antimicrobial and antibiofilm (inhibition of the formation and eradication) activities. The fractions that showed activity were subjected to the assays of hemolysis, cytotoxicity evaluation (HMVII and Vero) and toxicity *Galleria mellonella* model. The organic fractions of the fungus *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) were active against *T. vaginalis* ATCC 30236 with MIC values of 2 mg/mL and 1 mg/mL, respectively. These fractions maintained activity against a metronidazole-resistant clinical isolate (TV-LACM2R) and presented the same MIC values found for the ATCC isolate. For the antimicrobial activity, the organic fractions of *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzian /Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) and *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) were active against *S. epidermidis* ATCC 35984. However, only the organic fraction of *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06) demonstrated activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853. In this test, for both bacteria, MIC values

did not exceed 1.5 mg/mL. The activity of these fractions was also observed against the same bacteria in the antibiofilm formation assay, since cell death occurred. The ability to eradicate biofilms was seen only by the organic fraction of the *Aspergillus flavus* (FMPV 01) fungus which was able to remove 52 % of the already formed biofilm of *S. epidermidis* ATCC 35984. The absence of hemolysis of red blood cells was observed in all active fractions. When the *in vitro* cytotoxicity evaluation against HMVII and Vero cell lines was performed, only the organic fraction of *Aspergillus niger* (FMPV 03) showed no cytotoxic effect. However, in the test evaluation of *in vivo* toxicity, none of the tested samples caused a reduction in the survival of the *Galleria mellonella* larvae. Overall, the range of activities reported confirm the potential of marine fungi to produce bioactive molecules.

Keywords: Marine-associated fungi, anti-*Trichomonas vaginalis* activity, antimicrobial activity, antibiofilm activity.

1. Introduction

Marine fungi are known as a promising source of bioactive natural products, possessing a diversity of isolated structures in past decades. The isolation of cephalosporin C, in the 40s, produced by *Cephalosporium acremonium* marine fungus, was the precursor of cephalosporins, a class of antibiotics currently used. Several biological activities have been described derived from marine fungi, including antitumor, antibacterial, antioxidant, antiviral, anti-inflammatory, and antiprotozoa [1-3].

Trichomonas vaginalis is the parasite of the urogenital human tract that causes trichomoniasis, recognized as the most prevalent non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide and responsible for 276 million new cases annually [4]. The pathogen has been associated with serious health consequences including predisposition to cervical and prostate cancers, pregnancy complications, infertility, pelvic inflammatory disease and it acts as a co-factor in human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition [5-7]. Two drugs of the class 5-nitroimidazole are approved by the Food Drug Administration (USA) for the trichomoniasis treatment, metronidazole and tinidazole [8]; however, the number of *T. vaginalis* resistant isolates has increased requiring new alternatives to treat this neglected disease [9, 10].

Infectious diseases are the leading cause of death worldwide and this high mortality rate is closely linked to infections caused by bacteria [11]. Bacteria occur in an individual form (planktonic) or as cell aggregates (biofilms) [12]. Biofilms are bacterial communities irreversibly adhered to biotic or abiotic surfaces, encapsulated in a matrix of extracellular polymeric substances produced by themselves. After its establishment, antimicrobial agents have difficulty to perfuse into biofilms [13].

Considering the need for new alternatives for the treatment of these infections and the recognized biological source of bioactive molecules from marine microorganisms, this study aimed to evaluate the anti-*Trichomonas vaginalis*, antibiofilm and antibacterial activities of molecules from fungi in the marine environment.

2. Material and Methods

2.1 Fungal Material.

A total of 14 marine fungi were isolate from marine sponges and corals. Marine organisms were collected from the Praia da Ponta Verde, Alagoas State, Brazil, in collaboration with the PhD Melissa Landel from Federal University of Alagoas. The fungi were identified using a molecular biological protocol by DNA amplification and sequencing of the ITS region.

2.2 Cultivation and extraction.

All fungal strains were grown on potato dextrose agar plates for seven days at 25 °C. One agar plug (8mm diameter) of each strain were used to inoculate in erlenmeyers flasks containing 100 mL of 1 % glucose, 0,1 % yeast extract, 0,1 % potassium chloride, 0,1 % sodium chloride, cultivated at 25 °C under static conditions for 14 days. After this period, the mycelium was separated from the culture broth. The broth was extracted with ethyl acetate (two times), generating an aqueous fraction and an organic fraction. The mycelium was extracted with methanol (two times), yielding a methanolic fraction. Then, the extracts obtained were lyophilized and the bioassays were performed.

2.3 Anti-*Trichomonas vaginalis* Assay.

The *T. vaginalis* isolate 30236 (from the American Type Culture Collection, ATCC, USA), and the fresh clinical isolate TV-LACM2R (metronidazole-resistant isolate) were used in this study. The fresh isolate was obtained at Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil, and was registered and stored by cryopreservation at -80 C° in the *T. vaginalis* isolates bank of our research team (this survey was submitted and approved by the UFRGS Ethical Committee, number 18923). The assay was performed using 96-well microtiter plates with TYM medium, samples at a concentration of 1 mg/mL, and an initial inoculum of 2.6×10^5

trophozoites per mL (30236 ATCC), giving a final volume of 200 μ L. After 24 h of incubation at 37 °C (\pm 0.5), the number of viable trophozoites was measured using trypan blue dye exclusion (0.2 % [v/v]) in hemocytometer. The inhibitory minimum concentration (MIC) was determined using only the samples that reduced under 99 % the parasite viability in the initial screening under an eightfold dilution (2.0 – 0.0078 mg/mL) and trophozoite viability was evaluated using trypan blue dye exclusion. MIC value was confirmed by the failure of non-motile parasites to grow after re-inoculation into drug-free medium. DMSO (0.6 %) was used as vehicle control and the untreated control, the fraction was replaced by Milli-Q water. Then, only the fraction(s) that produced the lowest MIC values, which were considered active, were tested against the *T. vaginalis* TV-LACM2R fresh clinical isolate. These active fractions were used in the subsequent experiments. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.4 Bacterial growth assay and minimum inhibitory concentration (MIC).

For the antibacterial assay, the *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as model. 80 μ L of the bacterial suspension (equivalent to 10^8 CFU/mL), 80 μ L of the fermented fractions (concentration 1 mg/mL in the wells) and 40 μ L of tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd, England) were added to 96-well microtiter plates and incubated for a period of 24 h, at 37 °C. Bacterial growth was evaluated based on the difference between initial (t = 0 h) and final (t = 24 h) absorbance values at 600 nm in polystyrene 96-well microtiter plates. Values higher than 100 % represent a stimulation of bacterial growth in comparison to the vehicle control. The minimum inhibitory concentration (MIC) to kill 100 % of bacterial cells was determined under an eightfold dilution (2.0 – 0.0078 mg/mL). 50 μ L of a serial dilution was spread on to Mueller Hinton agar plates to confirm the MIC. Rifampicin 8 μ g/mL and 8 μ g/mL Gentamicin sulphate (Sigma Aldrich®, USA) was used as a control for the inhibition of bacterial growth of the *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectively. DMSO (2 %) was used as vehicle control and the untreated control, the fraction was replaced by

Milli-Q water. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.5 Antibiofilm formation assay.

For anti-biofilm assay a protocol adapted from Antunes, et. al. [14], employing crystal violet in 96-well microtiter plates was used and was used the same bacterial strains from the above test. Then, 80 μL of the bacterial suspension (equivalent to 10^8 CFU/mL), 80 μL of the fermented fractions (concentration 1 mg/mL in the wells) and 40 μL of tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd, England) were added. After incubation period (37 °C for 24 h) the content of the wells was removed and the wells were washed three times with sterile saline (0.9%). The remaining attached bacteria were heat-fixed at 60 °C for 1 h. The adherent biofilm layer formed was stained with 0,4 % crystal violet for 15 min at room temperature. The stain bound to the cells was solubilized with Ethanol 99,5 % (Synth) and the absorbance was measured at 570 nm. DMSO (2 %) was using with vehicle control and was considered 100 % of biofilm formation and the untreated control, the fraction was replaced by Milli-Q water. Rifampicin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma Aldrich®, USA) and Gentamicin sulphate 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were utilized as growth control for *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectively. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.6 Eradication of biofilm and minimal biofilm eradication concentration (MBEC).

The eradication of biofilm assay was performed with different bacterial strains (*S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853). 80 μL of the bacterial suspension (equivalent to 10^8 CFU/mL), 80 μL of the water and 40 μL of tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd, England) were added in 96-well microtiter plates. Bacterial strain were grown for 24 h in 96-well microtiter plates, followed by washing with sterile saline (0.9%), to remove the planktonic cells and inoculation for more 24 h with 80 μL of fermentation fractions (concentration 1 mg/mL in the wells), 80 μL of the sterile saline (0,9%) and 40 μL of tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd, England). After this time, the plates

were washed again and the remaining biofilm was stained with crystal violet for 15 minutes at room temperature followed by solubilization with ethanol 99.5 % (Synth) and the absorbance was measured at 570 nm. The minimal biofilm eradication concentration (MBEC) was performed as described by Antunes et al. [15] with modifications. The bacterial strain was grown for 24 h in 96-well microtiter plates, after washing, the remaining attached bacteria were resuspended with 100 μ L of TSB (Oxoid Ltd, England) and challenged with a solution of 100 μ L of the fractions in different concentrations (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg/mL). The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Then, the plates were washed and the remaining biofilm was stained with crystal violet for 15 minutes at room temperature followed by solubilization with ethanol 99.5 % (Synth) and the absorbance was measured at 570 nm. DMSO (2 %) was using with vehicle control and the untreated control, the fraction was replaced by Milli-Q water. Rifampicin 8 μ g/mL (Sigma Aldrich®, USA) and Gentamicin sulphate 8 μ g/mL were utilized as growth control for *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectively. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.7 Hemolysis assay.

Fresh human blood was obtained from healthy voluntary donors. The Universidade Federal do Rio Grande do Sul Research Ethical Committee approved documents, procedures and project under authorization CAAE 47423415.5.0000.5347. The erythrocytes were washed three times with PBS 1x and then suspended in phosphate-buffered saline (PBS) 1x to obtain 1 % erythrocyte suspension. Then, the erythrocytes were incubated with fermented active fractions at MIC (highest concentration of MIC in activity assays) and/or MBEC (or concentration used in the activity experiment) at 37 °C for one hour. After incubation, the samples were centrifuged at 3000 rpm at 5 min, after the absorbance supernatant was measured at 540 nm. Each experiment was carried in triplicate (n=3). Triton-X 100 was used as positive control of hemolysis. Erythrocytes incubated with PBS were used as negative control.

2.8 Cytotoxicity against HMVII and Vero cells.

The cells lines HMVII and Vero cell lines, representative of vaginal epithelial melanoma cells and kidney epithelial cells, respectively, were used to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of the fermented active fractions. HMVII lineage was grown in RPMI medium, while Vero cells was maintained in DMEM; both media were supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37 °C, 5 % CO₂. For this assay, 3.0x10⁴ and 1.0x10⁴ cells/well were seeded in 96-well microtiter plate for 24 hours. After this period, the medium was replaced by fresh medium containing or not (control condition) the samples at MIC (highest concentration of MIC in activity assays) and/or MBEC (or concentration used in the activity experiment). A solution containing 0.2 % Triton-X 100 was added as a positive control and 0.6 % DMSO as vehicle control. The cytotoxicity was evaluated after 24 h or 48 h of incubation. After this period, the plates were wash with PBS, and 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution was added and kept in the wells for 1 h. The plates were washed with PBS, and the insoluble purple formazan was dissolved in DMSO. The amount of reduced MTT was measured at 570 nm. The experiment was performed in triplicate (n=3).

2.9 Cytotoxicity against *Galleria mellonella* “*in vivo*” model.

Stock solutions of the active samples in the biological assays (1 mg/kg, 10 mg/kg and 50 mg/kg of the larvae) were prepared. PBS was used as vehicle. Three groups of ten randomly-selected *G. mellonella* larvae (weighing 0.2 g – 0.28 g) were injected with 10 µL of each dilution using Hamilton syringe (Sigma Aldrich®, USA) through the last left pro-leg as described by Kavanagh e Fallon [16], and showed in figure 01. Control groups of 10 larvae were used. Each group was injected with 10 µl PBS. Larvae were incubated at 37 °C in Petri dishes and were observed every 24 hours, for 96 hours and examined for larval mortality. Larvae were considered dead when they were unmoving, failed to reorient themselves when placed on their backs and when were unresponsive to stimuli. The experiment was performed in triplicate (n=3).

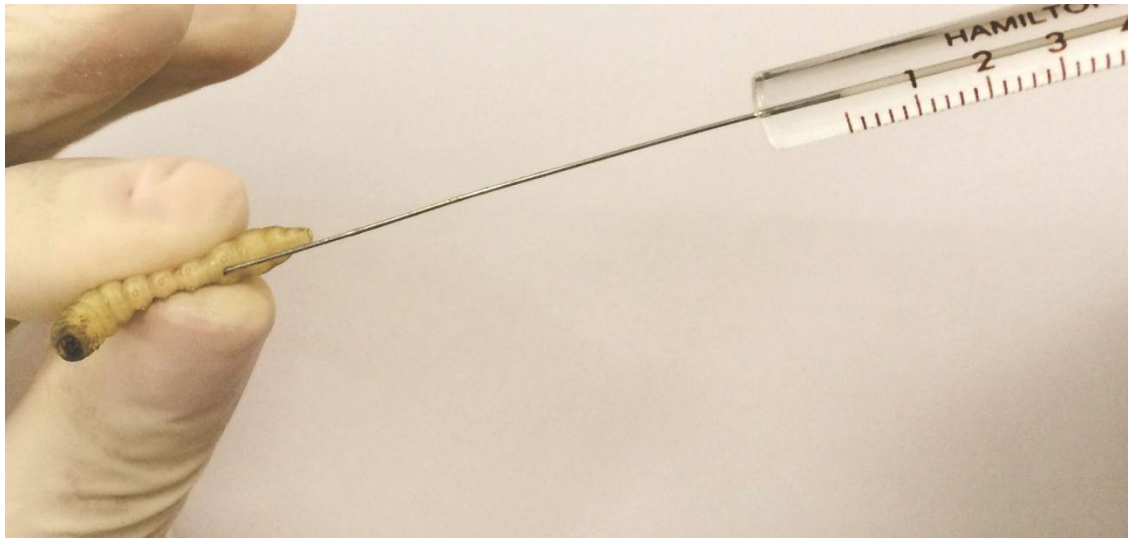


Figure 1: Injection of *G. mellonella* larvae with the active samples in the biological assays, through the last left pro-leg.

2.10 Statistical analyses.

Student's *t* test was used for comparisons between the samples with DMSO control. The results are expressed as the mean \pm SEM of at least three individual experiments. $P < 0.001$ was considered statistically significant difference.

3. Results

A total of 14 fungal strains from sponge and coral samples were isolate and identified using molecular biology (Table 1).

Table 1. Fungi isolated from marine sponges and corals.

Sample code	Fungal Strain (Genbank)	Substrate source
FMPV 01	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Haliclona melana</i>
FMPV 02	<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Tedania ignis</i>
FMPV 03	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Palythoa variabilis</i>
FMPV 04	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Palythoa variabilis</i>
FMPV 05	<i>Phoma</i> sp. (UM 255)	<i>Palythoa caribaeorum</i>
FMPV 06	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Zoanthus sociatus</i>
FMPV 07	<i>Hyphopichia</i> sp.	<i>Zoanthus sociatus</i>
FMPV 08	<i>Cladosporium colombiae</i>	<i>Haliclona chlorilla</i>

FMPV 09	<i>Trichoderma harzianum</i> / <i>Hypocrea lixii</i> complex	<i>Haliclona chlorilla</i>
FMPV 10	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Haliclona chlorilla</i>
FMPV 11	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Palythoa variabilis</i>
FMPV 12	Not defined	<i>Chondrosia collectrix</i>
FMPV 13	Not defined	<i>Chondrosia collectrix</i>
FMPV 14	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	<i>Siderastrea stellata</i>

The biological activity of the fractions obtained from the fermentation of 14 fungal strains was screened *in vitro* against *T. vaginalis* ATCC 30236. The organic phase of *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) showed strong reduction (more than 99 %) of *T. vaginalis* viability at 1 mg/mL (Figure 2). These active fractions were submitted to the MIC assay and both exhibited low MIC values, showed in Table 2. Therefore, one fresh clinical isolate metronidazole-resistant (TV-LACM2R) was tested only against these two active fractions, FMPV 03 and FMPV 09. Both samples were effective against this resistant isolate and present the same MIC value of 2 mg/mL and 1 mg/mL, respectively (Table 2).

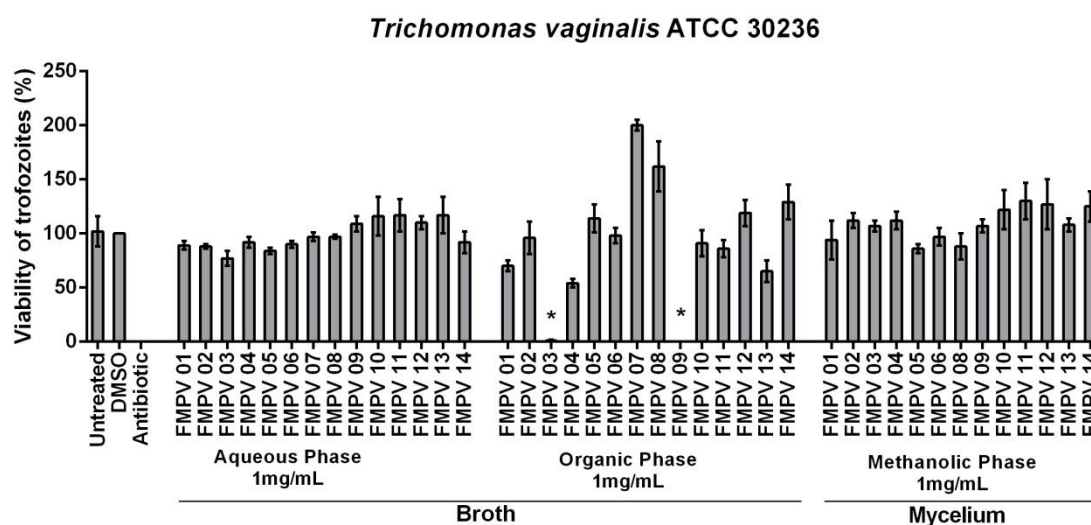
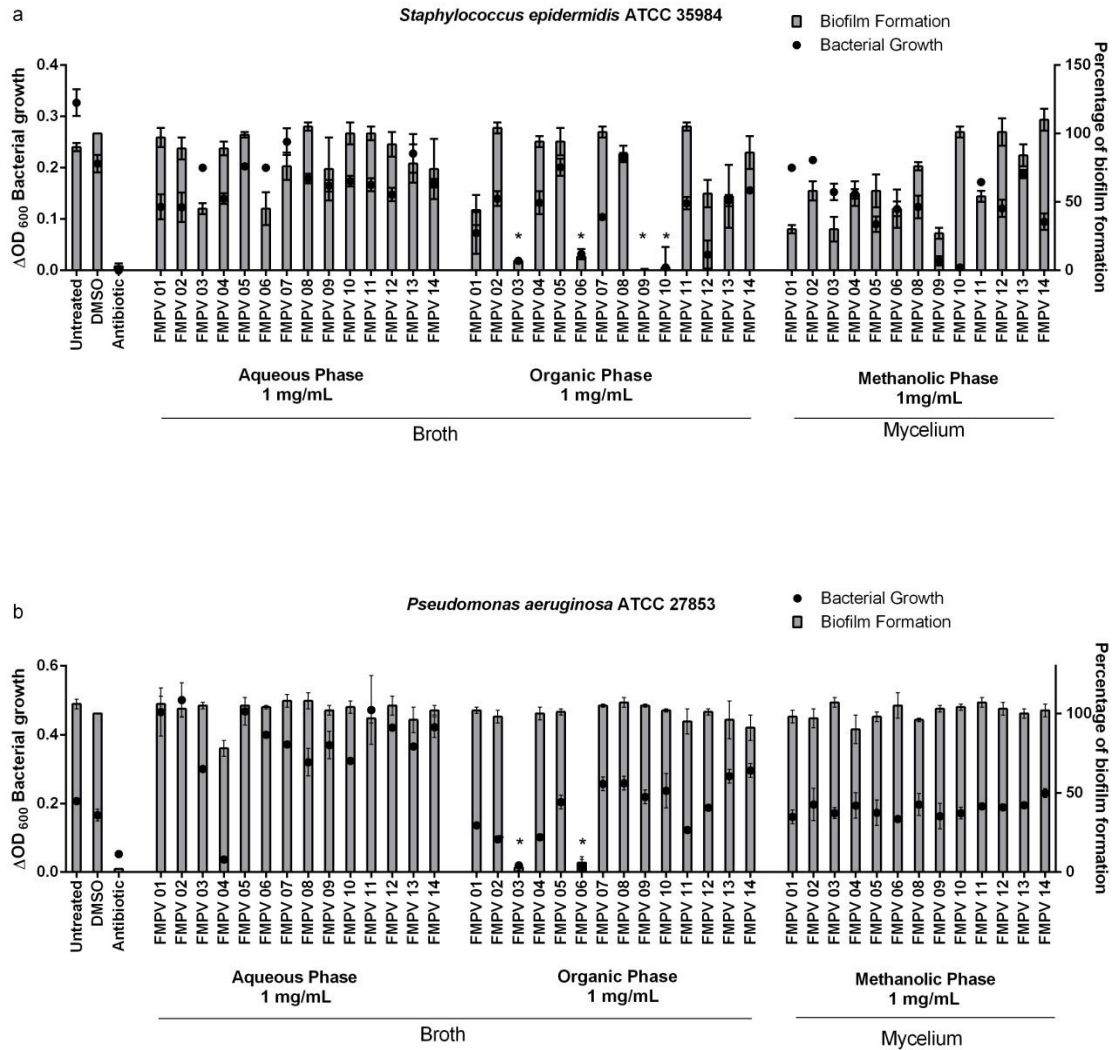


Figure 2. Anti-*T. vaginalis* activity of fraction fermentation of marine fungal associate. Bars represent the mean \pm SD of three different experiments performed in triplicate. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control.

The antimicrobial activity of the fractions can be observed in both models (Figure 3a and 3b), four organic fractions (organic phase: FMPV 03, FMPV 06,

FMPV09, FMPV 10) showed activity for *S. epidermidis* ATCC 35984. Considering *P. aeruginosa* ATCC 27853, two organic fractions (organic phase: FMPV 03 and FMPV06) demonstrated activity and the rate inhibition of bacterial growth was higher than 90 % in both models. All the fractions with activity over 90 % in the screening had the MIC values determined (Table 02). Biofilm formation was also affected by the same fractions, however, this inhibition resulted from the antimicrobial activity of the samples tested due to death of bacterial cells.

The figure 03 shows the effect of the fractions on the biofilm already formed. The organic phase of *Aspergillus flavus* (FMPV 01) showed a decrease of 52 % of the biofilm already formed when compared to the control.



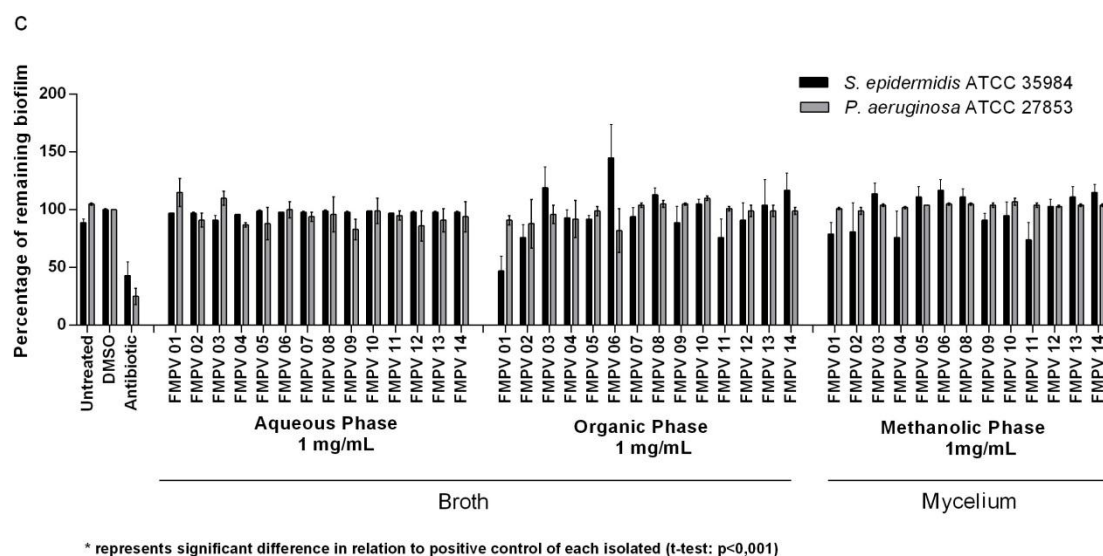


Figure 3. Antimicrobial and antibiofilm formation activities obtained from fermentation fractions of fungal associated with marine organisms against **a** *S. epidermidis* ATCC 35984 and **b** against *P. aeruginosa* ATCC 27853. **c** Percentage of remaining biofilm in *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* established biofilm treated with fermentation fraction of fungal associated with marine organisms. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of fraction fermentation of marine fungal associate

		FMPV 01 (organic phase)	FMPV 03 (organic phase)	FMPV 06 (organic phase)	FMPV 09 (organic phase)	FMPV 10 (organic phase)
MIC	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35985	N.D.	1.5 mg/mL	1.5 mg/mL	0.25 mg/mL	1 mg/mL
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	N.D.	1.0 mg/mL	1.0 mg/mL	N.D.	N.D.
	<i>T. vaginalis</i> ATCC 30236	N.D.	2.0 mg/mL	N.D.	1.0 mg/mL	N.D.
	<i>T. vaginalis</i> TV-LACM2R (fresh clinical) ^a	N.D.	2.0 mg/mL	N.D.	1.0 mg/mL	N.D.
MBEC	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35985	N.F.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D., not determined.

N. F., not found. At the concentrations tested, it was not possible to determine the MBEC value of the sample.

^a Metronidazole-resistant isolate.

The hemolytic test was performed for predict the damage in cellular membrane of the activity fractions upon mammalian cells. The active fractions not promote a significant hemolytic effect after one hour incubation, as showed in table 3. Besides, the viability of HMVII and Vero cells was evaluated in order to determine the potential cytotoxicity of the active fractions of the marine fermented. As showed in Figure 04, the organic phase of *Aspergillus niger* (FMPV 03) showed no cytotoxic effects against HMVII and Vero cells, in tested times. However, the organic phase of *Aspergillus flavus* (FMPV 01), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzianu* / *Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) and *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) presented cytotoxic effects in the cells lines tested.

Table 3. Hemolytic effect of fraction fermentation of marine derivate fungal.

Samples	% Hemolysis ^a
Positive control (Triton-X 100)	100 ± 0
Negative Control	5 ± 7
FMPV 01 (organic phase – 1 mg/mL)	8 ± 4
FMPV 03 (organic phase – 2 mg/mL)	9 ± 7
FMPV 06 (organic phase – 1.5 mg/mL)	12 ± 4
FMPV 09 (organic phase – 1 mg/mL)	17 ± 4
FMPV 10 (organic phase – 1 mg/mL)	22 ± 2

^a The values represent the mean ± standard deviation.

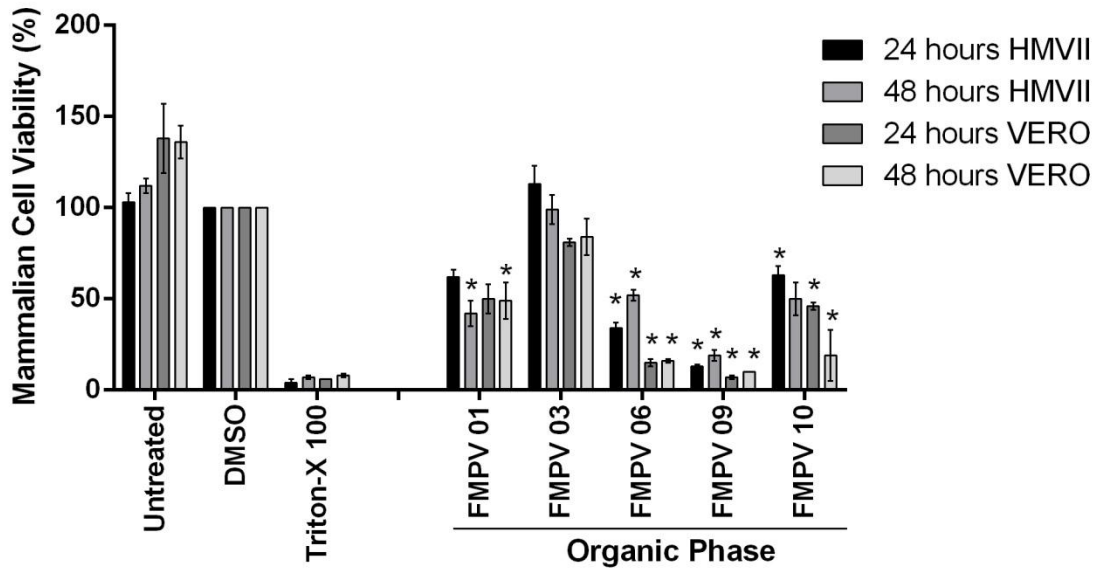


Fig 4. Effect of the fermentation fraction of marine fungal on the viability of HMVII and Vero Cells. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control regarding the results about mammal cell viability.

In addition, to investigate the *in vivo* cytotoxicity the *G. mellonella* model was used. In this assay, none of the tested fractions decreased the survival of the *Galleria mellonella* larvae, in the evaluated concentrations (Table 4).

Table 4. Percentage of survival of the *Galleria mellonella* larvae post injection of the fermentation fraction of marine fungal.

Sample	Dosage Concentration (mg/kg larvae)	<i>Galleria mellonella</i> survival (Percentage)				
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control (PBS)	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100
FMPV 01 (organic fraction)	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100
FMPV 03 (organic fraction)	1	100	100	96.6	96.6	96.6
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100
FMPV 06 (organic fraction)	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	96.6	96.6	96.6	96.6
FMPV 09 (organic fraction)	1	100	96.6	96.6	96.6	96.6
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100
FMPV 10 (organic fraction)	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100

4. Discussion

In recent years, marine natural products has attracted considerable attention due to their unique chemical structures with diverse biological and

pharmacological activities. Much of this potential is related to marine microorganisms such as bacteria and fungi. Fungi, in particular, have proven to be a promising source of molecules with various bioactivities, including anti-tumor, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, antifungal, and anti-protozoa [1-3, 17].

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide [4]. Treatment is limited because it is based on only two options, metronidazole and tinidazole. Taking into account the increasing incidence of resistance to these drugs, about 10 % of clinical *T. vaginalis* isolates, treatment has become a challenge, requiring new therapeutic alternatives [18, 19]. Anti-*T. vaginalis* activity assay revealed that two fractions were active against trophozoites (ATCC 30236). The organic fractions of the fungus *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) were active at low concentrations, with MIC values of 2 mg/mL e 1 mg/mL, respectively. The activity against the metronidazole-resistant clinical isolate (TV-LACM2R) was also investigated by testing the active samples. The activity of two fractions was maintained against the resistant isolate, with the same MIC values. The MIC values are not considered to be high since they are not pure molecules once that is expected to reduce the MIC after purification of active compounds.

Metronidazole and tinidazole penetrate into the parasite cell by passive diffusion in an inactive form. They are converted to the active form by the reduction of the nitro group through electron donation from components of the parasite's redox pathway to produce a nitro-radical anion. The cytotoxic nitro-radical anion induces breakage of trophozoites double-stranded DNA, causing their death [20]. Taking into account that we found activity of the fractions against the metronidazole-resistant isolate, it is plausible to suggest that the mechanism of action of the samples differs from that of the reference drug. This is considered a promising result as options for the treatment of trichomoniasis are scarce and the metronidazole resistance is increasing. However, further studies are needed to determine the actual mechanism of death of the active samples.

The anti-*T. vaginalis* activity by natural products derivatives has been observed. Frasson et al. [21], demonstrated *in vitro* activity of roots aqueous

extract of the plant *Polygala decumbens* from the Caatinga Brazilian biome, with MIC of 1.56 mg/mL. Additional studies in the same group pointed to the antiprotozoal potential of alkaloids of the Amaryllidaceae species against *T. vaginalis* [22].

Regarding marine natural products, a survey evaluated the activity against *T. vaginalis* trophozoites of marine fungi found in the South Brazilian Coast. A total of 42 marine-associated fungal species were selected to be screened. Of these, two filtrate from *Hypocrea lixii* and *Penicillium citrinum* showed significant growth-inhibition activity, with MIC value of 2.5 mg/mL [23]. On the basis of morphological, cultural characters and DNA sequence data analysis, *Hypocrea lixii* was found to be the sexual state of *T. harzianum* [24]. The reduction of viability of the trophozoites of the fermented *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) was also observed in our study, highlighting the potential of the activity of this fungus against *T. vaginalis*, requiring further studies in order to elucidate the molecules responsible for this activity. Direct comparison between our work with Scopel et al. [23] was not possible, since in his article the authors use crude extracts and in our study we work with fractions.

For antimicrobial activity, the organic fractions of the *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzianu*/*Hypocrea lixii* complex (FMPV 09), *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) fungi were active against *S. epidermidis* ATCC 35984. However, against *P. aeruginosa* ATCC 27853 only the organic fractions of the *Aspergillus niger* (FMPV 03) and *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06) showed activity. In this test, for both bacteria, MIC values did not exceed 1.5 mg/mL. This activity was also observed for the antibiofilm formation assay, however, this inhibition is related to antimicrobial activity of fractions, being dependent on bacterial cell death. Molecules with antimicrobial activity have been described from various species of marine fungi. The polybromide phenyl ether from marine-derived *Aspergillus* sp. fungus showed pronounced antibacterial activity against *S. epidermidis* with MIC value of 0.556 μ M [25]. Qiao et al. [26] reported antimicrobial activity against *Escherichia coli* of the indoloditerpene derivatives that were isolated from an endophytic fungus *Aspergillus oryzae*, obtained from the marine red alga *Heterosiphonia japonica*.

The ability to eradicate the biofilm was observed only in the organic fraction of the *Aspergillus flavus* (FMPV 01), which was able to remove 52 % of the already formed biofilm of the *S. epidermidis* ATCC 35984. Considering that the organic fraction of FMPV 01 is not a pure molecule and the difficulty of eradicating the already formed biofilm, which is 10 to 1000-fold more tolerant to antimicrobial agents when compared to free bacteria [27], the activity of this fraction is considered promising, with great potential to act removing biofilms of *S. epidermidis*, the most common bacteria found in medical devices.

The hemolytic assay evaluated possible cytotoxic mechanisms involving membrane damage. Our results showed that the organic fractions FMPV 01, FMPV 03, FMPV 06, FMPV 09 and FMPV 10 not caused significant hemolytic effects after one hour of incubation. This results suggesting that these fractions cause few toxic effects toward plasma membranes.

Then, the active fractions were evaluated for their cytotoxicity against mammalian cells using the HMVII and Vero cells lineages. Corroborating the result observed in the hemolytic assay, the organic fraction of the *Aspergillus niger* (FMPV 03), showed no cytotoxicity against the cell lines studied. Interestingly, although not caused notable hemolytic effect, the organic fraction of the *Aspergillus flavus* (FMPV01), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex (FMPV 09) and *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) showed cytotoxic effects against both cell lines. A similar observation has already been described for Scopel et al. [23], wherein the filtered fermentation of the *Hypocrea lixii* fungus showed strong cytotoxicity against Vero cells.

To evaluate the toxic effects *in vivo*, was used of the *Galleria mellonella* model. The *G. mellonella* model has been used in the investigation of the virulence of many human pathogens (bacteria and fungi) due to their similarities between the innate system of insects and mammals [16]. Furthermore, the toxicity of compounds has been evaluated in this model. Gilbreel and Upton [28] evaluated the toxicity of epidermicin, a novel antimicrobial peptide that has potent activity against Gram-positive pathogens, using this model. In this study, also it was not observed visible death or injury of larvae *G. mellonella*.

Almost all fractions tested displayed 100 % survival rates of *G. mellonella* larvae at the concentrations tested. All fractions tested, even at increased dose

administration of 1, 10, and 50 mg/kg of the larvae did not affect survival *G. mellonella*, even those fractions that showed cytotoxic effects against mammalian cells.

In summary, the biological activities presented by the organic fractions of *Aspergillus flavus* (FMPV01), *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), *Trichoderma harzianu/Hypocrea lixii* complex (FMPV 09), *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) fungi indicate that the metabolites responsible for the activity are extremely promising. It is important to emphasize that although some samples have shown cytotoxicity against mammalian cells (HMVII and VERO cells) *in vitro*, they had no effect on survival of *G. mellonella* larvae when the *in vivo* toxicity was evaluated. The range of activities of the metabolites from marine fungi highlights the importance of search of biomolecules in these sources, and studies in order to purify and clarify the active molecules are being carried out.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements.

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) Marine Biotechnology Program (Rede MarAtivo, grant 408578/2013-0). F. R. S., C. B. M., L. N. S., thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for fellowship. R.C., thank CNPq for fellowship. G. V. R., thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for fellowship. D. S. T. thank CNPq Universal 2014 (grant 443150/2014-1) for fellowship. A.J.M. (grant 305951/2012-2) and T.T. (grant 307447/2014-6) thank CNPq for researcher fellowships.

References

[1] J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H. Munro, M.R. Prinsep. Marine natural products, Natural product reports. 32 (2015) 116-211.

- [2] A.M. Mayer, M.T. Hamann. Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action, *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology* : CBP. 140 (2005) 265-286.
- [3] M.E. Rateb, R. Ebel. Secondary metabolites of fungi from marine habitats, *Natural product reports*. 28 (2011) 290-344.
- [4] WHO. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections - 2008, World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, Geneva. (2012).
- [5] F. Sorvillo, L. Smith, P. Kerndt, L. Ash. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans, *Emerging infectious diseases*. 7 (2001) 927-932.
- [6] B. Van Der Pol, C. Kwok, B. Pierre-Louis, A. Rinaldi, R.A. Salata, P.L. Chen, et al. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women, *The Journal of infectious diseases*. 197 (2008) 548-554.
- [7] S. Sutcliffe, C. Neace, N.S. Magnuson, R. Reeves, J.F. Alderete. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis--a proposed molecular mechanism, *PLoS pathogens*. 8 (2012) e1002801.
- [8] D.J. Helms, D.J. Mosure, W.E. Secor, K.A. Workowski. Management of trichomonas vaginalis in women with suspected metronidazole hypersensitivity, *American journal of obstetrics and gynecology*. 198 (2008) 370 e371-377.
- [9] W.E. Secor, E. Meites, M.C. Starr, K.A. Workowski. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis, *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 90 (2014) 800-804.
- [10] J.D. Sobel, V. Nagappan, P. Nyirjesy. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis--an emerging problem, *The New England journal of medicine*. 341 (1999) 292-293.
- [11] D.A. Rasko, V. Sperandio. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease, *Nature reviews Drug discovery*. 9 (2010) 117-128.
- [12] N. Hoiby, T. Bjarnsholt, C. Moser, G.L. Bassi, T. Coenye, G. Donelli, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 21 Suppl 1 (2015) S1-25.

- [13] E. Karatan, P. Watnick. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms, *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 73 (2009) 310-347.
- [14] A.L. Antunes, J.W. Bonfanti, L.R. Perez, C.C. Pinto, A.L. Freitas, A.J. Macedo, et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 106 (2011) 51-55.
- [15] A.L.S. Antunes, S.T. Danielle, J.W. Bonfanti, C.C.F. Pinto, L.R. Perez, A.J. Macedo, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci, *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 118 (2010) 873-877.
- [16] K. Kavanagh, J.P. Fallon. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence, *Fungal Biology*. 24 (2010) 79-83.
- [17] M. Saleem, M.S. Ali, S. Hussain, A. Jabbar, M. Ashraf, Y.S. Lee. Marine natural products of fungal origin, *Natural product reports*. 24 (2007) 1142-1152.
- [18] S.L. Cudmore, K.L. Delgaty, S.F. Hayward-McClelland, D.P. Petrin, G.E. Garber. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*, *Clinical microbiology reviews*. 17 (2004) 783-793, table of contents.
- [19] J.R. Schwebke, F.J. Barrientes. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50 (2006) 4209-4210.
- [20] J. Kulda. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance, *International journal for parasitology*. 29 (1999) 199-212.
- [21] A.P. Frasson, O. dos Santos, M. Duarte, D. da Silva Trentin, R.B. Giordani, A.G. da Silva, et al. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga, *Parasitology research*. 110 (2012) 2581-2587.
- [22] P.B. Vieira, R.B. Giordani, G.A. De Carli, J.A. Zuanazzi, T. Tasca. Screening and bioguided fractionation of *Amaryllidaceae* species with anti-*Trichomonas vaginalis* activity, *Planta medica*. 77 (2011) 1054-1059.
- [23] M. Scopel, O. dos Santos, A.P. Frasson, W.R. Abraham, T. Tasca, A.T. Henriques, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from the South Brazilian Coast, *Experimental parasitology*. 133 (2013) 211-216.
- [24] P. Chaverri, L.A. Castlebury, G.J. Samuels, D.M. Geiser. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex, *Molecular phylogenetics and evolution*. 27 (2003) 302-313.

- [25] M. Chen, C.L. Shao, X.M. Fu, R.F. Xu, J.J. Zheng, D.L. Zhao, et al. Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from a marine-derived *Aspergillus* sp. Fungus, *Journal of natural products*. 76 (2013) 547-553.
- [26] M.F. Qiao, N.Y. Ji, X.H. Liu, K. Li, Q.M. Zhu, Q.Z. Xue. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 20 (2010) 5677-5680.
- [27] D. Davies. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nature reviews Drug discovery*. 2 (2003) 114-122.
- [28] T. M Gibreel and M Upton. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(2013) 2269–2273.

IV. CAPÍTULO 2 – Anti-*Trichomonas vaginalis* and antimicrobial activities from metabolites of marine-associated *Aspergillus niger* fungus

Franciane Rios Senger, Rodrigo Campos, Melissa Landel, Denise Brentan Silva, Danielle Silva Trentin, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca.

Estudo em desenvolvimento.

**Anti-*Trichomonas vaginalis* and antimicrobial activities from metabolites
of marine-associated *Aspergillus niger* fungus**

Franciane Rios Senger^a, Rodrigo Campos^a, Melissa Landel^b, Denise Brentan
Silva^c, Danielle Silva Trentin^a, Alexandre José Macedo^a, Tiana Tasca^a.

Affiliation

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^b Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

^c Universidade Federal de Alagoas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

Corresponding Author

Dr. Tiana Tasca, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: tiana.tasca@ufrgs.br Phone: +55 51 3308 5325 Fax: +55 51 3308 5437

Abstract

Marine fungi have shown as source of bioactive molecules due to the diversity of secondary metabolites they produce. Trichomoniasis is the most prevalent non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide. This STD has been linked to serious health consequences, and an increase in the number of clinical isolates resistant to nitroimidazoles has been reported. On the other hand, infectious diseases caused by bacteria represent a major challenge to the current public health causing high rates of mortality and morbidity. The aim of this study was isolate, purify and elucidate the secondary metabolites from the *Aspergillus niger* fungus responsible for anti-*T. vaginalis* and antimicrobial activities. *Aspergillus niger* was isolated from marine coral *Palythoa variabilis* obtained from the coast of Alagoas, Brazil. After production of the metabolite the mycelium was separated from the medium. The mycelium was extracted with methanol and the medium with ethyl acetate. The organic fraction (ethyl acetate) was fractionated using the RP-18 column with methanol as eluent. Anti-*Trichomonas vaginalis* and antimicrobial activities and toxicity against *Galleria mellonella* model were evaluated. Organic phase from *Aspergillus niger* culture was active against *T. vaginalis* (ATCC 30236 and TV-LACM2R), *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* and was fractionated using the RP-18 column. Seven fractions were obtained, and the first (100% H₂O water), retained activity in the bioassays. The active fraction was subjected to thin layer chromatography (TLC) on silica, showing four visible bands (Ultra Violet) which stained for anisaldehyde-sulfuric acid reagent, indicating the presence of terpenoids, propylpropanoides, and/or saponins and for ninhydrin reagent, suggesting biogenic amines and/or amino acids. Using the *Galleria mellonella* larvae as model for *in vivo* assay, all fractions tested displayed 100% survival rates using dose administration of 1, 10, and 50 mg/kg. However, more studies will be performed in order to isolate and purify the metabolites responsible for the described activities.

Keywords: *Aspergillus niger*, metabolites, anti-*Trichomonas vaginalis* activity, antimicrobial activity.

1. Introduction

More than 70% of earth's surface is covered by oceans, representing one invaluable biodiversity. Marine natural products have attracted the attention due to the diversity of secondary metabolites isolated in recent decades, stimulating research in this environment (Ebada et al., 2008). Especially, marine fungi have shown promising due to the diversity of secondary metabolites (Kjer et al., 2010). It is estimated that, about 150 to 200 new compounds are identified from marine fungi annually (Moghadamtousi et al., 2015).

Aspergillus spp. are filamentous fungi known for their medical and commercial importance. Species such as *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* and *A. fumigatus* have been sources of drugs, toxins, and industrial enzymes (Sanchez et al., 2012; Bromann et al., 2014). Several novel compounds have been isolated from this genus, including alkaloids, peptides, polyketides, terpenes, sterols, and cerebroside analogues, and many of these metabolites possess interesting biological properties (Lee et al., 2013).

Trichomoniasis, caused by the flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis*, is the most common non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide (Who, 2012). This infection has been associated with serious consequences including adverse outcomes (Cotch et al., 1997), infertility (Grodstein et al., 1993), predisposition to cervical cancer (Viikki et al., 2000) and pelvic inflammatory disease (Cherpes et al., 2006). Moreover, trichomoniasis is a cofactor in human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition (Van Der Pol et al., 2008). Taking into consideration, the number of *T. vaginalis* resistant isolates has increased and that there are only two drugs, metronidazole and tinidazole, are approved by the Food and Drug Administration (USA) it is necessary to search for new alternatives for the treatment of this STD (Sobel et al., 1999; Helms et al., 2008; Secor et al., 2014).

Due to the importance of infectious diseases in modern medicine, a great challenge is development of novel therapeutic approaches for the treatment of bacterial infections (Hentzer e Givskov, 2003; Rasko e Sperandio, 2010). In the United States at least two million people get serious infections related with

bacteria resistant to one or more antimicrobials, and at least 23,000 people die each year as a direct result of this resistance (CDC, 2013). Antimicrobial resistance is related to their overuse and misuse, and the lack of development of new alternatives for treatment (Ventola, 2015).

The search for new compounds for the treatment of these infections and the remarkable potential of natural products from marine fungi, drive us to isolate, purify and elucidate the secondary metabolites from the *Aspergillus niger* fungus responsible for anti-*T. vaginalis* and antimicrobial activities.

2 Material and Methods

2.1 Fungal Material. The marine fungus *Aspergillus niger* was isolate from *Palythoa variabilis* marine coral collected from Praia da Ponta Verde, Alagoas State, Brazil, in collaboration with the PhD Melissa Landel from Federal University of Alagoas. The fungi were identified using a molecular biological protocol by DNA amplification and sequencing of the ITS region.

2.2 Cultivation and extraction. Fungus strain was grown on potato dextrose agar plates for seven days at 25 °C. One agar plug (8 mm diameter) of each strain were used to inoculate in erlenmeyers flasks containing 100 mL of 1 % glucose, 0,1 % yeast extract, 0,1 % potassium chloride, 0,1 % sodium chloride, cultivated at 25 °C under static conditions for 14 days. After this period, the mycelium was separated from the culture broth. The broth was extracted with ethyl acetate (Two times), generating an aqueous fraction and an organic fraction (EtOAc). The mycelium was extracted with methanol, yielding a methanolic fraction (Two times). Only the fraction that produced the best results were used in the subsequent fractioning. The EtOAc – soluble material (2,8 g) was then fractionated by RP-18 columns using gradient methanol:water as solvent system. Seven fractions were obtained, the fraction 1 (100 % water) was active in all biologic assays. This fraction was subjected to thin layer chromatography with water:butanol:acetic acid (5:4:1) as the mobile phase and revealed with different dyes chromatographic.

2.3 Anti-*Trichomonas vaginalis* Assay. The *T. vaginalis* isolate 30236 (from the American Type Culture Collection, ATCC, USA), and the fresh clinical isolate TV-LACM2R (metronidazole-sensitive and -resistant isolates) were used in this study. The fresh isolate was obtained at Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil, and was registered and stored by cryopreservation at -80°C in the *T. vaginalis* isolates bank of our research team (this survey was submitted and approved by the UFRGS Ethical Committee, number 18923). The assay was performed using 96-well microtiter plates with TYM medium, samples at a concentration of 1 mg/mL, and an initial inoculum of 2.6×10^5 trophozoites per mL, giving a final volume of 200 μ L. After 24 h of incubation at 37 °C (± 0.5), the number of viable trophozoites was measured using trypan blue dye exclusion (0.2% [v/v]) in hemocytometer. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.4 Bacterial growth assay. The *T. vaginalis* isolate 30236 (from the American Type Culture Collection, ATCC, USA), and the fresh clinical isolate TV-LACM2R (metronidazole-resistant isolate) were used in this study. The fresh isolate was obtained at Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil, and was registered and stored by cryopreservation at -80 °C in the *T. vaginalis* isolates bank of our research team (this survey was submitted and approved by the UFRGS Ethical Committee, number 18923). The assay was performed using 96-well microtiter plates with TYM medium, samples at a concentration of 1 mg/mL, and an initial inoculum of 2.6×10^5 trophozoites per mL (30236 ATCC), giving a final volume of 200 μ L. After 24 h of incubation at 37 °C (± 0.5), the number of viable trophozoites was measured using trypan blue dye exclusion (0.2 % [v/v]) in hemocytometer. DMSO (0.6 %) was used as vehicle control and the untreated control, the fraction was replaced by Milli-Q water. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.4 Bacterial growth assay, For the antibacterial assay, the *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as model. 80 μ L of the bacterial suspension (equivalent to 10^8 CFU/mL), 80 μ L of the fermented

fractions (concentration 1 mg/mL in the wells) and 40 μ L of tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd, England) were added to 96-well microtiter plates and incubated for a period of 24 h, at 37 °C. Bacterial growth was evaluated based on the difference between initial (t = 0 h) and final (t = 24 h) absorbance values at 600 nm in polystyrene 96-well microtiter plates. DMSO (2 %) was used as vehicle control and the untreated control, the fraction was replaced by Milli-Q water. Values higher than 100 % represent a stimulation of bacterial growth in comparison to the vehicle control. Rifampicin 8 μ g/mL and 8 μ g/mL Gentamicin sulphate (Sigma Aldrich®, USA) was used as a control for the inhibition of bacterial growth of the *S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectively. All experiments were performed in triplicate for each isolate, and with at least three independent cultures (n=3).

2.5 Cytotoxicity against *Galleria mellonella* *in vivo* model. Stock solutions of the active fraction in the biological assays (1 mg/kg, 10 mg/kg and 50 mg/kg of the larvae) were prepared. PBS was used as vehicle. Three groups of ten randomly-selected *G. mellonella* larvae (weighing 0.2 g – 0.28 g) were injected with 10 μ L of each dilution using Hamilton syringe through the last left pro-leg as described by Kavanagh e Fallon, 2010. Control groups of 10 larvae were used. Each group was injected with 10 μ L PBS. Larvae were incubated at 37 °C in Petri dishes and were observed every 24 hours, during 96 hours and examined for mortality. Larvae were considered dead when they were unmoving, failed to reorient themselves when placed on their backs and when were unresponsive to stimuli. The experiment was performed in triplicate (n=3).

3 Results

The biological activity of the fractions (aqueous phase, organic phase and methanolic phase) was screened. The organic phase from *Aspergillus niger* culture was active in all biologics assays (Figure 1).

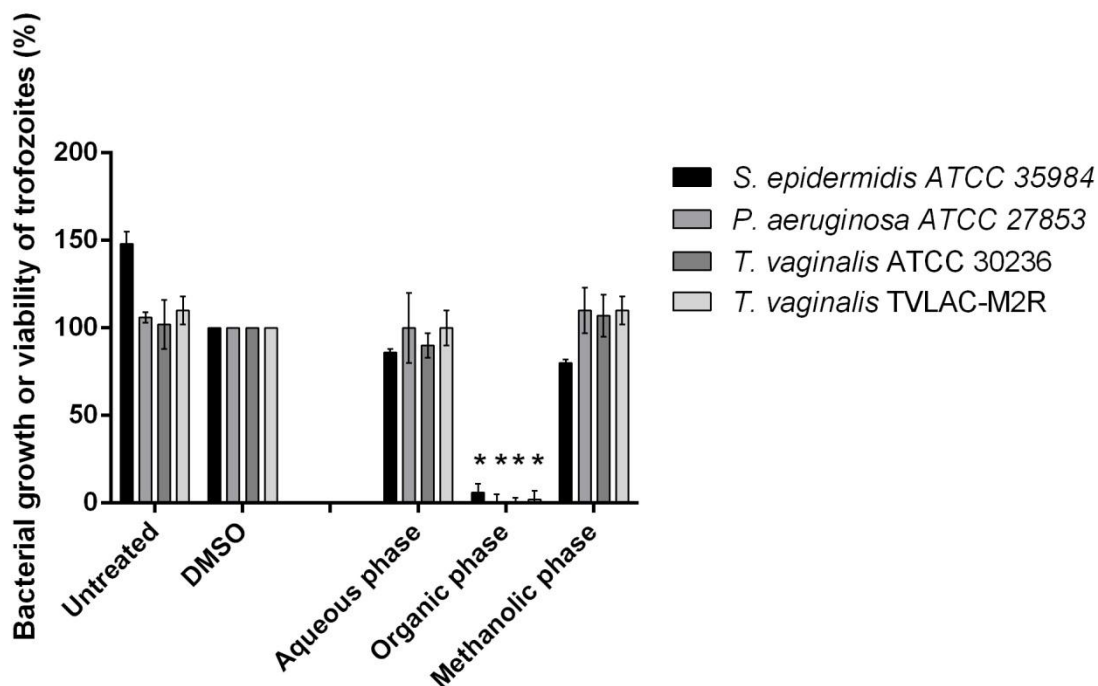


Figure 1. Anti-*T. vaginalis* e antimicrobial activity of aqueous phase (Broth), organic phase (Broth) and methanolic phase (Mycelium) obtained from fermentation of *A. niger* fungus, at the concentration of 1 mg/mL. Bars represent the mean \pm SD of three different experiments performed in triplicate. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control.

The bioguided fractionation of the organic phase (EtOAc) was performed using RP-18 column. Seven fraction were obtained, but only the first fraction (100% water) maintained the activity in all biological assays, not observed any activity in the other fractions (Figure 2 and figure 3).

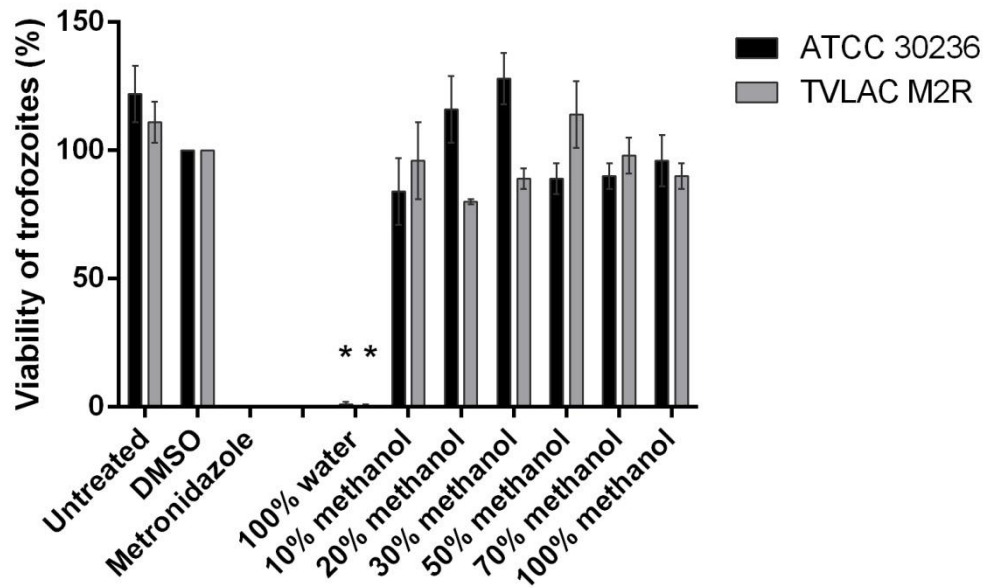


Figure 2. Anti-*T. vaginalis* activity of fraction of RP-18 column, at the concentration 1 mg/mL. Bars represent the mean \pm SD of three different experiments performed in triplicate. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control.

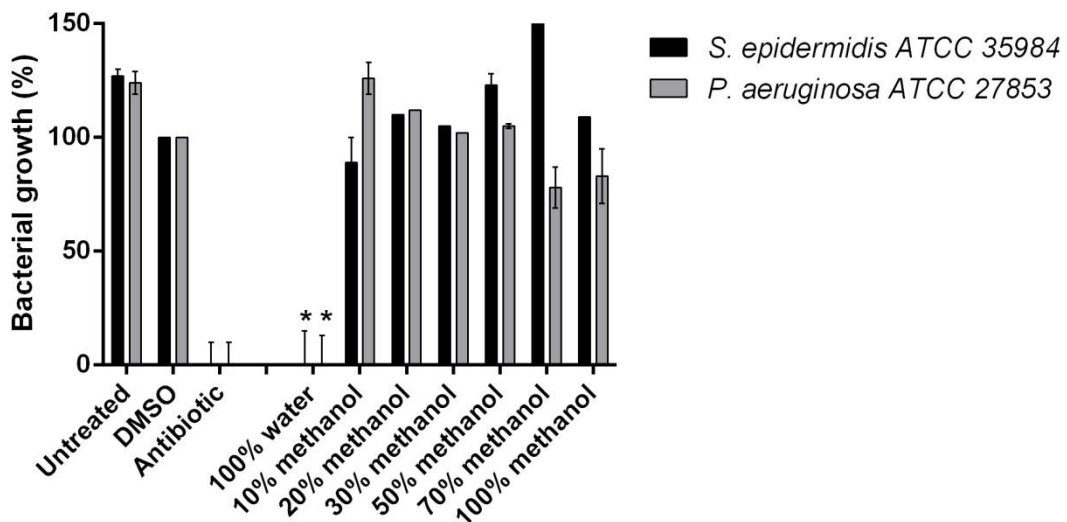


Figure 3. Antimicrobial activity obtained from fraction of RP-18 column against *S. epidermidis* ATCC 35984 and against *P. aeruginosa* ATCC 27853, at the concentration 1 mg/mL. *Represents statistical significance $p \leq 0.001$ by *t*-Student test compared with DMSO control.

The fraction 1 (100% water) was subjected to thin layer chromatography with water:butanol:acetic acid (5:4:1) as mobile phase and revealed with different dyes as observed in the table 1.

Table 1. Thin layer chromatography of the fraction 1 (100% water) revealed with different dyes.

DYES	RESULT
Iodine	Four bands
Iron-III-Chloride reagent	Negative
Natural products-polyethylene glycol reagent (NP/PEG)	Negative
Dragendorff reagent	Negative
Ninhydrin reagent	Four bands (between pink and purple)
Anisaldehyde-sulfuric acid reagent	Four bands (three blue, one green)

To investigate the *in vivo* cytotoxicity of the fraction 1 (100% water) the *G. mellonella* model was used. In this assay, it was not observed decreased the survival of the *G. mellonella* larvae (100 % survival), in the evaluated concentrations (Table 2).

Table 2. Percentage of survival of the *Galleria mellonella* larvae post injection of the fraction 1 (100% water). PBS was used as vehicle control.

Sample	Dosage Concentration (mg/kg larvae)	<i>Galleria mellonella</i> survival (Percentage)				
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control (PBS)	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100
100% water	1	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100

4. Discussion

After fermentation, biological assays were performed in order to evaluate the anti-*T. vaginalis* (ATCC 30236 and TV-LACM2R) and the antimicrobial (*S. epidermidis* ATCC 35984 and *P. aeruginosa* ATCC 27853) activities. The organic phase from *Aspergillus niger* culture was active and we start bioguided fractionation using the RP-18 column with methanol as eluent. Seven fractions were obtained, and the first (100% H₂O water), retained activity in all bioassays. The active fraction was subjected to TLC, which stained for anisaldehyde-sulfuric acid reagent, indicating the presence of terpenoids, propylpropanoide and/or saponins, and ninhydrin reagent, suggesting biogenic amines and/or amino acids (Wagner e Bladt, 1996).

Aspergillus niger is known as producer of enzymes and metabolites (Bromann et al., 2014). Li et al. (2015) described new naphthopyrans derived from marine fungus *Aspergillus niger* obtained collected mud samples from the coast of Huludao, China, with antiproliferative activity *in vitro*.

The fraction 1 (100% water) displayed 100% survival rates of *G. mellonella* larvae, even at increased dose administration of 1, 10, and 50 mg/kg of the larvae did not affect survival *G. mellonella*.

However, it is evident the potential of metabolites produced by the fungus *Aspergillus niger*, and more studies will be performed in order to isolate and purify the metabolites responsible for the described activities.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) Marine Biotechnology Program (Rede MarAtivo, grant 408578/2013-0). F. R. S. and R.C. thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for fellowship. D. S. T. thank CNPq Universal 2014 (grant 443150/2014-1) for fellowship. A.J.M. (grant 305951/2012-2) and T.T. (grant 307447/2014-6) thank CNPq for researcher fellowships.

References

BROMANN, K. et al. Isolation and purification of ent-pimara-8(14),15-diene from engineered *Aspergillus nidulans* by accelerated solvent extraction combined with HPLC. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1227-1234, 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Accessed: January 20, 2016.

CHERPES, T. L. et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sex Transm Dis**, v. 33, n. 12, p. 747-52, Dec 2006.

COTCH, M. F. et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **Sex Transm Dis**, v. 24, n. 6, p. 353-60, Jul 1997.

EBADA, S. S. et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1820-31, 2008.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **Am J Epidemiol**, v. 137, n. 5, p. 577-84, Mar 1 1993.

HELMS, D. J. et al. Management of *trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 4, p. 370 e1-7, Apr 2008.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. **J Clin Invest**, v. 112, n. 9, p. 1300-7, Nov 2003.

KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. Galleria mellonella larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology**, v. 24, p. 79-83, 2010.

KJER, J. et al. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nat Protoc**, v. 5, n. 3, p. 479-90, Mar 2010.

LEE, Y. M. et al. Marine-derived Aspergillus species as a source of bioactive secondary metabolites. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 15, n. 5, p. 499-519, Oct 2013.

LI, D. H. et al. New naphthopyrones from marine-derived fungus Aspergillus niger 2HL-M-8 and their in vitro antiproliferative activity. **Nat Prod Res**, p. 1-7, Jul 15 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. Potential Antiviral Agents from Marine Fungi: An Overview. **Mar Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4520-38, Jul 2015.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 2, p. 117-28, Feb 2010.

SANCHEZ, J. F. et al. Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era. **Nat Prod Rep**, v. 29, n. 3, p. 351-71, Mar 2012.

SECOR, W. E. et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 5, p. 800-4, May 2014.

SOBEL, J. D.; NAGAPPAN, V.; NYIRJESY, P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis--an emerging problem. **N Engl J Med**, v. 341, n. 4, p. 292-3, Jul 22 1999.

VAN DER POL, B. et al. Trichomonas vaginalis infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **J Infect Dis**, v. 197, n. 4, p. 548-54, Feb 15 2008.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, v. 40, n. 4, p. 277-83, Apr 2015.

VIIKKI, M. et al. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncol**, v. 39, n. 1, p. 71-5, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Second Edition. New York: Springer, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: 2008: World Health Organization, **Department of Reproductive Health and Research**, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9. Reproductive health matters, v.20, n.40, p.207-209, 2012

V. Discussão Geral

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da terra, possuindo uma diversidade biológica inestimável. Nos últimos anos, os produtos de origem marinha têm recebido considerável atenção e isso se deve a muitos deles possuírem diversas atividades biológicas e farmacológicas. Muito desse potencial está relacionado aos micro-organismos marinhos, como bactérias e fungos. Os fungos, particularmente, têm se mostrado uma fonte promissora de moléculas com diversas bioatividades. Em seu histórico destacam-se as atividades antitumoral, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica e antiprotozoária (Saleem et al., 2007; Rateb e Ebel, 2011; Blunt et al., 2015). Dessa forma, existe um grande potencial nos metabólitos obtidos de fungos marinhos no desenvolvimento de novos fármacos. O Brasil possui cerca de 7.000 km de zona costeira (IBGE), apresentando uma biodiversidade variada, possuindo características promissoras na obtenção sustentável de compostos com propriedades terapêuticas.

Neste sentido, o presente trabalho conduziu a avaliação da atividade biológica de derivados de fungos associados a organismos marinhos. Devido à importância das infecções causadas por *T. vaginalis* e por bactérias tanto na forma planctônica quanto de biofilme, investigou-se a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* e a atividade antimicrobiana e antibiofilme, frente a duas cepas bacterianas, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

T. vaginalis é o parasito causador da tricomoníase, sendo um sério problema de saúde pública. Por não ser uma doença de notificação compulsória, os dados de prevalência/incidência podem estar subestimados. O parasito reside no trato urogenital de homens e mulheres, causando uretrites, prostatites, vaginites, complicações na gravidez, doença inflamatória pélvica, predisposição ao câncer cervical e de próstata, infertilidade, além de atuar como um cofator na aquisição e transmissão do vírus HIV (Fichorova et al., 2012).

O metronidazol e o tinidazol são os únicos fármacos recomendados pelo FDA para o tratamento da tricomoníase. A ocorrência de casos resistentes tem sido relatada, e por não haver tratamento alternativo aos nitroimidazóis, a busca por novos compostos com mecanismos de ação distintos dos fármacos aprovados pelo FDA torna-se necessária.

Doenças infecciosas são as principais causas de mortes no mundo, sendo que as infecções bacterianas contribuem para estas altas taxas de mortalidade (Rasko e Sperandio, 2010). Nas últimas décadas a associação das doenças infecciosas graves com elevadas taxas de resistência bacteriana vêm aumentando substancialmente, dificultando o tratamento (Jones, 2001). Além disso, as bactérias patogênicas possuem fatores de virulência, que auxiliam no estabelecimento e efetivação da doença. A secreção de toxinas, o quorum sensing e a formação do biofilme fazem parte desses fatores de virulência (Hett e Hung, 2009).

A maioria das bactérias vivem organizadas na forma de biofilmes, já que dentro dessas estruturas são mais resistentes aos antibióticos e a resposta imune do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento das infecções persistentes, sendo este um importante fator de virulência (Davies, 2003). Diante disso, fica evidente a necessidade da pesquisa de novas moléculas com atividade bactericida e/ou que atuem sobre o biofilme.

Sendo assim, no Capítulo I, foi determinada a atividade das frações obtidas da fermentação de 14 fungos associados a organismos marinhos. Para avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, foi utilizado o isolado ATCC 30236, e o isolado clínico resistente ao metronidazol TV-LACM2R, nas frações que demonstraram atividade frente ao ATCC. Para determinação da atividade antimicrobiana e antibiofilme foram selecionadas as cepas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A fermentação das 14 cepas fúngicas foi realizada por 14 dias, sob condições estáticas. Após esse período, a fermentação foi interrompida e o micélio separado do caldo fermentado. O micélio foi extraído com metanol, gerando a fração metanólica. Já o meio foi extraído com acetato de etila, gerando uma fração aquosa e uma fração orgânica. Todas as frações foram submetidas aos ensaios de atividade biológica citados anteriormente.

A atividade das frações frente ao *T. vaginalis* ATCC 30236 foi avaliada. Das frações testadas, somente as frações orgânicas dos fungos *Aspergillus niger* (FMPV 03) e Complexo *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* (FMPV 09) demonstraram atividade pronunciada, com valores de MIC de 2 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. A atividade frente ao isolado clínico resistente ao metronidazol (TV-LACM2R) também foi investigada para as amostras ativas

contra o isolado ATCC. A atividade das duas frações foi mantida frente ao isolado resistente, observando-se os mesmos valores de MIC. Os valores de MIC não são considerados elevados, já que não se trata de moléculas puras, uma vez que é esperada uma redução da MIC após a purificação dos compostos ativos.

O mecanismo pelo qual o metronidazol atua corresponde à penetração do fármaco na célula por difusão passiva, posteriormente ocorre a redução do grupamento nitro pela doação de elétrons de componentes da via redox do parasito para produzir radicais ânion. Esses radicais citotóxicos induzem a quebra da dupla fita de DNA dos trofozoítos, provocando a morte (Kulda, 1999). Devido à atividade das frações ter se mantido para o isolado resistente ao metronidazol, sugere-se que o mecanismo pelo qual ocorreu a morte dos trofozoítos seja diferente do fármaco de referência, sendo esse um resultado promissor já que as opções para o tratamento da tricomoníase são escassas e existem relatos de cepas resistentes aos nitroimidazóis. No entanto, mais estudos devem ser realizados para a determinação do real mecanismo de morte das amostras ativas.

Há relatos na literatura de atividade anti-*T. vaginalis* de derivados de produtos naturais. Frasson et al. (2012) demonstraram a atividade *in vitro* do extrato aquoso das raízes da planta *Polygala decumbens*, uma planta obtida da Caatinga, observando-se uma MIC de 1,56 mg/mL. Outro estudo em nosso grupo, apontou para o potencial antiprotozoário da espécie *Amaryllidaceae* contra *T. vaginalis* (Vieira et al., 2011).

Em relação aos produtos naturais de origem marinha, foi encontrada uma pesquisa que avaliou o potencial anti-*T. vaginalis* de fungos marinhos obtidos da Costa do Sul Brasileira. Um total de 42 espécies de fungos associados a organismos marinhos foram selecionados para avaliação da atividade frente ao protozoário. Destes, duas amostras do filtrado de *Hypocrea lixii* e *Penicillium citrinum* revelaram uma significativa atividade na inibição do crescimento dos trofozoítos (ATCC 30236 e TV-LACM2R), sendo os valores de MIC encontrados 2,5 mg/mL (Scopel et al., 2013). Com base nas características culturais, morfológicas e análise de dados de sequência de DNA, *Hypocrea lixii* foi encontrado como sendo o estado sexual de *T. harzianum* (Chaverri et al., 2003) A atividade do fermentado do complexo

Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii (FMPV9) também foi observado em nosso estudo, destacando o potencial para a atividade anti-*T. vaginalis* deste fungo, necessitando de mais estudos para estabelecer as moléculas responsáveis por essa atividade.

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, as frações orgânicas FMPV 03 (Fungo *Aspergillus niger*), FMPV06 (Fungo *Aspergillus tubingensis*), FMPV09 (Complexo *Trichoderma harzianum / Hypocrea lixii*), FMPV10 (Fungo *Aspergillus sydowii*) apresentaram atividade contra *S. epidermidis* ATCC 35984. Já para *P. aeruginosa* ATCC 27853, somente as frações orgânicas FMPV 03 (Fungo *Aspergillus niger*) e FMPV06 (Fungo *Aspergillus tubingensis*) foram ativas. Importante destacar que ambas as frações foram obtidas da fermentação de fungos do mesmo gênero, enfatizando a importância desse gênero na produção de metabólitos bioativos. Nas amostras citadas acima, também foi observada atividade de antiformação de biofilme, no entanto, essa inibição da formação de biofilme está relacionada à atividade antimicrobiana das frações, dependendo da morte da célula bacteriana. A produção de moléculas com atividade antimicrobiana vem sendo observada por várias espécies de fungos marinhos. O éter fenil polibrometo isolado do fungo *Aspergillus* sp. demonstrou pronunciada atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, com um valor MIC de 0,556 µM (Chen et al., 2013). Qiao et al. (2010) relataram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* de derivados indol diterpenos, que foram isolados a partir do fungo endófito marinho *Aspergillus oryzae*, obtido da alga vermelha *Heterosiphonia japonica*.

Observou-se a capacidade de erradicar o biofilme apenas na fração orgânica do *Aspergillus flavus* (FMPV 01), o qual foi capaz de remover 52% do biofilme já formado de *S. epidermidis* ATCC 35984. Considerando-se que tratasse de uma fração e não de uma molécula pura e a dificuldade de erradicar biofilme já formado, a atividade da fração orgânica do *A. flavus* (FMPV 01) é considerada promissora, com grande potencial para agir removendo biofilmes de *S. epidermidis*.

O ensaio de hemólise avalia possíveis mecanismos citotóxicos envolvendo dano à membrana. Os nossos resultados mostram que as frações orgânicas do FMPV 01, FMPV 03, FMPV 06, FMPV09 e FMPV 10 não causaram efeitos hemolíticos notáveis após uma hora de incubação sugerindo

que as frações testadas provocam poucos efeitos tóxicos sobre a membrana plasmática.

Em seguida, as frações ativas foram avaliadas quanto à toxicidade contra as células mamíferas (Vero e HMVII). Corroborando o resultado demonstrado no ensaio de hemólise, a fração orgânica do *Aspergillus niger* (FMPV 03), não exaltou citotoxicidade contra as linhagens celulares estudadas. Curiosamente, em contraste com os resultados do ensaio hemolítico, a fração orgânica do *Aspergillus flavus* (FMPV01), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), complexo *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* (FMPV 09) e *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) demonstraram efeitos citotóxicos frente às células HMVII e Vero. Uma observação similar já foi descrito por Scopel et al. (2013), em que o filtrado fermentado do fungo *H. lixii* apresentou elevada citotoxicidade contra células Vero, corroborando os efeitos citotóxicos observados em nosso estudo para os metabólitos produzidos por esse fungo.

Para avaliar os efeitos tóxicos *in vivo*, foi utilizado o modelo de *Galleria mellonella*. Este modelo tem sido utilizado para a investigação da virulência de diversos patógenos humanos (bactérias e fungos), devido às suas semelhanças entre o sistema imune inato de insetos e mamíferos (Kavanagh e Fallon, 2010). Além disso, a toxicidade de compostos também vem sendo descrita neste modelo, como no estudo de Gilbreel e Upton, que avaliaram a toxicidade da epidermicina, um peptídeo antimicrobiano com atividade contra bactérias Gram-positivas, usando esse modelo. Nesse estudo, também não foi observado morte ou injúria visível das larvas de *G. mellonella*.

Quase todas as frações testadas exibiram taxas de 100% de sobrevivência de *G. mellonella* nas concentrações avaliadas. A sobrevivência das larvas não foi afetada mesmos com o aumento dose de 1, 10, 50 mg/kg de larva, como observado na Figura 12, mesmo naquelas frações que revelaram efeitos citotóxicos contra células epiteliais HMVII e Vero.

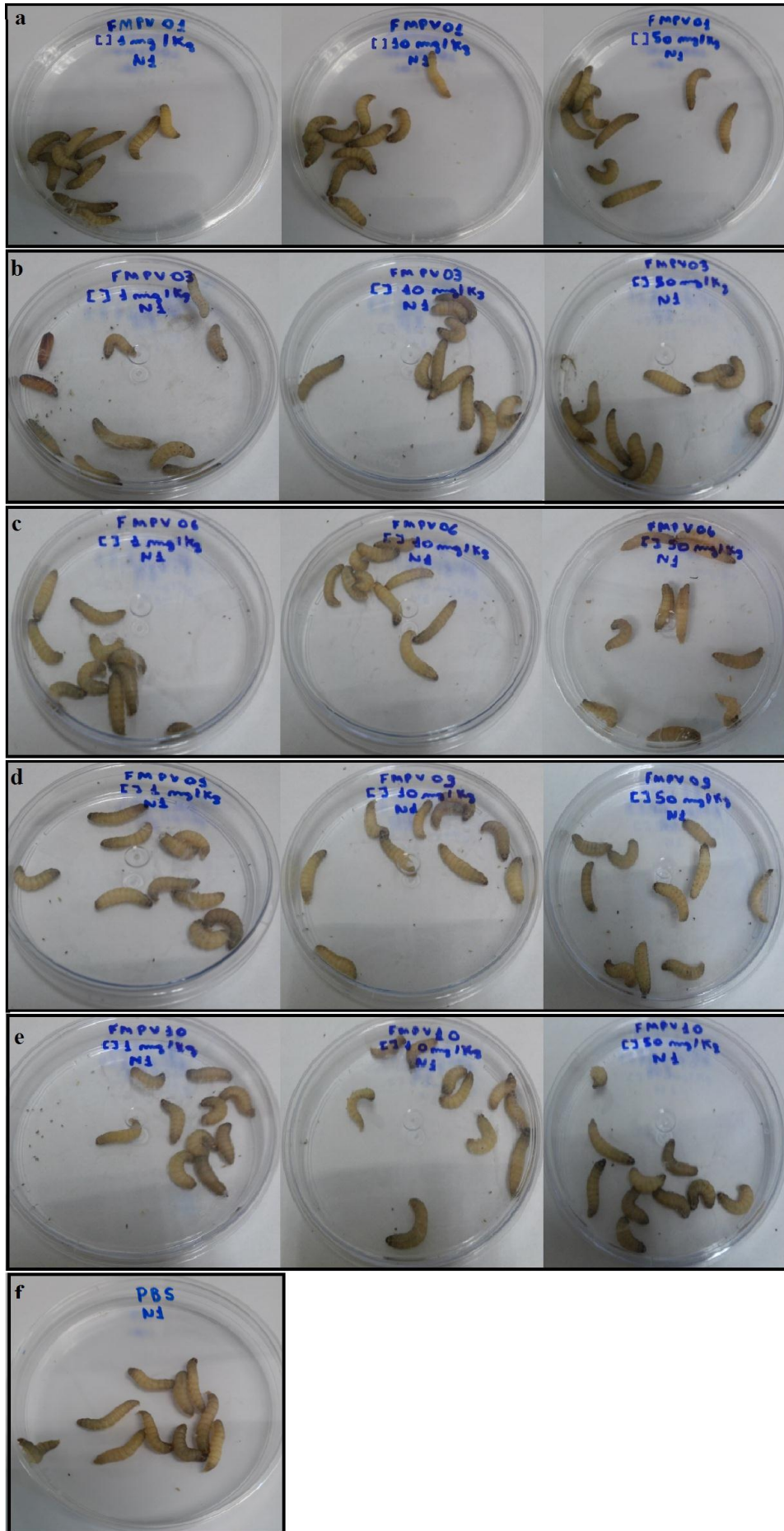


Figura 12. Larvas de *G. mellonella* após 96 horas da injeção das frações que apresentaram atividade nos ensaios biológicos, nas três concentrações testadas (1mg/kg, 10mg/kg e 50mg/kg de larva). Como pode ser observado, em nenhuma das frações orgânicas dos fungos (a) *Aspergillus flavus* (FMPV01), (b) *Aspergillus niger* (FMPV 03), (c) *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), (d) Complexo *Trichoderma harzianu* / *Hypocrea lixii* (FMPV 09) e (e) *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) ocorreu morte das lavas. (f) PBS foi utilizado como veículo.

Em resumo, as atividades biológicas apresentadas pelas frações orgânicas dos fungos *Aspergillus flavus* (FMPV01), *Aspergillus niger* (FMPV 03), *Aspergillus tubingensis* (FMPV 06), complexo *Trichoderma harzianu/Hypocrea lixii* (FMPV 09) e *Aspergillus sydowii* (FMPV 10) indicam que os metabólitos responsáveis pela atividade são extremamente promissores. É importante salientar que, embora algumas amostras tenham demonstrado efeitos de citotoxicidade *in vitro* contra células mamíferas (HMVII e Vero), não foi observado nenhum efeito sobre a sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, quando foi avaliada a toxicidade *in vivo*. As diversas atividades biológicas dos metabólitos de fungos marinhos relatadas nesse trabalho destacam a importância de estudos posteriores, a fim de purificar e elucidar os metabólitos ativos.

No Capítulo II, foi realizada a fermentação em maior escala do fungo *Aspergillus niger*, a fim de realizar o isolamento e elucidação dos metabólitos responsáveis pelas atividades anti-*T. vaginalis* (ATCC 30236 e isolado clínico resistente ao metronidazol TV-LACM2R) e atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Aspergillus spp. são fungos filamentosos conhecidos pela sua importância médica e comercial. Espécies de *Aspergillus*, como por exemplo *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, têm sido fontes de medicamentos, toxinas e enzimas industriais (Sanchez et al., 2012; Bromann et al., 2014).

O plinabulin encontra-se em estudo clínicos, sendo um análogo totalmente sintético do produto natural conhecido com hamilideo que foi isolado do fungo marinho *Aspergillus* sp. CNC-139. Possui atividade antitumoral, com um mecanismo de ação distinto, inibindo a angiogênese, desestruturando a

arquitetura vascular tumoral e induzindo a apoptose das células tumorais (Mayer et al., 2010).

Aspergillus niger também é um produtor de enzimas e metabólitos (Bromann et al., 2014). Li et al., (2015) descreveram novos naftopiranos derivados do fungo marinho *Aspergillus niger* obtido de amostras de lama recolhidas da costa de Huludao, na China, com atividade antiproliferativa *in vitro*.

A fermentação em maior escala do fungo *Aspergillus niger* manteve as mesmas condições descritas no Capítulo I desta dissertação. A fermentação foi conduzida com 20 litros de meio de cultura (Figura 13), com o objetivo de obter uma quantidade relevante do metabólito requerido.



Figura 13. Fermentação em grande escala do fungo *Aspergillus niger*, após incubação por 14 dias, a 25 °C, em condições estáticas.

Após a fermentação, os ensaios biológicos foram repetidos, a fim de confirmar a atividade anti-*T. vaginalis* (ATCC 30236 e TV-LACM2R) e a atividade antimicrobiana (*S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). Todas as atividades foram mantidas, então iniciou-se o fracionamento bioguiado, utilizando a coluna RP-18 com gradiente de metanol como eluente, da fração orgânica proveniente do caldo da fermentação do referido fungo marinho. Foram obtidas sete frações, sendo que a primeira (100% água), conservou a atividade em todos os ensaios biológicos, não sendo observada nenhuma atividade nas demais frações. A fração ativa, foi submetida à cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica, com água:butanol:ácido acético (5:4:1) como fase móvel e revelada com diferentes corantes

cromatográficos. A CCD demonstrou que a fração 100% H₂O possuía quatro bandas visíveis (Ultra Violeta), que foram coradas com reagente com reagente de ninhidrina, sugerindo a presença de aminas biogênicas e aminoácidos e anisaldeído sulfúrico, indicando a presença de terpenoides, propilpropanoides, saponinas (figura 14) (Wagner e Bladt, 1996).

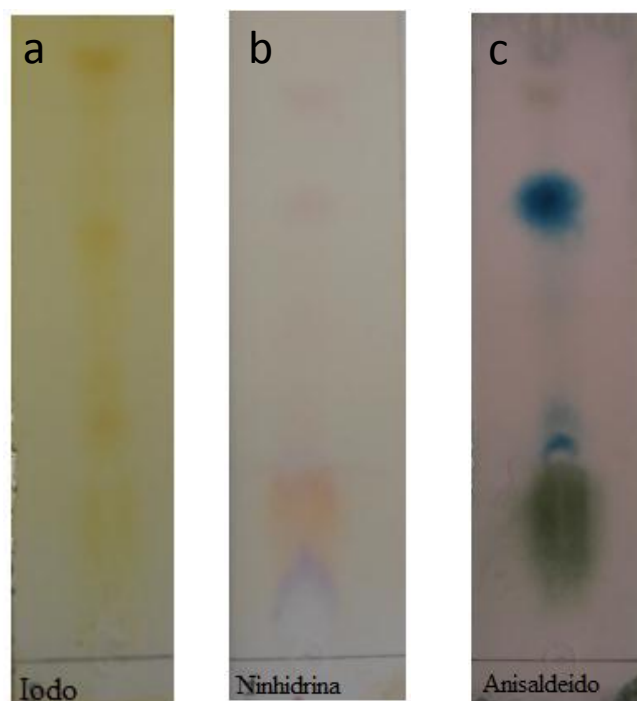


Figura 14: Cromatografia em camada delgada da fração 1 (100% água). Corada com diferentes corantes cromatográficos: a iodo, b ninhidrina e c anisaldeído.

Além disso, a fração 100 % H₂O demonstrou taxas de 100% de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, mesmo em concentrações mais elevadas (figura 15).

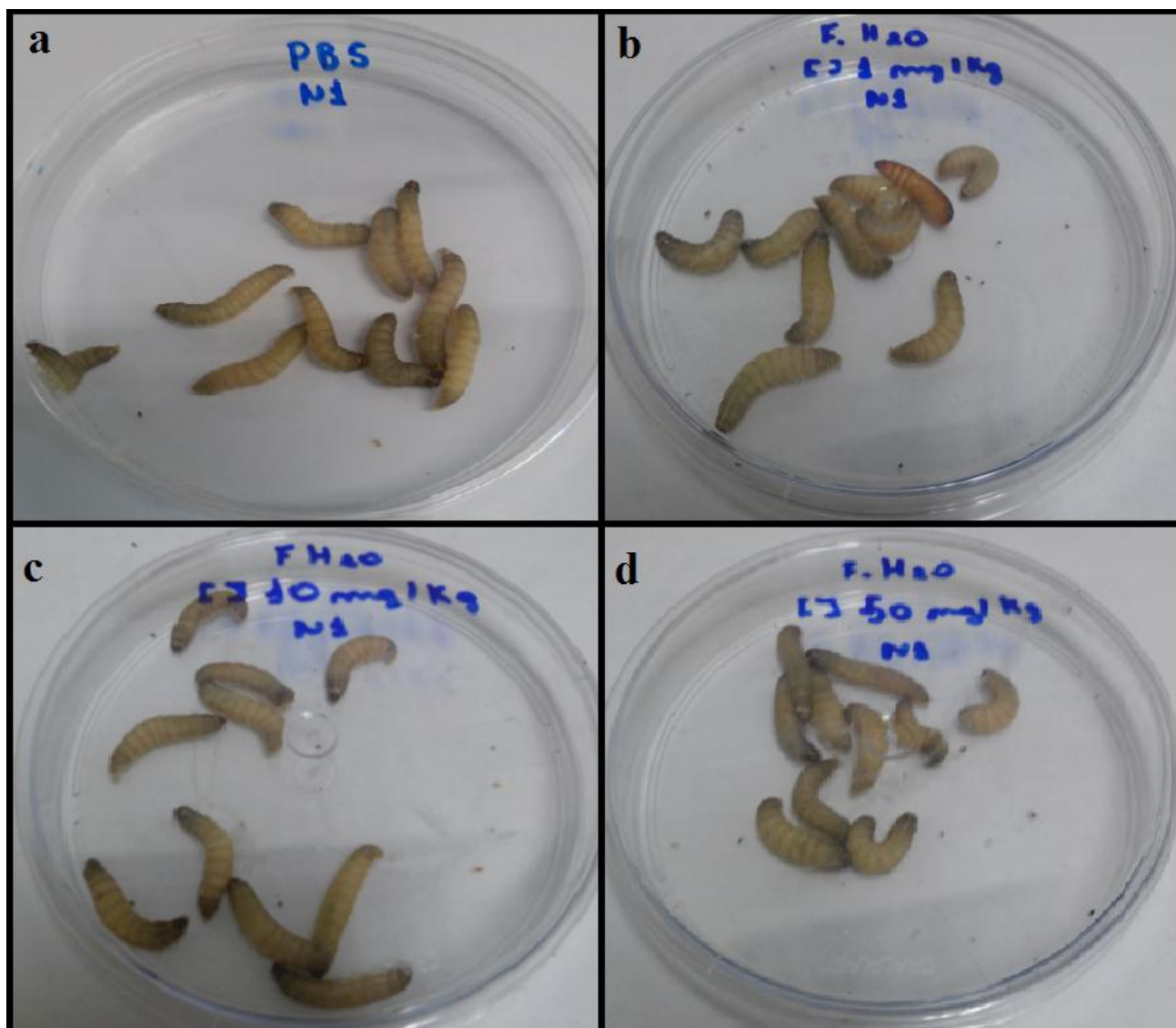


Figure 15. Larvas de *Galleria mellonella* após 96 horas da injeção da fração 1 (100% água) nas três concentrações testadas, **b** 1 mg/kg, **c** 10 mg/kg e **d** 50 mg/kg de larva. PBS foi utilizado como controle de veículo (3a).

Portanto, fica evidente o potencial dos metabólitos produzidos pelo fungo *A. niger*, sendo necessários mais estudos a fim de isolar, purificar e elucidar as moléculas responsáveis pelas atividades descritas.

VI. Conclusões Gerais

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

- As frações orgânicas dos fungos *A. niger* (FMPV 03) e complexo *T. harzianum/H. lixii* (FMPV09), apresentaram potente atividade anti-*T. vaginalis*.
- Também foi evidenciada a importante atividade antimicrobiana frente ao *S. epidermidis* das frações orgânicas dos fungos *A. niger* (FMPV 03), *A. tubingensis* (FMPV 06), complexo *T. harzianu/H. lixii* (FMPV09) e *A. sydowii* (FMPV 10) e frente a *P. aeruginosa* das frações orgânicas dos fungos *A. niger* (FMPV 03) e *A. tubingensis* (FMPV 06).
- A fração orgânica do fungo *A. flavus* (FMPV 01) foi capaz de erradicar 52% do biofilme de *S. epidermidis*.
- Apesar das frações orgânicas dos fungos *A. flavus* (FMPV 01), *A. tubingensis* (FMPV 06), complexo *T. harzianu/H. lixii* (FMPV09) e *A. sydowii* (FMPV 10) apresentarem efeitos citotóxicos frente a células HMVII e Vero, *in vitro*, nenhuma das amostras apresentou efeito tóxico na sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, nem ação hemolítica frente aos eritrócitos humanos.
- Das frações ativas, destaca-se a fração orgânica do fungo *A. niger* (FMPV 03), que além de ter apresentado atividade anti-*T. vaginalis* e antimicrobiana frente às duas bactérias testadas, não demonstrou efeito citotóxico frente aos eritrócitos humanos, às células HMVII e Vero, e no modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

O conjunto de resultados obtidos corrobora o grande potencial dos fungos de origem marinha como fonte de metabólitos com atividade anti-*T. vaginalis*, antimicrobiana e antibiofilme, sendo uma área promissora na busca de novos fármacos.

VII. Perspectivas

Frente os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se como perspectivas:

- Purificação e elucidação dos metabólitos responsáveis pelas atividades anti-*T. vaginalis*, antimicrobiana e erradicação do biofilme.
- Avaliação do mecanismo de morte do *T. vaginalis*, do *S. epidermidis* e da *P. aeruginosa* induzido pelos compostos ativos.
- Investigar os mecanismos envolvidos na erradicação do biofilme de *S. epidermidis* após o isolamento dos metabólitos ativos da fração orgânica do fungo *Aspergillus flavus* (FMPV 01).

VIII. Referências

ABRAHAM, E. P.; LODER, P. B. Cephalosporins and penicillins; chemistry and biology. **Academic Press**, p. 1-26, 1972.

AICHER, T. D. et al. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 8, p. 3162-3164, 1992.

ALKAWASH, M. A.; SOOTHILL, J. S.; SCHILLER, N. L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **APMIS**, v. 114, n. 2, p. 131-8, Feb 2006.

ANTUNES, A. L. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51-55, 2011.

ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-59, Sep-Oct 2011.

BEACH, D. H. et al. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 44, n. 1, p. 97-108, Jan 1991.

BEACH, D. H. et al. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 38, n. 2, p. 175-90, Jan 1990.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microsc Microanal**, v. 10, n. 5, p. 528-50, Oct 2004.

BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. **Tissue Cell**, v. 41, n. 3, p. 151-68, Jun 2009.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981-097, 1951.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat Prod Rep**, v. 32, n. 2, p. 116-211, Feb 2015.

BROMANN, K. et al. Isolation and purification of ent-pimara-8(14),15-diene from engineered *Aspergillus nidulans* by accelerated solvent extraction combined with HPLC. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1227-1234, 2014.

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C. **Invertebrados**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat Prod Rep**, v. 21, n. 1, p. 143-63, Feb 2004.

CARMELI, Y. et al. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1379-82, Jun 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION. Trichomoniasis. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>. Acesso em: 15 de janeiro. 2016.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso: 20 de janeiro de 2016.

CHAVERRI, P. et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. **Mol Phylogenet Evol**, v. 27, n. 2, p. 302-13,

CHEN, G.; WANG, H. F.; PEI, Y. H. Secondary metabolites from marine-derived microorganisms. **J Asian Nat Prod Res**, v. 16, n. 1, p. 105-22, Jan 2014.

CHEN, M. et al. Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from a marine-derived *Aspergillus* sp. Fungus. **J Nat Prod**, v. 76, n. 4, p. 547-53, Apr 26 2013

CHERPES, T. L. et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sex Transm Dis**, v. 33, n. 12, p. 747-52, Dec 2006.

CHUA, S. L. et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nat Commun**, v. 5, p. 4462, 2014.

CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. **Lab Med**, v. 46, n. 4, p. 277-84, Fall 2015.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 21 1999.

COTCH, M. F. et al. Trichomonas vaginalis associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **Sex Transm Dis**, v. 24, n. 6, p. 353-60, Jul 1997.

COTCH, M. F. et al. Demographic and behavioral predictors of Trichomonas vaginalis infection among pregnant women. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **Obstet Gynecol**, v. 78, n. 6, p. 1087-92, Dec 1991.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 114-22, Feb 2003.

DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 351-68, 2007.

DUNNE, W. M., JR. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 155-66, Apr 2002.

EBADA, S. S. et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1820-31, 2008.

FEOFILOVA, E. P. [The fungi kingdom: heterogeneity of physiological-biochemical properties and closeness to plants, animals, and prokaryotes]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v. 37, n. 2, p. 141-55, Mar-Apr 2001.

FICHOROVA, R. N. et al. Endobiont viruses sensed by the human host - beyond conventional antiparasitic therapy. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48418, 2012.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-33, Sep 2010.

FRASSON, A. P. et al. First report of anti-Trichomonas vaginalis activity of the medicinal plant Polygala decumbens from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2581-7, Jun 2012.

FRAZAO, B.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. **Mar Drugs**, v. 10, n. 8, p. 1812-51, Aug 2012.

GRACA, A. P. et al. Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge Erylus discophorus (Astrophorida, Geodiidae). **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78992, 2013.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **Am J Epidemiol**, v. 137, n. 5, p. 577-84, Mar 1 1993.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, Feb 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann Epidemiol**, v. 15, n. 9, p. 686-99, Oct 2005.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HAY, I. D. et al. Genetics and regulation of bacterial alginate production. **Environ Microbiol**, v. 16, n. 10, p. 2997-3011, Oct 2014.

HELMS, D. J. et al. Management of trichomonas vaginalis in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 4, p. 370 e1-7, Apr 2008.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. **J Clin Invest**, v. 112, n. 9, p. 1300-7, Nov 2003.

HETT, E. C.; HUNG, D. T. Targeting multiple biofilm pathways. **Chem Biol**, v. 16, n. 12, p. 1216-8, Dec 2009.

HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **FEBS Lett**, v. 141, n. 1, p. 106-10, May 3 1982.

HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **FEBS Lett**, v. 176, n. 1, p. 55-60, Oct 15 1984.

HOIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin Microbiol Infect**, v. 21 Suppl 1, p. S1-25, May 2015.

HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. **Trichomonads parasitic in humans**. New York: 1990.

JAIN, S.; VAHDAT, L. T. Eribulin mesylate. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 21, p. 6615-22, Nov 2011.

JONES, E. B. G. Are there more marine fungi to be described? **Botanica Marina**, v. 55, p. 343-354, 2011.

JONES, E. B. G. et al. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, p. 1-87, 2009.

JONES, R. N. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. **Chest**, v. 119, n. 2 Suppl, p. 397S-404S, Feb 2001.

KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. Galleria mellonella larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology**, v. 24, p. 79-83, 2010.

KJER, J. et al. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nat Protoc**, v. 5, n. 3, p. 479-90, Mar 2010.

KLEBANOFF, M. A. et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic Trichomonas vaginalis infection. **N Engl J Med**, v. 345, n. 7, p. 487-93, Aug 16 2001.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Illustrated Key to the Filamentous Higher Marine Fungi. **Botanica Marina**, v. 34, p. 1-61, 1991.

KOKAI-KUN, J. F.; CHANTURIYA, T.; MOND, J. J. Lysostaphin eradicates established Staphylococcus aureus biofilms in jugular vein catheterized mice. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 1, p. 94-100, Jul 2009.

KONIG, G. M. et al. Natural products from marine organisms and their associated microbes. **Chembiochem**, v. 7, n. 2, p. 229-38, Feb 2006.

KRIEGER, J. N. et al. Natural history of urogenital trichomoniasis in men. **J Urol**, v. 149, n. 6, p. 1455-8, Jun 1993.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 2, p. 199-212, Feb 1999.

LAPORT, M. S.; SANTOS, O. C.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 10, n. 1, p. 86-105, Jan 2009.

LEAL, M. C. et al. Coral aquaculture to support drug discovery. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 10, p. 555-61, Oct 2013.

LEAL, M. C. et al. Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the "supply problem" in the initial steps of drug discovery. **Mar Drugs**, v. 12, n. 7, p. 3929-52, Jul 2014.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 37-45, Feb 2000.

LI, D. H. et al. New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their in vitro antiproliferative activity. **Nat Prod Res**, p. 1-7, Jul 2015.

LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the china sea and related pharmaceutical metabolites. **Mar Drugs**, v. 7, n. 2, p. 113-29, 2009.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Med Chem**, v. 5, n. 6, p. 517-28, Nov 2009.

MACK, S. R.; MÜLLER, M. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 67, n. 2, p. 213-216, 1980.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 4, p. 893-916, Jul 2012.

MAYER, A. M. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 6, p. 255-65, Jun 2010.

MAYER, A. M.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 140, n. 3-4, p. 265-86, Mar-Apr 2005.

MEGAW, J. et al. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**, v. 139, p. 197-201, Nov 2015.

MILLER, M. R.; NYIRJESY, P. Refractory Trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative Subjects. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, n. 6, p. 595-603, Dec 2011.

MOREAU-MARQUIS, S.; STANTON, B. A.; O'TOOLE, G. A. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 21, n. 4, p. 595-9, Aug 2008.

MULLER, M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. **Annu Rev Microbiol**, v. 42, p. 465-88, 1988.

MULLER, M. The hydrogenosome. **J Gen Microbiol**, v. 139, n. 12, p. 2879-89, Dec 1993.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, v. 17, n. 3, p. 215-34, Jun 2000.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Nat Prod Rep**, v. 30, n. 4, p. 584-92, Apr 2013.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 411-2, May 2012.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 207-28, 2008.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annu Rev Med**, v. 64, p. 175-88, 2013.

PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants--issues and prevention. **Biomed Mater**, v. 3, n. 3, p. 034003, Sep 2008.

PETRIN, D. et al. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 300-17, Apr 1998.

POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of Trichomonas vaginalis. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 6, p. 418-22, Sep 2013.

PRESTON, J. N.; TRIVEDI, M. V. Eribulin: a novel cytotoxic chemotherapy agent. **Ann Pharmacother**, v. 46, n. 6, p. 802-11, Jun 2012.

PROKSCH, P. et al. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. **Botanica Marina**, v. 51, p. 209-218, 2008.

QIAO, M. F. et al. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 19, p. 5677-80, Oct 1 2010.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 2, p. 117-28, Feb 2010.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nat Prod Rep**, v. 28, n. 2, p. 290-344, Feb 2011.

RINEHART, K. L. et al. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 4512-4515, 1990.

ROCHA, J. et al. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds--an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. **Mar Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1860-86, 2011.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 11, Nov 2012.

SALEEM, M. et al. Marine natural products of fungal origin. **Nat Prod Rep**, v. 24, n. 5, p. 1142-52, Oct 2007.

SANCHEZ, J. F. et al. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. **Nat Prod Rep**, v. 29, n. 3, p. 351-71, Mar 2012.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 12, p. 4209-10, Dec 2006.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 794-803, table of contents, Oct 2004.

SCOPEL, M. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from the South Brazilian Coast. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 211-6, Feb 2013.

SECOR, W. E. et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 5, p. 800-4, May 2014.

SENA, A. C. et al. Trichomonas vaginalis infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 1, p. 13-22, Jan 2007.

SIMMONS, T. L. et al. Marine natural products as anticancer drugs. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 2, p. 333-42, Feb 2005.

SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Nat Prod Rep**, v. 26, n. 6, p. 746-57, Jun 2009.

SOBEL, J. D.; NAGAPPAN, V.; NYIRJESY, P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis--an emerging problem. **N Engl J Med**, v. 341, n. 4, p. 292-3, Jul 1999.

SORVILLO, F. et al. Trichomonas vaginalis, HIV, and African-Americans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 6, p. 927-32, Nov-Dec 2001.

SUTCLIFFE, S. et al. Sexually transmitted diseases among users of erectile dysfunction drugs. **Ann Intern Med**, v. 153, n. 8, p. 549-50; author reply 550, Oct 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

UCKAY, I. et al. Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. **Ann Med**, v. 41, n. 2, p. 109-19, 2009.

VAN DER POL, B. et al. Trichomonas vaginalis infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **J Infect Dis**, v. 197, n. 4, p. 548-54, Feb 2008.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, v. 40, n. 4, p. 277-83, Apr 2015.

VERWEIJ, J. Soft tissue sarcoma trials: one size no longer fits all. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 19, p. 3085-7, Jul 2009.

VIEIRA, P. B. et al. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-Trichomonas vaginalis activity. **Planta Med**, v. 77, n. 10, p. 1054-9, Jul 2011.

VIEIRA, P. B. et al. Natural and synthetic compound anti-Trichomonas vaginalis: an update review. **Parasitol Res**, v. 114, n. 4, p. 1249-61, Apr 2015.

VIIKKI, M. et al. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncol**, v. 39, n. 1, p. 71-5, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Second Edition. New York: Springer, 1996.

WANG, Y. T.; XUE, Y. R.; LIU, C. H. A Brief Review of Bioactive Metabolites Derived from Deep-Sea Fungi. **Mar Drugs**, v. 13, n. 8, p. 4594-616, Aug 2015.

WILLIAMS, J. A.; DAY, M.; HEAVNER, J. E. Ziconotide: an update and review. **Expert Opin Pharmacother**, v. 9, n. 9, p. 1575-83, Jun 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: 2008: World Health Organization, **Department of Reproductive Health and Research**, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9. Reproductive health matters, v.20, n.40, p.207-209, 2012

WORKOWSKI, A.K.; BOLAN, G. A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recomm Rep**, v. 64, n. RR-03, p. 1-137, 2015.

WRIGHT, A. E. et al. Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian Ecteinascidia turbinata. **Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 4508-4512, 1990.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **Int J Oral Sci**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Mar 2015.

IX. 1 Licenças para uso das figuras

20/02/2016

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account Info

Help



Title: Coral aquaculture to support drug discovery
Author: Miguel C. Leal,Ricardo Calado,Christopher Sheridan,Andrea Alimonti,Ronald Osinga
Publication: Trends in Biotechnology
Publisher: Elsevier
Date: October 2013
Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Logged in as:
Franciane Senger

LOGOUT

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Franciane Senger ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3813360465940
License date	Feb 20, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Trends in Biotechnology
Licensed content title	Coral aquaculture to support drug discovery
Licensed content author	Miguel C. Leal,Ricardo Calado,Christopher Sheridan,Andrea Alimonti,Ronald Osinga
Licensed content date	October 2013
Licensed content volume number	31
Licensed content issue number	10
Number of pages	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 2
Title of your thesis/dissertation	Marine micro-organisms as a source of bioactive metabolites: anti-Trichomonas vaginalis, antibacterial and antibiofilm activity
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size (number of pages)	250
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

Copyright © 2016 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

**ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 07, 2016

This Agreement between Franciane Senger ("You") and Royal Society of Chemistry ("Royal Society of Chemistry") consists of your license details and the terms and conditions provided by Royal Society of Chemistry and Copyright Clearance Center.

License Number	3823421465670
License date	Mar 07, 2016
Licensed Content Publisher	Royal Society of Chemistry
Licensed Content Publication	Natural Product Reports
Licensed Content Title	Secondary metabolites of fungi from marine habitats
Licensed Content Author	Mostafa E. Rateb,Rainer Ebel
Licensed Content Date	Jan 12, 2011
Licensed Content Volume Number	28
Licensed Content Issue Number	2
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/educational
Portion	figures/tables/images
Number of figures/tables/images	2
Format	print and electronic
Distribution quantity	1
Will you be translating?	yes
Number of languages	2
Order reference number	None
Languages	Portuguese
Title of the thesis/dissertation	Marine micro-organisms as a source of bioactive metabolites: anti-Trichomonas vaginalis, antibacterial and antibiofilm activity
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size	250
Requestor Location	Franciane Senger Avenida Ipiranga, 1300, Porto Alegre Porto Alegre, Brazil 90160091 Attn: Franciane Senger
Billing Type	Invoice
Billing Address	Franciane Senger Avenida Ipiranga, 1300, Porto Alegre Porto Alegre, Brazil 90160091

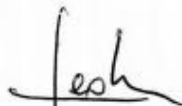
Declaração de Cessão de Direitos Autorais

Novo Hamburgo, 03 de março de 2016.

A Franciane Rios Senger,

A Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC) de Novo Hamburgo (RS) concede o uso das imagens das figuras 01, 02 e 07 do artigo **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate**, publicado na Revista Liberato (versão impressa – ISSN 1518-8043 e versão *online* – ISSN 2178-8820), v. 14, n. 22, jul./dez. 2013, de autoria de Danielle da Silva Trentin, Raquel Brandt Giordani e Alexandre José Macedo. A concessão de uso dessas figuras será para a dissertação de mestrado da requerente no Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com defesa no corrente ano.

Certificando a nossa responsabilidade pelo conteúdo apresentado, subscrevemo-nos atenciosamente.



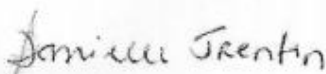
Leo Weber

Diretor Executivo



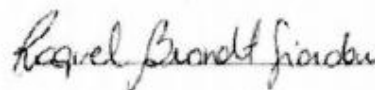
Elizabete Kuczynski Nunes

Editora Revista Liberato



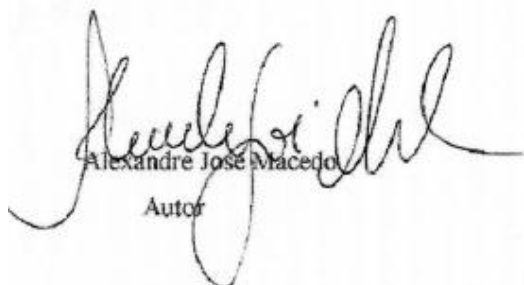
Danielle da Silva Trentin

Autor



Raquel Brandt Giordani

Autor



Alexandre José Macedo

Autor



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014

Author: N. Høiby, T. Bjarnsholt, C. Moser, G. L. Bassi, T. Coenye, G. Donelli, L. Hall-Stoodley, V. Holá, C. Imbert, K. Kirketerp-Møller, D. Lebeaux, A. Oliver, A. J. Ullmann, C. Williams

Publication: Clinical Microbiology and Infection

Publisher: Elsevier

Date: 1 May 2015

Logged in as:
Franciane Senger

[LOGOUT](#)

Copyright © 2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Franciane Senger ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3813370171793
License date	Feb 20, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Clinical Microbiology and Infection
Licensed content title	ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014
Licensed content author	N. Høiby, T. Bjarnsholt, C. Moser, G. L. Bassi, T. Coenye, G. Donelli, L. Hall-Stoodley, V. Holá, C. Imbert, K. Kirketerp-Møller, D. Lebeaux, A. Oliver, A. J. Ullmann, C. Williams
Licensed content date	1 May 2015
Licensed content volume number	21
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	25
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 01
Title of your thesis/dissertation	Marine micro-organisms as a source of bioactive metabolites: anti-Trichomonas vaginalis, antibacterial and antibiofilm activity
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size (number of pages)	250
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD

[ORDER MORE...](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: Understanding biofilm resistance to antibacterial agents

Author: David Davies

Publication: Nature Reviews Drug Discovery

Publisher: Nature Publishing Group

Date: Feb 1, 2003

Copyright © 2003, Rights Managed by Nature Publishing Group

Logged in as:

Franciane Senger

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Franciane Senger ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3813370538517
License date	Feb 20, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Drug Discovery
Licensed content title	Understanding biofilm resistance to antibacterial agents
Licensed content author	David Davies
Licensed content date	Feb 1, 2003
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Volume number	2
Issue number	2
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 4
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Marine micro-organisms as a source of bioactive metabolites: anti-Trichomonas vaginalis, antibacterial and antibiofilm activity
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size (number of pages)	250
Total	0.00 USD

[ORDER MORE...](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2016 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com