

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

**Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de metabólitos bioativos derivados  
de micro-organismos marinhos da Costa Brasileira**

**CARLA TERESINHA ENDRES**

**PORTO ALEGRE, 2020**



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

**Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de metabólitos bioativos derivados  
de micro-organismos marinhos da Costa Brasileira**

Dissertação apresentada por **Carla  
Teresinha Endres** para obtenção do  
GRAU de MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

**Orientadora: Profa. Dra. Tiana Tasca**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo**

**Porto Alegre, 2020**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22/10/2020 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Flávia Brust  
Universidade Cesuca

Profa. Dra. Patrícia Valente  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Cristina Gnoatto  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Endres, Carla Teresinha  
Atividade anti-Trichomonas vaginalis de metabólitos bioativos derivados de micro-organismos marinhos da Costa Brasileira / Carla Teresinha Endres. -- 2020.  
92 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, 2020.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Penicillium citrinum. 3. metabólitos marinhos. 4. citrinina. I. Tasca, Tiana, orient. II. Macedo, Alexandre José, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Pesquisa em Tricomonas, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS e no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, UFRGS em colaboração com a Professora Melissa Fontes Landell, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas e com a Professora Denise Brentan Silva, Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), com financiamento das agências de fomento à pesquisa CNPq e FAPERGS.



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, as quais me fazem acreditar em um mundo melhor e me encorajam a prosseguir. Obrigada por nunca soltar a minha mão e me guiar em todos os momentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por me oportunizar um ensino de qualidade e excelência.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

À Prof<sup>a</sup> Dr. Tiana Tasca agradeço por me aceitar como aluna de mestrado, mesmo sabendo que eu era uma aluna que trabalhava, que residia em outra cidade e entendendo as minhas dificuldades, me acolheu nesta jornada incrível. Durante toda nossa trajetória, muitas coisas aconteceram e além de ser uma excelente profissional, que exhibe talento e paixão para transmitir o conhecimento, é um ser humano incrível que não mede esforços para ajudar, acolher e ensinar. Obrigada pela confiança, pelos conselhos, pelas palavras, pelo carinho, pela compreensão, enfim, por tudo que vivemos juntas. Obrigada por cruzar o meu caminho.

Aos queridos amigos do GPTrico que tive a honra de conviver e aprender. Agradeço a todos que contribuíram para meu conhecimento em especial à Graziela, que desde o início me ensinou e me ajudou sempre que eu precisei. Agradeço também a Juliana e a Márcia, que muitas vezes me deram conselhos e me incentivaram a prosseguir. Aos demais colegas Mariana, Micheli, Giulia, Corina, Fernanda, Júlia, Saulo, Bruna e Brenda, agradeço os momentos de convivência que apesar de serem poucos, por quase não estarmos no mesmo laboratório e os horários serem diferentes, sinto um carinho enorme por vocês.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo, pela coorientação, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela amizade demonstrada.

À Profa. Dra. Denise Brentan Silva, pela colaboração, disponibilidade, atenção e ajuda neste trabalho. Muito obrigada por todo o carinho.

À professora Dra. Melissa Landell, pela colaboração, disponibilidade e ajuda neste trabalho.

À professora Amélia Henriques e à Mariana, pela disponibilidade para a liofilização das amostras. Obrigada por me salvar tantas vezes. Obrigada pelo carinho.

Ao pessoal do sétimo, Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, especialmente à Luciana, que desde o início me ajudou e me ensinou muito, obrigada pela paciência e atenção. À Viviane, sempre disposta a ajudar, conversar, incentivar e dar boas risadas para descontrair.

Ao meu filho, Benício. Minha surpresa mais linda, um amor inesperado que surgiu durante o mestrado e que me acompanhará para sempre. Obrigada por me escolher e me ensinar tanto.

Ao Rafael, meu namorado, namorado, marido, companheiro desta jornada, pai do meu filho...pelo incentivo, pela compreensão, pelo carinho, por tudo que passamos, por tudo que há de vir, minha eterna gratidão.

À minha mãe, por todo carinho, apoio, incentivo, ajuda e disponibilidade. Ao meu pai, onde quer que esteja. Minha família amada, especialmente meus sobrinhos Augusto e Arthur, por me proporcionar momentos tão felizes.

À minha sogra Miriana e meu sogro Luiz Alberto. Obrigada pela rede de apoio, pela disponibilidade, pelo carinho e por me tratarem como filha.

Aos meus amigos que de uma forma ou de outra, sempre estiveram presentes, perto ou longe, ajudando, colaborando e entendendo cada ausência.

A todos, minha eterna gratidão. Juntos, construímos este sonho. Todos foram muito importantes nesta trajetória, cada um com a sua contribuição na qual esta realização não seria possível. Muito obrigada.



“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa  
ignorância”.

John F. Kennedy



## RESUMO

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo causada pelo agente etiológico *Trichomonas vaginalis*, que parasita o trato urogenital humano e causa sérias consequências para a saúde. O aumento da resistência do parasito ao metronidazol requer novas alternativas para o tratamento desta doença. Os produtos naturais podem se apresentar como uma alternativa promissora com fontes de moléculas relevantes. O ambiente marinho possui uma ampla biodiversidade, tornando-se uma alternativa para a pesquisa de novos fármacos. Alguns organismos marinhos podem estar associados a bactérias e fungos os metabólitos secundários desta combinação possuem estruturas químicas diferenciadas com atividades biológicas já descritas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de fungos associados a esponjas marinhas provenientes da Costa Brasileira. Seis espécies fúngicas isoladas de diferentes organismos marinhos entre esponjas e corais foram testados. A fração marinha Ponta Verde número 15 (FMPV15), derivada do fungo *Penicillium citrinum* revelou atividade tricomonicida, e a fração FMPV 51, do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, também apresentou atividade contra os parasitos. O valor de concentração inibitória mínima (CIM) determinado foi de 0,5 mg/mL para *P. citrinum*. O extrato orgânico de *P. citrinum* foi fracionado por cromatografia em coluna por permeação em gel em Sephadex LH-20 e 12 frações foram obtidas. As frações 3A, 4A e 5A foram 100% ativas e apresentaram a citrinina com um pico de maior intensidade na identificação dos constituintes. A atividade anti *T. vaginalis* da citrinina foi de 200 µM. Considerando o impacto dessa infecção na saúde pública e a crescente resistência observada no tratamento de *T. vaginalis*, torna-se necessário a busca por novas alternativas para o tratamento da tricomoníase humana. Estes resultados destacam a importância da bioprospecção de metabólitos marinhos como moléculas de interesse farmacêutico.

**Palavras-chave:** *Trichomonas vaginalis*, *Penicillium citrinum*, metabólitos marinhos; citrinina.



## ABSTRACT

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection (IST) in the world caused by the etiological agent *Trichomonas vaginalis*, which causes serious health consequences. Increase in the resistance to metronidazole requires new alternatives for the treatment of this disease. Natural products can present themselves as a promising alternative with sources of relevant molecules. The marine environment has a wide biodiversity, making it an alternative for searching new drugs. Some marine organisms may contain associated bacteria and fungi and the secondary metabolites of this combination have different chemical structures with numerous biological activities already described. In this context, this study aimed to assess anti-*T. vaginalis* activity fungal vaginalis associated with marine sponges from the Brazilian coast. Six fungal species isolated from different marine organisms including sponges and corals were tested. The marine fraction Ponta Verde number 15 (FMPV15), derived from the fungus *Penicillium citrinum* showed trichomonic activity, and the fraction FMPV 51, from the fungus *Trichoderma longibrachiatum*, also showed activity against the parasites. The minimum inhibitory concentration (MIC) value determined was 0.5 mg / mL for *P. citrinum*. The organic extract of *P. citrinum* was fractionated by column chromatography by gel permeation in Sephadex LH-20 and 12 fractions were obtained. Fractions 3A, 4A and 5A were 100% active and presented citrinine with a peak of greater intensity in the identification of constituents. The anti *T. vaginalis* activity of citrinine was 200 µM. Considering the impact of this infection on public health and the growing resistance observed in the treatment of *T. vaginalis*, it is necessary to search for new alternatives for the treatment of human trichomoniasis. These results highlight the importance of bioprospecting marine metabolites as molecules of pharmaceutical interest.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*, *Penicillium citrinum*, marine metabolites; citrinin.



## SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
2	Revisão do tema.....	19
2.1	<i>Trichomonas vaginalis</i> .....	19
2.2	Tricomoníase.....	20
3	Produtos naturais.....	25
3.1	Produtos naturais marinhos.....	26
3.1.1	Esponjas marinhas .....	27
3.1.2	Fungos.....	28
3.1.3	<i>Penicillium citrinum</i> .....	29
3.1.4	Citrinina.....	30
3.1.5	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	31
4	Objetivos.....	33
5	Capítulo I .....	35
6	Discussão Geral.....	71
7	Conclusões .....	77
8	Perspectivas .....	78
9	Referências bibliográficas.....	79





## 1 Introdução

*Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado que parasita o trato urogenital humano, agente causador da tricomoníase. A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) de origem não viral mais comum no mundo. O total estimado de casos de ISTs no mundo é de 376,4 milhões, sendo que destes, 156 milhões são de tricomoníase, enquanto que 127,2 milhões são de clamídia, 86,9 milhões de casos de gonorreia e 6,3 milhões de casos de sífilis. A estimativa de prevalência global e incidência de infecção urogenital com tricomoníase com idades entre 15 e 49 anos é de 5,3% nas mulheres, somando mais casos que gonorreia, sífilis e clamídia juntos enquanto que para homens o total é de 0,6% (ROWLEY et al., 2019).

A doença está associada a diversas consequências à saúde e as manifestações clínicas podem variar desde a apresentação assintomática até vaginite (Lehker e Alderete, 2000). Além de complicações para a saúde, a tricomoníase implica em um alto custo para o sistema de saúde pública. As chances de desenvolver câncer prostático e cervical devido a tricomoníase são exemplos de doenças que oneram o tratamento (SUTCLIFFE et al., 2010). O aumento do risco de contrair o vírus da imunodeficiência humana (HIV), também gera custos exorbitantes. Um estudo nos Estados Unidos estimou que 750 novos casos ao ano de infecção pelo HIV foram facilitados pela presença do parasito, gerando, aproximadamente, um custo anual de U\$ 167 milhões por ano (CHESSON et al., 2004).

O método mais utilizado para o diagnóstico laboratorial é o direto a fresco, mas apresenta baixa sensibilidade. A tricomoníase não é uma doença de notificação compulsória e não há vigilância do desenvolvimento de resistência, deixando de ser evidenciada nos programas de saúde pública e controle de ISTs. Os fármacos recomendados pelo *Food an Drug Administration* (FDA, USA) são o metronidazol (MTZ) e o tinidazol (TNZ) (WORKOWSKI e BOLAN, 2015). Ambos pertencem à classe dos 5-nitroimidazóis, porém, o fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase é o MTZ, mas a utilização pode apresentar efeitos adversos e ocasionar resistência (VIEIRA et al., 2017). A principal causa de falha no tratamento está na resistência desenvolvida pelo *T. vaginalis* ao MTZ. Estima-

se que aproximadamente 2,5 a 9,6% dos casos de tricomoníase apresentem algum nível de resistência no tratamento com MTZ (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Considera-se um agravante os casos emergentes de resistência dos isolados frente aos fármacos disponíveis (DUNNE et al., 2003).

A dificuldade de acesso da população de baixa renda e a eficácia de métodos que facilitem o diagnóstico da tricomoníase, bem como outras ISTs é um dos fatores que contribui para o aumento de casos (HOBBS e SEÑA, 2013). Assim, considerando a alta prevalência mundial da tricomoníase, a resistência ao fármaco de escolha para o tratamento e as consequências da transmissão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), esta doença torna-se cada vez mais preocupante para a saúde pública. Diante deste contexto, a busca por novos compostos com mecanismos de ação diferentes e potencial terapêutico para o controle da tricomoníase faz-se necessária e de extrema relevância.

Os produtos naturais de origem marinha oriundos, principalmente, de fungos associados a organismos como esponjas, despertam um interesse especial nos pesquisadores devido às suas estruturas e diversas atividades biológicas. Nos últimos anos, vários compostos vêm sendo isolados de fungos associados a organismos marinhos, incluindo terpenoides, alcaloides, policetídeos, peptídeos, esteroide, entre outros (Graça et al., 2013). Já foram descritos alguns compostos com atividades antitumoral, antibacteriana, antioxidante, antiviral, antiinflamatória e antiprotozoária (RATEB E EBEL, 2011; CHEN et al., 2014).

Neste contexto, a costa brasileira apresenta um campo promissor no descobrimento e desenvolvimento de novas biomoléculas com atividades biológicas. Devido à sua extensão e riqueza, é fonte de uma diversidade imensurável, com grande importância para o campo da pesquisa. Com base no exposto, este estudo avaliou a atividade anti-*T. vaginalis* de metabólitos produzidos por microrganismos isolados de organismos marinhos objetivando a obtenção de novos candidatos a fármacos tricomonídeos.

## 2 Revisão do tema

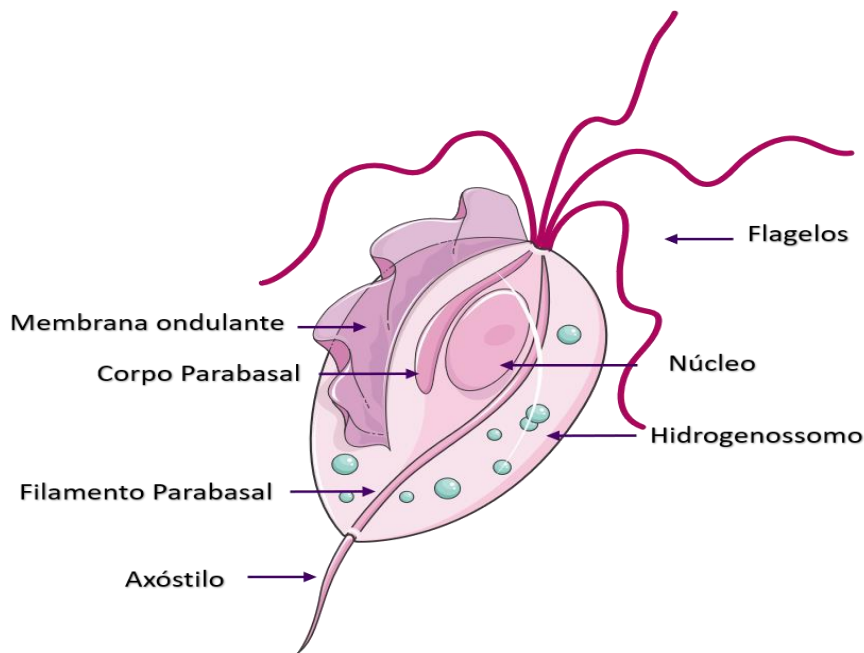
### 2.1 *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado membro da família Trichomonadidae, da ordem Trichomonadida, da classe Parabasalia e do filo Zoomastigina. Este parasito foi descrito pela primeira vez em 1836 pelo médico Alfred Donné, encontrado em amostra de secreção vaginal humana (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). O patógeno coloniza o sistema reprodutivo feminino e a uretra masculina, sendo o ser humano o único hospedeiro natural. Até ser relacionado com a vaginite, o parasito era considerado inofensivo (FICHOROVA, 2009). Esta espécie de *Trichomonas* é a mais estudada, justificando-se pelo fato de o protozoário ter a capacidade de parasitar o trato genitourinário humano causando infecção, denominada tricomoníase.

O *T. vaginalis* não possui estágio cístico, apenas trofozoítico, e possui a capacidade de alterar a sua morfologia, de formato piriforme, elipsoide ou oval em culturas axênicas para ameboide quando entra em contato com células epiteliais vaginais (CEVs) (PETRIN et al., 1998). Formas arredondadas com flagelos internalizados muito semelhantes a cistos, mas sem apresentar parede cística verdadeira também podem ser encontradas. Estas formas são conhecidas como pseudocistos ou formas endoflagelares (PEREIRA-NEVES et al., 2003). Condições físico-químicas como temperatura, pH, tensão de oxigênio e força iônica podem afetar sua forma (PEREIRA-NEVES et al, 2007). O parasito pode formar pseudópodes para captar alimentos e fixar-se em superfícies sólidas (PEREIRA-NEVES et al., 2016).

O trofozoíto possui cinco flagelos, quatro estão localizados na região anterior e o quinto aderido à membrana ondulante do parasito (figura 1). Estes flagelos são estruturas responsáveis pela motilidade característica do protozoário. O núcleo está localizado próximo à extremidade anterior circundado por um envelope nuclear poroso, como em outros eucariotos. O *T. vaginalis* possui axóstilo, uma estrutura rígida e hialina que se projeta a partir da pelta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade (BENCHIMOL, 2004). *T. vaginalis* não possui mitocôndrias e no lugar dessas organelas o parasito apresenta hidrogenossomos, responsáveis pela síntese de ATP com formação de

hidrogênio molecular nos organismos anaeróbios (BENCHIMOL, 2009).



**Figura 1** - Morfologia característica de trofozoítio de *Trichomonas vaginalis*: axóstilo, filamento parabasal, corpo parabasal, flagelos, hidrogenossomo, membrana ondulante e núcleo. (Figura da Autora com elementos gráficos de :<http://www.servier.com.br/content/banco-de-imagens>).

## 2.2 Tricomoníase

Quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia e sífilis, ambas com 36,4 milhões, e a infecção causada por *Chlamydia*, com 100,4 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos, a prevalência mundial da tricomoníase é muito maior (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Em um estudo realizado o total estimado de casos de IST foi de 376,4 milhões, sendo que 156 milhões eram de tricomoníase (ROWLEY et al., 2019). Um outro estudo realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no ano de 1987, mostrou uma taxa de prevalência da tricomoníase de 37,5% entre as mulheres gaúchas (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2010).

Mulheres infectadas, quando sintomáticas, costumam manifestar irritação, prurido, edema, eritema vaginal, corrimento e odor. Em alguns casos ocorre a presença de *colpitis macularis*, um sinal específico da tricomoníase que consiste em pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical em conjunto com edema e eritema no local da infecção (LEHKER e ALDERETE, 2000; MILLER e

NYIRJESY, 2011).

Atualmente, cerca de 80% dos casos de tricomoníase são assintomáticos, fato que eleva o risco de transmissão e a cronicidade da doença (MENEZES et al., 2016). Doença inflamatória pélvica, parto prematuro, baixo peso do bebê ao nascer, complicações na gravidez e infertilidade são algumas das consequências dessa infecção (VAN DER POL et al., 2008; SILVER et al., 2014; KISSINGER, 2015). A cronicidade da infecção está associada a um atraso no início do tratamento, com risco aumentado de desenvolver câncer do colo do útero (LAZENBY et al., 2014) e câncer de próstata (HIRT e SHERRARD, 2015). Em homens sintomáticos, a infecção está associada à uretrite, epididimite, infertilidade e função espermática reduzida (FICHOROVA, 2009).

Com uma estimativa de 16.590 novos casos, o câncer do colo uterino, também denominado câncer cervical, corresponde a 7,4% das neoplasias em mulheres no Brasil, atualmente. O câncer de próstata, representa um total de 29,2% em homens, com 65.840 casos registrado no Brasil na atualidade (INCA, 2020). Uma vez que a reação de inflamação resultante da infecção por *T. vaginalis* causa anomalias celulares, estudos relacionam o desenvolvimento destas neoplasias na presença do parasito (SUTCLIFFE, 2010; ZHANG e BEGG, 1994).

O patógeno também atua como cofator na aquisição e transmissão do HIV (VAN DER POL, et al., 2008, KISSINGER e ADAMSKI, 2013). A associação da tricomoníase com o aumento da transmissão do HIV já é bem estabelecida (MASON et al., 2005; VAN DER POL et al, 2008; KISSINGER e ADAMSKI, 2013). Estudos comprovaram que a tricomoníase está associada a um aumento de até 2,7 vezes no risco de contrair HIV (POOLE & MCCLELLAND, 2013). O risco de aquisição do HIV é potencializado pela tricomoníase por três mecanismos: dano na monocamada do hospedeiro, o recrutamento de linfócitos TCD4 + macrófagos à mucosa vaginal e cervical e secreção de peptidase degradando o inibidor de peptidase leucocitária secretória, que é o fator de proteção das mucosas contra patógenos que desempenha um importante papel na transmissão do HIV (GILBERT et al., 2000; KISSINGER e ADAMSKI, 2013).

Para driblar a resposta imunológica do hospedeiro e estabelecer a infecção, o parasito desenvolveu mecanismos complexos e multifatoriais. As condições da microbiota vaginal, a redução da quantidade de *Lactobacillus* e a presença de alguns microrganismos como *Candida albicans* por exemplo, facilitam o

desenvolvimento da tricomoníase (OZÇELIK et al., 2012). A patogenia do *T. vaginalis* envolve diferentes mecanismos de interação com macromoléculas, células e tecidos, num processo complexo de múltiplos passos (ALDERETE et al., 2004). O processo envolve inicialmente a citoaderência às células epiteliais vaginais através do lipofosfoglicano (TvLPG) (BASTIDA-CORCUERA et al., 2013) e das adesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) (ALDERETE et al. 1995; GARCIA e ALDERETE, 2007). Quando estabelecido o contato com as células epiteliais vaginais (CEVs), o protozoário modifica sua morfologia de piriforme para ameboide, permitindo um contato maior e mais eficiente com as células (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012). Ao romper a barreira de muco pela secreção de mucinases, para solubilizar a mucina (glicoproteína formando uma barreira física contra a invasão de patógenos), permitem o avanço na matriz. Com o auxílio do movimento flagelar, podem alcançar e danificar o complexo juncional das células hospedeiras, promovendo a lise e fagocitose das CEVs, ocasionando dano ao epitélio (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; HINDERFELD et al. 2019). Após este processo, ocorre uma resposta inflamatória específica e liberação de citoninas e quimiocinas pelas CEVs, como interleucina-8, interleucina-6 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-3 $\alpha$ ) (FICHOROVA, 2009), além de induzir a produção de óxido nítrico por células imunes, que também atua no combate ao microrganismo infeccioso (FRASSON et al., 2012). Os neutrófilos são as principais células de defesa envolvidas e são capazes de matar o parasito através de trogocitose, um mecanismo em que os parasitos recebem pequenas “mordidas” que levam à morte (MERCER et. al., 2018). Como forma de controlar o avanço da infecção, o sistema imunológico humoral produz imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, no entanto, esses anticorpos protegem de forma limitada ao *T. vaginalis*, porque os níveis vão decaindo gradualmente após a eliminação da infecção em um período de seis a doze meses (MENEZES et al., 2016).

O mimetismo molecular é um dos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro durante a infecção (MERCER e JOHNSON, 2018), degradação das imunoglobulinas e da porção C3 do complemento pela secreção de peptidases (HERNANDEZ-GUTIERREZ et al., 2004) e a variação fenotípica, podendo estar associada à presença do simbiote *T. vaginalis* vírus (TVVs) (KHOSHANAN e ALDERETE, 1994). A única classe de medicamentos aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA/USA) é a dos 5-nitroimidazóis, sendo

que os recomendados para o tratamento da tricomoníase são o metronidazol (MTZ) e o tinidazol (TNZ). O MTZ é o fármaco de escolha, mas pode apresentar efeitos adversos e também gerar resistência (VIEIRA et al., 2017). O tratamento preconizado ocorre via oral, 2g em dose única ou 500 mg duas vezes ao dia por 7 dias (WORKOWSKI e BOLAN, 2015).

Metronidazol e tinidazol apresentam o mesmo mecanismo de ação e atuam na forma de pró-fármaco, sendo ativados após entrada por difusão passiva no parasito. O mecanismo de ação do MTZ ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que após penetrar no parasito o fármaco é ativado no hidrogenossomo. A produção de hidrogênio é inibida e ocorre a liberação de radicais nitro tóxicos, induzindo a quebra da fita de DNA, desestabilizando a estrutura e levando à morte do parasito (KULDA, 1999).

O mecanismo de resistência aos 5-nitroimidazóis em *T. vaginalis* ainda não foi bem elucidado e vias aeróbica e anaeróbica têm sido sugeridas. Na resistência clínica (aeróbica), observada na presença de oxigênio, ocorre a redução da toxicidade do MTZ pela re-oxidação dos ânions de radicais nitro antes de danificar o parasito, modificando-o para a forma inativa (BRADIC et al., 2017). Inúmeras enzimas são responsáveis pela doação de elétrons para a ativação do MTZ, como exemplos a ferredoxina (FD), piruvato-ferredoxina oxirredutase (PFOR), enzima málica e a tioredoxina redutase citosólica (TrxR). As cepas anaerobicamente resistentes são marcadas pela ausência da atividade destas enzimas, que normalmente ativariam o MTZ (LEITSCH et al., 2009). Efeitos adversos estão frequentemente associados a esses medicamentos, tais como náuseas, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência, (MILLER e NYIRJESY, 2011) reação a álcool tipo “dissulfiram” e gosto metálico na boca (CUDMORE et al., 2004; KISSINGER, 2015). Durante a gestação, o MTZ também pode ser utilizado e é recomendado pelo *Centers for Disease Control* (CDC) dos Estados Unidos (EUA), pois a mutagenicidade e teratogenicidade não foram comprovadas em estudos recentes (SHEEHY et al., 2015; VIEIRA et al., 2017) porém a utilização durante o período da amamentação demanda cuidados para diminuir a exposição do bebê ao medicamento. É recomendado interromper o aleitamento materno de 12 a 24 horas após a ingestão de 2 g de MTZ (VIEIRA et al., 2017).

Apesar de ser a primeira escolha no tratamento da tricomoníase, o MTZ apresenta falhas terapêuticas e aproximadamente 160.000 pessoas nos EUA e

mais de 10 milhões no mundo necessitam tratamento alternativo (SECOR et al. 2014). O primeiro relato de falha no tratamento com MTZ em paciente infectada por *T. vaginalis* ocorreu em 1962, três anos após a introdução do fármaco no mercado (ROBINSON, 1962).

Estudos indicam que as reações adversas têm sido uma das causas da falta de adesão ao tratamento com MTZ e o aumento da resistência está espalhado pelo mundo, tornando-se uma preocupação mundial (VARGAS et al., 2018).

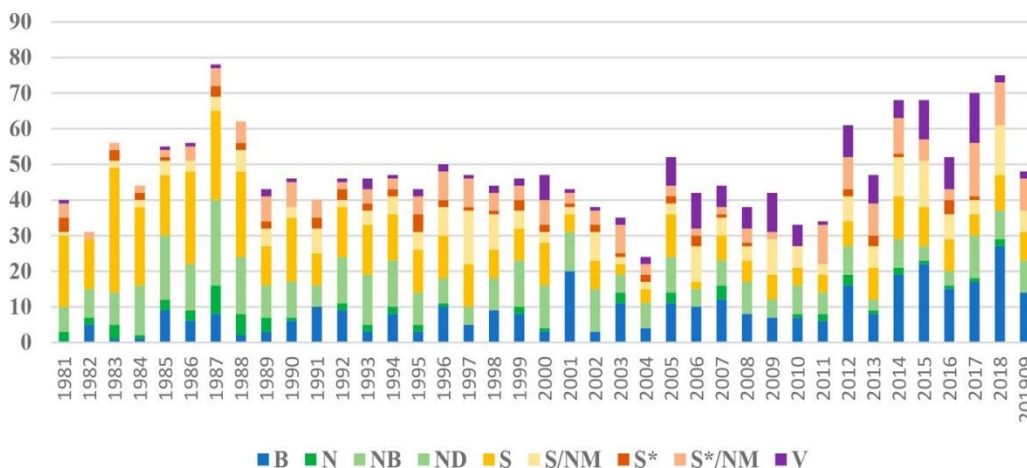


### 3 Produtos naturais

O uso de produtos naturais para tratar problemas de saúde ocorre desde a pré-história. Há cerca de 2600 anos a.c. já eram utilizadas plantas com fins medicinais na Mesopotâmia, conforme registros, ainda são utilizadas para o tratamento de tosse, resfriados, infecções parasitárias e inflamações (HALBERSTEIN, 2005). Devido a grande variabilidade de metabólitos secundários funcionalmente relevantes de espécies microbianas e vegetais, os produtos naturais e as estruturas relacionadas são consideradas fontes essenciais para novos produtos farmacêuticos. Estima-se que cerca de 35% dos fármacos aprovados são originárias de produtos naturais ou derivados semi-sintéticos (NGO et al., 2013). De acordo com a revisão de NEWMAN e CRAGG (2020), 1881 agentes terapêuticos derivados de produtos naturais foram aprovados nos últimos 39 anos (figura 2). Nesse período, o número de antiparasitários aprovados foi considerado baixo, totalizando apenas 20, tendo em vista o grande número de pessoas afetadas por parasitas em todo o mundo.

A descoberta da penicilina intensificou a investigação de microrganismos para potenciais antibióticos e a descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais revolucionou a medicina. Dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e/ou pela European Medical Agency (EMA), por volta de um quarto são derivados de plantas, alguns bem conhecidos como paclitaxel e morfina. Nos últimos 20 anos, em torno de um terço dos medicamentos aprovados pela FDA são baseados em produtos naturais ou derivados, incluindo a tetraciclina e a ciclosporina, por exemplo (THOMFORD et al., 2018).

Os produtos naturais se tornaram uma importante fonte de novos medicamentos (NEWMAN & CRAGG, 2003). Na área antitumoral houve avanços significativos nos anos de 2011 a 2014, com grande contribuição para novos fármacos (NEWMANN & CRAGG, 2016).



**Figura 2:** Todos os medicamentos aprovados por fonte/ano; n=1881, onde B: biológico (proteína ou peptídeo; N: produto natural; NB: produto natural botânico; ND: derivado de produto natural; S: produto sintético; S\*: Feito por síntese total; V: vacina; NM: imitação natural do produto (NEWMAN e CRAGG, 2020 – artigo open access que permite cópia e redistribuição ou adaptações para fins não comerciais. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 3, 770-803).

### 3.1 Produtos naturais marinhos

Os oceanos constituem uma rica diversidade química e biológica, contendo 233.300 espécies marinhas já descritas (WORMS, 2020) cobrindo mais de 70% da superfície terrestre (SIMMONS et al., 2005). A costa brasileira, possui mais de 7.000 km de extensão (IBGE), constituindo uma biodiversidade com grande reserva de moléculas a serem descobertas. Considerada uma fonte promissora de substâncias bioativas, os microrganismos marinhos produzem toxinas, pigmentos e uma infinidade de produtos químicos com propriedades e atividades diferentes. Já foram relatados mais de 20.000 metabólitos bioativos produzidos por microrganismos marinhos (RIERA-ROMO et al., 2020). Dois grupos de microrganismos marinhos que se destacam são os fungos e cianobactérias, produtores de estruturas químicas complexas e únicas com um grande potencial farmacológico (HASAN et al., 2015). O isolamento dos nucleosídeos espongotimidina e esponouridina a partir da esponja *Cryptothetya crypta* (BERGMANN e FEENEY, 1950) é considerado o princípio da busca de produtos naturais oriundos do meio marinho. A descoberta destes compostos despertou o interesse pela busca de novos metabólitos de esponjas marinhas (BERGQUIST, 1978). Posteriormente, em um estudo de análogos sintéticos dessas substâncias

chegou-se ao desenvolvimento do agente antiviral vidarabina (ARA-A), que hoje é utilizado para o tratamento de herpes simplex e herpes zoster e do agente anticâncer citarabina (ARA-C), indicado para o tratamento de leucemia aguda não linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia das meninges. Estes são considerados os primeiros fármacos comercializados derivados de produtos oriundos do mar (PASSOS, 2013).

Uma enorme variedade de atividades foi identificada no ambiente marinho, incluindo atividades antibacteriana, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória, antiprotozoária, antituberculose, antiviral, antitumoral e citotóxica, muitas das quais podem ser atribuídas a enzimas específicas (RATEB and EBEL, 2011; CHEN et al., 2014).

### 3.1.1 Esponjas marinhas

Os invertebrados marinhos, especialmente as esponjas, representam uma fonte importante de potenciais produtos naturais ativos e biologicamente funcionais (OSINGA et al., 2001). As esponjas, do Filo Porífera, estão entre os animais multicelulares mais antigos (metazoários) (LAPORT et al., 2009). Atualmente, estão descritas 9.345 espécies e destas, 9.083 são classificadas como marinhas (WORMS, 2020).

As esponjas marinhas podem produzir substâncias bioativas para defesa química contra predadores naturais. Os metabólitos secundários atuam como fatores cruciais para atrair, deter ou matar outros organismos, aumentando suas chances de sobrevivência e são produzidos em circunstâncias específicas para finalidades diferentes. As esponjas funcionam como incubadoras de microrganismos específicos associados, como bactérias e fungos, que também podem contribuir para a produção de compostos bioativos (PETERSEN et al., 2020). A produção de metabólitos secundários pelas esponjas normalmente acontece pela necessidade de competição por espaço com outros organismos e proteção contra peixes, predadores e microrganismos patogênicos, principalmente (PAUL et al., 2006). De acordo com BLUNT et al., (2015) as esponjas e seus micro-organismos em associação são os maiores contribuintes de produtos naturais originários do mar. Os metabólitos secundários citotóxicos produzidos podem inibir o crescimento de organismos concorrentes, prejudicando

sua divisão celular, proporcionando a elas uma vantagem durante a competição por espaço no substrato de recifes de corais (HELBER et al., 2018).

Na década de 50, descobriu-se que a esponja produz uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos e desde então, mais de 5300 compostos químicos foram descritos. Um fator importante que contribui para o sucesso competitivo das esponjas é a capacidade de ataques microbianos. A defesa da superfície das esponjas contra predadores, organismos incrustantes e também de agentes patogênicos dá-se muitas vezes pela produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas (ROHDE et al., 2015).

### 3.1.2 Fungos

O Reino Fungi é o segundo maior grupo de organismos encontrado na natureza e é amplamente distribuído. A estimativa é de que existam 2,2 a 3,8 milhões de espécies, com 120.000 atualmente aceitas, sendo 8% nomeadas na melhor das hipóteses (HAWKSWORTH and LUECKING, 2017). Ecologicamente, os fungos são importantes intermediários e desempenham um papel significativo nos ciclos de regeneração de nutrientes. Alguns fungos marinhos causam doenças em animais e plantas marinhas, enquanto outros formam relações simbióticas mutualistas com outros organismos (WANG et al. 2006).

Os fungos marinhos foram classificados como obrigatórios ou facultativos: fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam somente no habitat marinho ou estuarino, enquanto que os fungos marinhos facultativos são aqueles que originam de água doce ou terrestre e são capazes de crescer (e esporular) em ambientes marinhos (KOHLMEYER e VOLKMANN-KOHLMEYER, 2003; SURAJIT et al. 2006; LI e WANG, 2009). Cerca de 800 espécies de fungos marinhos obrigatórios foram descritas, incluindo representantes dos filos Basidiomycota e Ascomycota, fungos mitospóricos e leveduras (SURAJIT et al. 2006). O termo “fungos derivados do mar” é considerado como uma classificação mais geral desses organismos sendo mais utilizada porque a maioria dos fungos isolados de amostras marinhas não é comprovadamente classificada como microrganismos marinhos obrigatórios ou facultativos (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). A maioria deles é terrestre e adaptou-se às condições marinhas (JENSEN E FENICAL, 2002).

Os fungos derivados do mar possuem uma grande diversidade de propriedades biológicas e com potencial farmacológico devido aos metabólitos produzidos (RATEB e EBEL, 2011). Vários organismos marinhos desenvolveram estratégias e evoluíram rotas químicas para a sua sobrevivência. A quantidade de nutrientes, correntes marinhas, luz e temperatura influenciam nesta competição e conforme esta adaptação, leva à indução para produção dos metabólitos secundários, que incluem os terpenoides, alcaloides, policetídeos, esteroides e metabólitos de biogênese (SIMMONS et al., 2005). Considera-se que este fato se deve à adaptação fúngica ao ambiente marinho, pois muitos fungos provenientes do ambiente marinho pertencem a gêneros conhecidos na superfície terrestre, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma* e *Fusarium* (ABRAHAM e LODER, 1972; PROKSCH et al., 2008). Desde a década de 1990, as capacidades metabólicas e produtivas dos fungos marinhos facultativos têm sido extensivamente estudadas. Foram isolados mais de 690 produtos naturais derivados de fungos de diferentes espécies em ambientes marinhos distintos (DUARTE et al., 2012).

O potencial para produção de metabólitos bioativos por fungos foi provado quando Alexandre Flemming, em 1928, descobriu que fungos do gênero *Penicillium* produziam a penicilina, que resultou no tratamento de diversas infecções bacterianas (KJER et al., 2010). Acredita-se que os metabólitos secundários marinhos são produzidos por microrganismos que vivem em associação (KONIG et al., 2006).

Os fungos de origem marinha possuem requisitos de crescimento específicos para temperatura, nutrientes e salinidade e isso têm estimulado o desenvolvimento evolutivo de vias metabólicas em comparação com os fungos terrestres, representando um fonte valiosa de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (RIERA-ROMO et al, 2020).

### 3.1.3 *Penicillium citrinum*

O *P. citrinum* é um fungo filamentosos com distribuição mundial de ocorrência comum e talvez, uma das formas de vida eucariótica mais comum na Terra (PITT, 1979). Esta espécie já foi isolada de vários substratos, como solo, cereais (tropicais), ambientes internos e especiarias (SAMSON et al., 2004;

HOUBRAKEN et al., 2010). É conhecido pela produção da micotoxina citrinina (BENNETT e KLICH, 2013). Micotoxinas são moléculas pequenas e tóxicas produzidas por uma grande variedade de microrganismos, que abrangem várias classes de metabólitos secundários sem estrutura química ou modo de ação comum (VANACLOIG-PEDROS et al., 2016).

Muito estudado desde a descoberta da penicilina, o *Penicillium* é um dos fungos terrestres mais onipresentes e quando isolados do ambiente marinho produz metabólitos secundários que normalmente não são produzidos em fontes terrestres. Alguns exemplos são as penostatinas, penocalasinas e comunas (AMAGATA et al., 2003).

Entre os produtos naturais, os policetídeos de origem fúngica constituem uma grande classe de metabólitos secundários e apresentam uma das maiores diversidades estruturais. A maioria desses compostos é ativa em diversos sistemas biológicos (PASTRE et al., 2007).

#### 3.1.4 Citrinina

Conhecida como micotoxina policetílica detectada em grãos armazenados e produtos à base de grãos e com diferentes tipos de toxicidade incluindo genotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade (WANG et al, 2019). A citrinina é uma das micotoxinas descobertas na década de 1930 por Harold Raistrick e colaboradores cuja estrutura química (figura 2A) foi resolvida em 1948, sendo um dos primeiros compostos identificados como policetídeo (YI and RUSSEL, 2016). É uma substância orgânica de fórmula molecular  $C_{13}H_{14}O_5$  e massa molar 250,25 g/mol. Forma cristais amarelos quando cristalizado em etanol absoluto. É solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água (CRUZ et al., 2016).

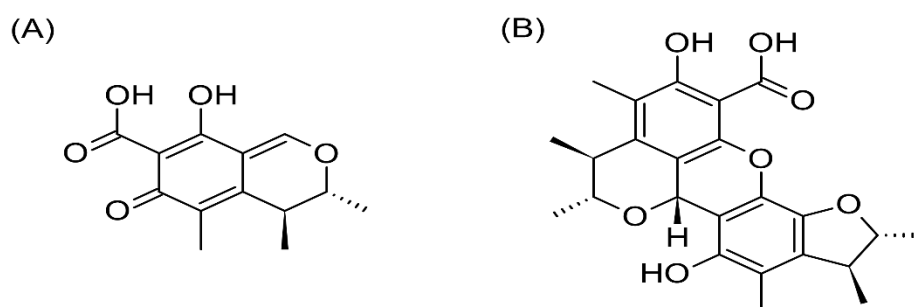
Citrinina e outros metabólitos secundários pertencentes à classe dos policetídeos possuem diversas atividades biológicas bem interessantes, como antibacteriana, antiviral, antitumoral, antiparasitária, entre outros (KELLER et al., 2005; WANG et al., 2014).

Os policetídeos compreendem uma família estruturalmente diversa e são os principais produtos isolados de fungos marinhos. São responsáveis por inúmeras atividades atribuídas aos metabólitos secundários destes

microrganismos (SALEEM et al., 2007). Os policetídeos estão incluídos em alguns medicamentos importantes, como anfotericina B, daunorrubicina, eritromicina, rapamicina e lovastatina que são utilizados de forma bem ampla na prática clínica (SHEN, 2003).

A citrinina foi isolada pela primeira vez a partir de uma espécie de *P. citrinum*, mas também é produzida pelos gêneros *Monascus* e *Aspergillus* (GEISEN et al. 2018). Um grande número de derivados de citrinina já foi isolado. Considerando o grau de polimerização, eles podem ser separados em dois grandes grupos, monoméricos e derivados diméricos (CHEN et al., 2011).

Vários estudos *in vitro* revelaram o envolvimento da toxicidade da citrinina na redução da produção de citocinas, inibição da síntese de RNA e DNA, indução de estresse oxidativo, inibição da expressão do gene de óxido de nitreto, aumento na produção de ROS e ativação da morte celular apoptótica (EFSA, 2012).



**Fig 2.** Estrutura química dos compostos identificados de *Penicillium citrinum*: **(A)** Citrinina e **(B)** Penicitrinol J;

### 3.1.5 *Trichoderma longibrachiatum*

As espécies de *Trichoderma* são comumente encontradas em solo úmido, madeira em decomposição e locais relacionados à água. São considerados saprófitas, mas esta espécie foi associada a vários casos de infecção humana em pacientes imunocomprometidos (ALANIO et al., 2008). Os fungos deste gênero são eficazes no controle biológico de doenças de plantas, o que os torna uma boa alternativa como potencial agente de biocontrole. No entanto, existem alguns relatos em que age como um micoparasita (SANCHEZ et al., 2007).

*T. longibrachiatum* é um fungo do solo encontrado em todo o mundo, mas principalmente em climas mais quentes. A espécie foi descrita originalmente do solo dos Estados Unidos (Ohio), porém, é mais comumente encontrada em regiões tropicais do que temperadas (SAMUELS et al., 2012). SPERRY et al. (1998), isolaram *T. longibrachiatum* associado a esponja *Halicona* sp. obtida da Indonésia. A partir daí, epoxisorbicilinol foi a substância encontrada, tornando este o segundo metabólito a ser descoberto em um *Trichoderma* derivado de esponja.



## 4 Objetivos

### Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi a obtenção e identificação de moléculas provenientes de fungos associados a esponjas e corais marinhos da Costa Brasileira que apresentam atividade anti-*T. vaginalis*.

### Objetivos específicos

- Produzir moléculas através da fermentação de fungos isolados de esponjas e corais marinhos;
- Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* das frações provenientes da fermentação dos fungos marinhos;
- Fracionar, isolar e identificar as moléculas bioativas produzidas pelos microrganismos marinhos.



## 5 Capítulo I

O texto completo do Capítulo I, compreendido entre as páginas 37 e 69 da versão completa desta dissertação, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico, intitulado *Mass spectrometry metabolomics approach reveals anti-Trichomonas vaginalis scaffolds from marine fungi* de autoria de Carla Teresinha Endres, Graziela de Vargas Rigo, Luciana Angelo Loges, Melissa Fontes Landell, Denise Brentan Silva, Alexandre José Macedo e Tiana Tasca. O estudo consiste na investigação da atividade anti-*T. vaginalis* de fungos associados a esponjas marinhas encontrados na costa brasileira. Os resultados obtidos demonstram a importância destes extratos como moléculas de interesse farmacêutico. Considerando o impacto dessa infecção na saúde pública e a crescente resistência observada no tratamento de *T. vaginalis*, é notável a necessidade de novas terapias para o tratamento da tricomoníase humana.















































































## 6 Discussão Geral

A tricomoníase vêm sendo considerada uma infecção parasitária negligenciada pelo fato de não ser uma doença de notificação compulsória, os dados não são notificados e podem estar subestimados. É de extrema importância aumentar o controle na detecção e tratamento, melhorando a resposta às pessoas afetadas por essa IST (SECOR et al., 2014). As infecções parasitárias são fortes ameaças a inúmeras comunidades e são generalizadas em todo o mundo. Devido à importância das infecções causadas por *T. vaginalis* e ao aumento da resistência aos medicamentos disponíveis, investigamos possíveis novas alternativas contra esse parasito. A busca de novas moléculas com diferentes mecanismos de ação e potencial terapêutico para o controle da tricomoníase é necessária e de extrema importância. Neste contexto, o capítulo I deste trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade biológica de extratos de fungos associados a organismos marinhos frente ao isolado ATCC 30236 de *T. vaginalis*.

O interesse por organismos marinhos cresceu muito nas últimas décadas, levando à descoberta de inúmeras estruturas com diversas atividades (SALEEM et al., 2007). Os fungos marinhos são considerados uma excelente fonte de compostos bioativos desde a descoberta do antibiótico cefalosporina em 1948. Mais de 30.000 produtos naturais do mar foram encontrados nos últimos 50 anos. Esses microrganismos têm a capacidade de produzir metabólitos únicos em um ambiente exigente, tornando-os uma fonte importante de moléculas interessantes para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas. A exploração de novos compostos bioativos isolados de bactérias e fungos marinhos pode dar origem a novos medicamentos e é necessária para combater a resistência a múltiplas drogas (TORTORELLA et al., 2018).

No presente trabalho seis espécies fúngicas isoladas de diferentes organismos marinhos entre esponjas e corais (constituindo 17 amostras de filtrados) foram testados. O ensaio de atividade contra o parasito foi realizado com o extrato bruto, na concentração de 1,0 mg/mL. Das 17 amostras testadas (incluindo metanólicas, aquosas e orgânicas), dois fungos associados a esponjas marinhas mostraram atividade tricomonocida: as frações orgânicas de *P. citrinum* associado a esponja *Biemna caribea* (FMPV 15), com 100% de atividade anti-*T. vaginalis* e de *Trichoderma longibrachiatum* associado a esponja *Haliclona*

*chlorilla* (FMPV 51), com 96,8% ativo contra os parasitos. De acordo com estes resultados, realizamos a fermentação dos dois fungos 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 e gerou a fração metanólica. O meio extraído com acetato de etila, gerou uma fração aquosa e uma fração orgânica. Utilizamos as frações orgânicas somente, sendo descartado o restante, pois as demais frações não apresentaram atividade contra o parasito.

O valor de concentração inibitória mínima (CIM) determinado foi de 0,5 mg/mL para os metabólitos obtidos do fungo *P. citrinum*, com resposta promissora contra o parasito.

No ensaio hemolítico, os resultados mostraram que as duas frações orgânicas do extrato bruto, tanto de *P. citrinum* como *T. longibrachiatum*, não causaram efeitos hemolíticos após 24 horas de incubação, o que sugere que as frações testadas provocaram poucos efeitos tóxicos sobre a membrana plasmática, diferente do relatado por GONZÁLEZ et al., (1998), onde 68,4% das amostras testadas com fungos produtores de citrinina causaram hemólise.

A fim de identificar os metabólitos presentes na amostra ativa, o extrato orgânico de *P. citrinum* foi fracionado por cromatografia em coluna por permeação em gel Sephadex LH-20, com metanol 20, 50, 70 e 100% além de acetona 100%. Obtivemos 12 frações e destas, cinco tiveram atividade contra o parasito. As frações 3A, 4A e 5A, foram 100% ativas, enquanto que as frações 6A e a 7A, foram respectivamente 20 e 40% ativas. As outras frações não tiveram atividade. Após o screening, as frações obtidas foram enviadas juntamente com o extrato bruto para a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. As análises de extratos e frações por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massa (LC-DAD-MS) foi realizada para a identificação dos constituintes. Tanto no extrato bruto como nas frações 3A, 4A, 5A e 6A, a citrinina foi identificada com uma maior intensidade no cromatograma. O penicitrinol J (derivado de citrinina), foi identificado nas frações 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A e 9A. Outras penicitrinonas também foram encontradas, como a penicitrinona A e C com menor intensidade.

Após o ensaio com diluição seriada em microplacas, o principal metabólito do *P. citrinum*, a citrinina, reduziu em 99,3% a viabilidade dos parasitos. Após inoculação de 5 dias em meio livre de citrinina, obteve-se uma MIC de 200 µM.



Existem inúmeros relatos na literatura de derivados de produtos naturais com atividade anti-*T. vaginalis*. Estudos realizados pelo nosso grupo apontaram o potencial de alcaloides de Amaryllidaceae contra o parasito mostrando atividade tricomonocida dos extratos brutos e compostos isolados de várias espécies desta planta (VIEIRA et al., 2011). Um dos alcaloides da espécie é a candimina e foi citotóxico para o parasito (GIORDANI et al., 2010), assim como a licorina, um dos alcaloides mais encontrados em Amaryllidaceae, que interrompe o ciclo celular de *T. vaginalis*, igualmente exercendo atividade citotóxica (GIORDANI et al., 2011). Outro estudo demonstrou atividade *in vitro* do extrato aquoso das raízes da planta *Polygala decumbens*, planta do bioma Caatinga, onde foi observada uma MIC de 1,56 mg/mL (FRASSON et al., 2012). Os cogumelos também são fontes de vários compostos e são atribuídas atividades antiparasitárias, antibacterianas e antivirais a estas substâncias. *Amauroderma camerarium* é um fungo saprofítico e a proteína amaurocina, extraída deste cogumelo, mostrou-se ativa contra isolados de *T. vaginalis* (DUARTE et al., 2016).

Em uma pesquisa realizada com fungos oriundos do meio marinho, foi relatada a inibição de isolados de *T. vaginalis* sensíveis e resistentes ao metronidazol por *P. citrinum* no qual 42 espécies associadas a organismos marinhos obtidos no litoral sul brasileiro foram avaliadas com uma CIM de 2,5 mg/mL para *P. citrinum*, isolado da esponja *Stoeba* sp. (SCOPEL et al., 2013). Em outro trabalho, foi avaliada a atividade de 14 fungos associados a organismos marinhos contra *T. vaginalis* (ATCC 30236) e o isolado clínico resistente ao metronidazol TV-LACM2R. A partir das amostras testadas, as frações orgânicas dos fungos *Aspergillus niger* (FMPV 03) e do complexo *Trichoderma harzianum/Hipocrea lixii* (FMPV 09) apresentaram atividade, com valores de CIM de 2,0 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente, exigindo estudos adicionais para estabelecer as moléculas responsáveis por esta atividade. Também foram relatados a ação de fungos marinhos contra a atividade bacteriana e a capacidade de erradicar o biofilme, onde o fungo *Aspergillus flavus* conseguiu remover 52% do biofilme já formado por *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) considerado promissor e com grande potencial (SENGER et al., 2016).

Em um estudo realizado com cepas de fungos isoladas de folhas de *Murraya paniculata* e *Melia azedarach*, nas quais foi encontrado o fungo

*Penicillium herquei*, a citrinina foi prontamente identificada no extrato e mostrou um efeito significativo na inibição do crescimento de bactérias. Em trabalhos anteriores relacionados ao estudo do metabolismo secundário de microrganismos endofíticos isolados de *M. azedarach*, foram isolados vários policetídeos bioativos do fungo *Penicillium janthinellum*, onde a citrinina apresentou importante atividade inibidora de crescimento de *Leishmania mexicana* (PASTRE et al., 2007).

Com o objetivo de isolar e caracterizar moléculas com atividade antimicrobiana derivada do fungo *P. citrinum* do solo do Cerrado, uma pesquisa obteve sucesso após isolar a citrinina e associar a vancomicina no controle de bactérias patogênicas demonstrando um novo tratamento para infecções persistentes por *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE). Este estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo* e embora estudos anteriores tenham descrito efeitos nefrotóxicos e teratogênicos, efeitos benéficos como antimicrobianos, antitumorais e antivirais, entre outros, já foram descritos desde sua descoberta. Neste estudo, os efeitos citotóxicos foram observados somente quando utilizada a dose de 256 ug/mL (DE OLIVEIRA et al, 2017). Em um estudo realizado com isolados de sedimentos da costa sudeste da China, a investigação química do extrato de *P. citrinum* resultou no isolamento de um dímero de citrinina com uma rara ponte de carbono assimétrica, dicitrinona D, que mostrou citotoxicidade contra células tumorais. Por meio deste trabalho, descobriu-se que a dicitrinona D poderia inibir o crescimento de múltiplas linhas celulares de tumor e também induzir a apoptose celular, provando ser um policetídeo antimetabólico (CHEN et al., 2017). Ensaio *in vitro* com células Vero, utilizando altas doses de citrinina, mostraram que a viabilidade celular diminuía, corroborando com outras teorias de que a citotoxicidade da citrinina poderia estar diretamente relacionada a sua concentração (BOUSLIMI et al, 2008). Desta forma, pesquisas objetivam reduzir a dose de citrinina como uma alternativa para diminuir os efeitos colaterais.

Recentemente, foi realizado um trabalho com *Penicillium citrinum* isolado de *Suberea sp.*, coletado na Indonésia, no qual mostrou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, que os levou a isolar os metabólitos especializados correspondentes. Neste procedimento, foi isolado um novo derivado da citrinina, a penicitrinona G (caracterizada pela primeira vez) e 3 compostos conhecidos: penicitrinona A, penicitrinona E e penicitrinol J (SABDANINGSIH A. et al., 2020).

Ainda mostrando a importância das moléculas coletadas no meio marinho, uma pesquisa recente realizada com fungos oriundos deste ambiente relatou o efeito do fungo *Aspergillus welwitschiae* associado à esponja *Taedania* sp contra *Staphylococcus aureus*. As infecções por *S. aureus* estão constantemente associadas a biofilmes e outros fatores de virulência, como hemólise e coagulação, e nesta pesquisa, um policetídeo encontrado foi o responsável por suprimir estes fatores, prevenindo a formação do biofilme sem interferir no crescimento bacteriano, afetando também a capacidade de hemolisar e coagular deste microrganismo (LOGES et al., 2020).

Grande parte dos metabólitos descobertos a partir de culturas de fungos do mar são paralelos ou idênticos aos dos fungos terrestres (SPERRY et al., 1998). O ambiente marinho parece ser uma fonte promissora de novas espécies. Apenas 0,6% dos fungos marinhos são conhecidos em relação ao número total de espécies. Essa baixa representatividade mostra o número insuficiente de estudos sobre ecossistemas marinhos. Este estudo também revela que a maioria dos isolados obtidos pertence a espécies conhecidas do ambiente terrestre, sugerindo que os locais estudados receberam contaminantes transportados deste local para os recifes. O fato de as esponjas filtrarem os alimentos do ambiente mostra que isolar um fungo de um organismo marinho não significa que ele cresceu lá. A poluição das áreas costeiras, gerada principalmente por atividades antrópicas, gera eventos de eutrofização, que podem criar pontos de acidificação que afetam a composição microbiana (PAULINO et al., 2019).

No Brasil, os desenvolvimentos acadêmicos e tecnológicos alcançados na última década são inúmeros. Exemplos significativos incluem o desenvolvimento de drogas antitrombóticas e antimetastáticas de organismos marinhos, atividades enzimáticas, inibitórias (proteases metálicas, cisteína e serina) elucidando o efeito antimetabólico de polissacarídeos sulfatados marinhos e hemaglutinantes que foram determinadas a partir de zoantídeos e também o isolamento de um dipeptídeo antibiofilme de fungos marinhos. Isolados microbianos de esponjas com atividade antimicrobiana contra importantes patógenos humanos também foram divulgados (THOMPSON et al., 2018), mostrando quanto potencial existe na biodiversidade marinha.

O fermentado de *T. longibrachiatum* (FMPV 51) apresentou atividade contra *T. vaginalis* e existe um grande potencial neste extrato; no entanto, mais estudos

são necessários para elucidar as moléculas responsáveis por essa atividade. Em um estudo realizado por ZHANG et al., (2018), a fermentação de *T. longibrachiatum* inibiu diferentes espécies de fitopatógenos de forma significativa, mostrando que pode ser uma fonte de moléculas promissora.

Pela sua diversidade estrutural, os produtos naturais fúngicos são importantes para a pesquisa de novos fármacos. Estes metabólitos podem ser excelentes antibióticos, assim como podem ser extremamente tóxicos. Capaz de produzir diversos efeitos em organismos vivos, a citrinina é uma molécula que apesar de sua toxicidade, também produz atividade antimicrobiana, antiparasitária e antimitótica. Mais estudos são necessários para preparar uma molécula biologicamente ativa, envolvendo a modificação estrutural da citrinina, com intuito de reduzir sua toxicidade sem que ocorra perda na sua atividade biológica.

É evidente o potencial dos metabólitos produzidos pelo fungos *P. citrinum* bem como *T. longibrachiatum* contra *T. vaginalis*. A busca por novas moléculas no meio marinho ainda tem um longo caminho a trilhar e as investigações a respeito devem prosseguir, pois o potencial que existe neste ecossistema e o ganho para todos com estas pesquisas é notável. Este trabalho contribuiu para mostrar o quão importante é mergulhar neste mundo e instigar cada vez mais a comunidade científica a buscar novas soluções contra a resistência dos microrganismos.

## 7 Conclusões

- Os resultados obtidos demonstram o potencial dos extratos obtidos de *P. citrinum* e *T. longibrachiatum* com atividade anti-*T. vaginalis*;
- Os extratos de *P. citrinum* e *T. longibrachiatum* não apresentaram atividade hemolítica;
- Ao analisar a constituição química do extrato bruto de *P. citrinum*, a citrinina se apresenta com maior intensidade;
- As frações de *P. citrinum* que foram 100% e 80% ativas contra *T. vaginalis*, apresentaram citrinina com maior pico de intensidade no cromatograma, seguido de penicitrinol J;
- A citrinina é o principal constituinte do extrato de *P. citrinum*, sugerindo que esta micotoxina pode ser a principal responsável pela morte de *T. vaginalis*;
- A citrinina causou redução de 99,3% na viabilidade dos parasitos;
- A citrinina e o penicitrinol J foram identificados nas frações 100% ativas, sugerindo também, o efeito sinérgico como o responsável pela morte dos parasitos.

## 8 Perspectivas

A fim de seguir na elucidação da molécula responsável pela atividade anti-*T. vaginalis* dos fungos *P. citrinum* e *T. longibrachiatum* isolados de esponjas marinhas, este estudo tem como perspectivas:

- avaliar a citotoxicidade de citrinina *in vitro* em linhagens celulares;
- avaliar a toxicidade no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*;
- investigar o mecanismo de morte de *T. vaginalis*.

## 9 Referências bibliográficas

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

ALANIO, A.; BRETHON, B.; FEUILHADE DE CHAUVIN M. et al. Invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* mimicking invasive aspergillosis in a neutropenic patient successfully treated with voriconazole combined with caspofungin. *Clin Infect Dis* n.46, p.116-118, 2008.

ALDERETE, J. F.; ARROYO, R.; LEHKER, M. W. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Enzymology*, v.253, p.407-414, 1995.

ALDERETE, J. F.; NGUYEN, J.; MUNDODI, V.; LEHKER, M. W. Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microbial pathogenesis*, v.36, n.5, p.263-271, 2004.

AMAGATA, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F.A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; Crews P. Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*. *Org Lett*, v.5, n.23, p.4393-6, Nov 2003.

BASTIDA-CORCUERA, F. D.; SINGH, B. N.; GRAY, G. C.; STAMPER, P. D.; DAVULURI, M.; SCHLANGEN, K.; CORBEIL, R. R.; CORBEIL, L. B. Antibodies to *Trichomonas vaginalis* surface glycolipid. *Sexually transmitted infections*, v.89, n.6, p. 467-472, 2013.

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

BENCHIMOL, MARLENE. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v.10, n.5, p.528-550, 2004.

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.

BERGQUIST, P. R. Sponges. Los Angeles: University of California, 268 p. 1978.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. The isolation of new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society*, v.72, p.2809-2810, 1950.

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

BONUGLI-SANTOS, R.C.; DOS SANTOS VASCONCELOS, M.R.; PASSARINI, M.R. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Front Microbiol*, v.6, n.269. Apr 2015.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E.E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W. et al. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: individual and combined effects. *Toxicol Mech Methods*, n.18. p.341-349, 2008.

BRADIC, MARTINA et al. Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome biology and evolution*, v.9, n.6, p.1658- 1672, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. DST no Brasil, disponível em [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). Acesso em janeiro de 2020.

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.

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, L.; LIU, W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J.L.; ZHANG, Q.Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), n.59, p.515–517, 2011.

CHEN, L.; ZHAO, Y.Y.; LAN, R.F.; DU, L.; WANG, B.S.; ZHOU, T.; LI, Y.P.; ZHANG, Q.Q.; YING, M.G.; ZHENG, Q.H.; et al. Dicitrinone D, an antimitotic polyketide isolated from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Tetrahedron*, v.73, p.5900-5911, 2017.

CHESSON, H.W.; BLANDFORD, J.M.; PINKERTON, S.D. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sexual Transmitted Disease*, v.31, n.9, p.547-551, 2004.

CRUZ, J. S.; COSTA, G. L.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. História, Aplicações, Atividade e Modificações da Citrinina. *Revista Virtual de Química*, v.8, n.3, p.650-664, 2016.

CUDMORE, SARAH L. et al. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, v.17, n.4, p.783-793, 2004.

DAVIS, R. A.; BUCHANAN, S. M.; DUFFY, S.; AVERY, V. M.; CHARMAN, S. A.; CHARMAN, W. N.; WHITE, K. L.; SHACKLEFORD, D. M.; EDSTEIN, M. D.; ANDREWS, K. T.; CAMP, D.; QUINN, R. J. Antimalarial activity of pyrroloiminoquinones from the australian marine sponge *Zyzya* sp. *Medicinal Chemistry*, v.55, p.5851-5858, 2012.

DE OLIVEIRA FILHO, J.W.G., et al. A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food Chem Toxicol*, N.110, 130-141, 2017.

DUARTE, K.; ROCHA-SANTOS, T. A.; FREITAS, A.C.; DUARTE, A.C. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *TRAC - Trend Anal Chem*, n.34, p.97-110, 2012.

DUARTE, MARIANA; SEIXAS, ADRIANA; PERES DE CARVALHO, MAIRA; TASCA, TIANA; et al. Amaurocine: anti-*Trichomonas vaginalis* protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*. *Experimental Parasitology*, n.161, p. 6-11, 2009.

DUNNE, Rebecca L. et al. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell research*, v.13, n.4, p.239, 2003.

EFSA - Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed - *EFSA Journal*, v.10, n.3, p.2605, 2012.

FICHOROVA, RAINA N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of reproductive immunology*, v.83, n.1-2, p.185- 189, 2009.

FIGUEROA-ÂNGULO, E. E.; RENDON-GANDARILLA, F. J.; PUENTE-RIVERA, J.; CALLA-CHOQUE, J. S.; CARDENAS-GUERRA, R. E.; ORTEGA-LOPEZ, J.; QUINTAS-GRANADOS, L. I.; ALVAREZ-SANCHEZ, M. E.; ARROYO, R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and infection*, v.14, n.15, p.1411-1427, 2012.

FRASSON, A. P.; DOS SANTOS, O.; DUARTE, M.; DA SILVA TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2581-2587, 2012.

GARCIA, A. F.; ALDERETE, J. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC microbiology*, v.7, n.1, p.116, 2007.

GEISEN, R.; SCHMIDT-HEYDT, M.; TOUHAMI, N.; HIMMELSBACH A. New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. *Curr Opin Food*

Sci, n.23, p.23-31, 2018.

GILBERT, RO.; ELIA, G.; BEACH, DH.; KLAESSIG, S.; SINGH, BN. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunology*, v.68, n.7, p.4200-4206, 2000.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. DE B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, MR.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Nat Prod*, v.73, n.12, p.2019-2023, 2010.

GIORDANI, RAQUEL BRANDT et al. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, n.7, p.645-650, 2011.

GONZÁLEZ, AM. et al; Estudio de la actividad hemolítica in vitro de extractos de hongos productores de citrinina. *Revista Fabicibi*, v.2, p. 127-130, 1998.

GRAÇA, 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.789-92, 2013.

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

HASAN, S., ANSARI, M. I; AHMAD, A.; MISHRA, M. Major bioactive metabolites from marine fungi: A review. *Bioinformation*, v.11, n.4, p.176-181, 2015

HAWKSWORTH, D. L.; LUECKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr*, v.5, n.4, FUNK-0052-2016., Jul 2017.

HELBER, S.B.; HOEIJMAKERS, D.J.J.; MUHANDO, C.A. et al. Sponge chemical defenses are a possible mechanism for increasing sponge abundance on reefs in Zanzibar. *PLoS One* 13, n.6, p.e0197617, 2018.

HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; AVILA-GONZALEZ, L.; ORTEGA-LOPEZ, J.; CRUZTALONIA, F.; GOMEZ-GUTIERREZ, G.; ARROYO, R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39 kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*, v.107, p.125-135, 2004.

HINDERFELD, A.S.; PHUKAN, N.; BÄR, A.; ROBERTON, A.M.; SIMOES-BARBOSA, A. Cooperative Interactions between *Trichomonas vaginalis* and Associated Bacteria Enhance Paracellular Permeability of the Cervicovaginal Epithelium by Dysregulating Tight Junctions. *Infect Immun*, v.87, n.5, e00141-19, Apr 2019.

HIRT, ROBERT P.; SHERRARD, JACKIE. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Current opinion in infectious diseases*, v.28, n.1, p. 72-79, 2015.

HOBBS, MARCIA M.; SEÑA, ARLENE C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, v.89, n.6, p.434-438, 2013.

HOUBRAKEN, JAMP; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, n.44, p.117-133, 2010.

KELLER, Nanci P.; TURNER, GEOFFREY; BENNETT, JOAN W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, v.3, p.937-947, 2005

KHOSHMAN, A.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *Journal of virology*, v.68, n.6, p.4035-4038, 1994.

KISSINGER, P.; ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually Transmitted Infections*, v.89, n.6, p.426-433, 2013.

KISSINGER, PATRICIA. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC infectious diseases*, v.15, n.1, p.307, 2015.

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, 2010.

KOHLMEYER, J., AND VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Fungi from coral reefs: a commentary. *Mycol. Res.* n.107, p.386–387, 2003.

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

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.199-212, 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.

LAZENBY, GWENETH B. et al. An association between *Trichomonas vaginalis* and highrisk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clinical therapeutics*, v.36, n.1, p.38-45, 2014.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, JF. Biology of trichomonosis. *Curr Op Infect Dis*, v.13, n.1, p.37-45, 2000.

LEITSCH, DAVID et al. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular 98 redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular microbiology*, v.72, n.2, p.518-536, 2009.

LI, Q.; WANG, G. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiol Res.* v.164, n.2, p.233-241, 2007.

LOGES, LA.; SILVA, DB.; PAULINO, GVB; LANDELL, MF.; MACEDO, AJ. Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity *in vivo*, *Microbial Pathogenesis*, 2020.

MASON, P.R.; FIORI, P.L.; CAPPUCINELLI, P.; RAPPELLI, P.; GREGSON, S. Seroepidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural women in Zimbabwe and patterns of association with HIV infection. *Epidemiology Infection*. v.133, n.2, p.315-323, 2005.

MENEZES, CAMILA BRAZ; FRASSON, Amanda Piccoli; TASCA, Tiana. Trichomoniasis are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial cell*, v.3, n.9, p.404, 2016.

MERCER, FRANCES et al. Neutrophils kill the parasite *Trichomonas vaginalis* using trogocytosis. *PLoS biology*, v.16, n.2, p. e2003885, 2018.

MERCER, FRANCES; JOHNSON, Patricia J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. *Trends in parasitology*, v.34, n.8, p.683-693, 2018.

MERCK INDEX: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Available at: <https://www.rsc.org/Merck-index/searchresults?searchterm=citrinin>. Accessed October, 2020.

MILLER, M.R.; NYIRJESY, P. Refractory Trichomoniasis in HIV-positive and HIV negative Subjects. *Currents Infection in Disease Reproduction*, v.13, n.6, p.595-603, 2011.

NEWMAN, D.J.; CRAGG GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod*. v.83, n.3, p.770-803, 2020.

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, 2013.

OSINGA, R.; ARMSTRONG, E.; BURGESS, J.G.; HOFFMANN, F.; REITNER J, SCHUMANN-KINDEL G. Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, n.461, p.55–62, 2001.

OZCELIK, S. et al. The cytopathic effects of *Trichomonas vaginalis* on fibroblast cell culture alone and with *C. albicans* and *E. coli*. *Turkiye parazitolojii dergisi*, v.36, n.4, p. 193-197, 2012.

PASSOS, MESSIAS SANTOS. Metabólitos secundários das esponjas *Aiolochoiria crassa* e *Dysidea robusta* e do fungo *Aspergillus sydowii*. Dissertação de mestrado Universidade de São Paulo – USP, 2013.

PASTRE, RENATA; MARINHO, ANDREY, M. R., RODRIGUES-FILHO, EDSON SOUZA; ANTÔNIA, Q. L., & PEREIRA, JOSÉ ODAIR. Diversidade de Policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova*, v.30, n.8, p.1867-1871, 2007.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P.; RITSON – WILLIAMS, K. Marine chemical ecology. *Natural Product Report*, v.23, p.153-180, 2006.

PAULINO, G.V.B., FELIX, C.R., LANDELL, M.F. Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil. *J Basic Microbiol*, v.60, n.2, p.103-111, 2020.

PEREIRA-NEVES, A. et al. *Parasitologia Humana*, 13ª edição. São Paulo, Editora Atheneu, 2016.

PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell*, v.99, n.2, p.87-101, 2007.

PEREIRA-NEVES, A.; RIBERIO, K. C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in trichomonads - new insights. *Protist*, v.154, p.313–329, 2003.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.300-317, 1998.

PITT, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Academic*, London, p. 1–634, 1979.

POOLE, DANIELLE N.; MCCLELLAND, R. Scott. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect*, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.

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

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

RIERA-ROMO, M; WILSON-SAVÓN, L; HERNANDEZ-BALMASEDA I. Metabolites from marine microorganisms in cancer, immunity, and inflammation: A critical review. *J Pharm Pharmacogn Res* v.8, n.5, p.368–391, 2020.

ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Canadian Medical Association Journal*, v.86, n.14, p.665, 1962.

ROHDE S, NIETZER S, SCHUPP PJ. Prevalence and mechanisms of dynamic chemical defenses in tropical sponges. *PLoS One*. 10: p.e0132236, 2015.

ROWLEY, Jane et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, v.97, n.8, p.548, 2019.

SABDANINGSIH, A.; LIU, Y.; METTAL, U.; HEEP, J.; RIYANTI; WANG, L.; CRISTIANAWATI, O.; NURYADI, H.; TRIANDALA SIBERO, M.; MARNER, M.; RADJASA, O.K.; SABDONO, A.; TRIANTO, A.; SCHÄBERLE, T.F. A New Citrinin Derivative from the Indonesian Marine Sponge-Associated Fungus *Penicillium*



*citrinum*. *Mar. Drugs* 2020, v.18, n.4, p.227, 2020.

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

SAMSON, R. A; FRISVAD, J.C. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Stud Mycol*. v.49, p.257, 2004.

SAMUELS, GARY J.; ISMAIEL, ADNAN; MULAW, TEMESGEN B.; SZAKACS, GEORGE; DRUZHININA, IRINA S.; KUBICEK, CHRISTIAN P.; JAKLITSCH, WALTER M. "The Longibrachiatum Clade of Trichoderma: a revision with new species". *Fungal Diversity*, v.55, n.1, p.77–108, 2012.

SANCHEZ, V., REBELLODO, O., PISCASO, R.M., CARDENAS, E., CORDOVA, J., GONZALEZ, O., SAMUELS, G.J. In Vitro Antagonism of Tielaviopsis Paradoxa by Trichoderma Longibrachiatum. *Mycopathologia*, v.163, p.49-58, 2007.

SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v.50, n.12, p.4209-4210, 2006.

SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 794–803, 2004.

SCHWEBKE, JANE R.; BARRIENTES, Frank J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.50, n.12, p.4209-4210, 2006.

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, 2013.

SECOR, W. EVAN et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v.90, n.5, p. 800-804, 2014.

SENGER, F. R. Micro-organismos marinhos como fonte de metabólitos bioativos: atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, antibiofilme e antibacteriana. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2016.

SHEEHY, O.; SANTOS, F.; FERREIRA, E.; BERARD, A. The use of metronidazole during pregnancy: a review of evidence. *Current drug safety*, v.10, n.2, p.170-179, 2015.

SHEN B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* v.7, p.285–295, 2003.

SILVER, BRONWYN J. et al. *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted diseases*, v.41, n.6, p. 369-376, 2014.

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

SPERRY, S, SAMUELS G.J.; CREWS, P. Vertinoid polyketides from the saltwater culture of the fungus *Trichoderma longibrachiatum* separated from a Haliclona marine sponge. *J Org Chem*, v.63, p.10011–10014, 1998.

SURAJIT D, LYLA PS, AJMAL KHAN S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future per-spectives. *Curr Sci*, v.90, n.10, p.1325-35, 2006.

SUTCLIFFE, Siobhan. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future oncology*, v.6, n.8, p. 1289- 1311, 2010.

THOMFORD, N.E.; SENTHEBANE, D.A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci*, v.19, n.6, p.1578, 2018.

TORTORELLA, E., TEDESCO, P., PALMA ESPOSITO, F., JANUARY, G.G., FANI, R., JASPARS, M., DE PASCALE, D., 2018. Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. *Mar Drugs*, vol.16, n.10, p.355, 2018.

VARGAS, RIGO G.; PETRO-SILVEIRA, B.; DEVEREUX, M.; MCCANN, M.; SOUZA DOS SANTOS, A.L.; TASCA, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology*, v.146, n.9, p.1179-1183, 2019.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis*, v.197, n.4, p.548-54, 2008.

VAN SOEST, R.W.M.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.N.A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.B.; MANCONI, R.; SCHÖNBERG, C.; KLAUTAU, M.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M.-C.; CÁRDENAS, P.; CARBALLO, J.L.; RÍOS, P.; DOWNEY, R.; MORROW, C.C. World Porifera Database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2020-09-26. doi:10.14284/359, 2020.

VIEIRA P.B., GIORDANI R., DE CARLI G.A., ZUANAZZI J.A., TASCA T. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trichomonas vaginalis* activity. *Planta Med*; v.77, n. p.1-6, 2011.

VIEIRA, PB.; TASCA, T.; SECOR, WE. Challenges and Persistent Questions in the Treatment of Trichomoniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.17, n.11, p.1249-1265, 2017.

WORMS - WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES, disponível em: <http://www.marinespecies.org>. Acesso em: maio, 2020.

WANG G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated

microbial consortia. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.33, p.:545–51, 2006.

WANG X, WANG H, LIU T, XIN Z. A PKS I gene-based screening approach for the discovery of a new polyketide from *Penicillium citrinum* Salicorn 46. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.98, p.4875-4885, 2014.

WANG, W.; LIAO, Y.; ZHANG, B.; GAO, M.; KE, W.; LI, F.; SHAO, Z. Citrinin Monomer and Dimer Derivatives with Antibacterial and Cytotoxic Activities Isolated from the Deep Sea-Derived Fungus *Penicillium citrinum* NLG-S01-P1. *Mar. Drugs*, v.17, n.1, p.46, 2019.

WORKOWSKI KA, BOLAN GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep*, v.64, Rr-03, p.1-137, 2015.

Y. HE and R. J. Cox, The molecular steps citrinin biosynthesis in fungi. *Chem Sci*, v.7, p.2119-2127, 2016.

ZHANG, S.; XU, B.; ZHANG, J.; GAN, Y. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pestic Biochem Physiol*, v.147, p.59-66, 2018.

ZHANG, Z.F.; BEGG, C.B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*, v.23, n.4, p.682-90, 1994.