



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

SAYONARA STÉFANE TAVARES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE PLANTAS NO BRASIL CONTRA PATÓGENOS HUMANOS**

FLORIANÓPOLIS

2020

Sayonara Stéfane Tavares de Moura

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE PLANTAS NO BRASIL CONTRA PATÓGENOS HUMANOS**

Dissertação submetido(a) ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fabienne Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Robl

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moura, Sayonara Stéfane Tavares de
Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos
endofíticos isolados de plantas no Brasil contra patógenos
humanos / Sayonara Stéfane Tavares de Moura ; orientador,
Fabienne Ferreira, coorientador, Diogo Robl, 2020.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. I. Ferreira, Fabienne.
II. Robl, Diogo. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

Sayonara Stéfane Tavares de Moura

**Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no
Brasil**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Rubens Duarte, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Denise Moritz, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em biotecnologia e biociências.

Prof. Dr.(a) Glauber Wagner
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr.(a) Fabienne Ferreira
Orientador(a)

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho a minha maior fonte de inspiração, amor e garra durante esta fase, meu irmão, Shelton Tavares. Obrigada por ser sempre minha bússola e meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre olhar por mim e me encher de forças para vencer esta batalha e a minha mãezinha, Nossa Senhora da Conceição, por sempre interceder pela minha vida nos momentos que mais precisei.

À minha família, pois mesmo na distância, foram imprescindíveis para este momento se concretizar. Minha mãe, Ana e meus irmãos, Susan e Shelton, obrigada por todo apoio, amor e carinho.

A minha orientadora e amiga, Fabienne Ferreira, agradeço por ter aceitado me orientar e ter me guiado nesta jornada, por todos os ensinamentos e momentos de descontração no laboratório e na vida. Você é uma mulher incrível e fonte de inspiração para minha vida acadêmica, espero um dia poder ser metade do ser humano incrível e professora maravilhosa que você é.

Ao meu co-orientador, Diogo Robl, por toda ajuda e momentos compartilhados. Agradeço pelas amostras fúngicas cedidas para que meu trabalho fosse possível de acontecer. Você foi importantíssimo para meu crescimento profissional, nunca esquecerei dos momentos incríveis que compartilhamos juntos.

Aos membros da Banca, Prof. Rubens Duarte, Dra. Denise Moritz, Dra. Manuela Balen e Prof. Admir Giachini por aceitarem avaliar este trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB), por toda ajuda com os fungos e pela organização do espaço. Andressa, Carol, Anabel e todos os professores e alunos envolvidos para que o ambiente fosse um local agradável para trabalhar e conseguir concluir a pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (GeMBac), por todas as discussões científicas e momentos compartilhados, especialmente meus amigos, Bruno, Andressa, Maria, Juliana, Gabi, Damaris e Ana Luiza, muito obrigada pela acolhida aqui em Floripa e por toda ajuda e bons momentos que compartilhamos, vocês sempre estarão comigo. E ao professor Ricardo Mazzon, por todos os momentos de descontração, dúvidas científicas e ajuda para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço especialmente ao meu amigo e IC, Marcel, por toda ajuda durante o meu mestrado, sem você não seria possível finalizar este trabalho, minha eterna gratidão.

Ao pessoal do Laboratório de Imunoregulação (iREG), o professor Carlos Zaraté, Gabi, Lucas e Isis, pelos bons momentos compartilhados e ideias trocadas nos momentos de café e lazer no laboratório.

Ao pessoal do time da micologia do LAMPB, a Rafa e a Bia pela paciência e ajuda com os fungos, ao André, a Renata, Aline e Fran pelas boas risadas, ótimos momentos

compartilhados no laboratório, dúvidas solucionadas e ajuda com minha pesquisa. Vocês são incríveis e levarei cada um em meu coração.

Aos Laboratórios de Protozoologia (PROTO) e Imunobiologia (LIDI) da UFSC, por ceder o espaço e equipamentos para que fosse possível a realização de experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Química Farmacêutica (CCS/UFSC), por ajuda com a rotaevaporação dos extratos, especialmente o doutorando Rafael e a professora Dra. Lilian Bernardes por me ajudarem nesta etapa, e também a prof. Dra. Miriam Falkenberg por ter nos cedido tempo e espaço para auxílio com dúvidas e ajuda na caracterização química dos nossos extratos.

Ao pessoal do Departamento de Engenharia de Alimentos e Química da UFSC (EQA/UFSC), especialmente Manuela e Denise, por me ajudarem durante experimentos que realizei neste departamento.

A Gabriela Persinoti do Laboratório Nacional de Biorrenováveis da Universidade de São Paulo (USP), por ceder o genoma para que fosse possível realizar atividades de bioinformática neste trabalho.

Ao professor Glauber, do Laboratório de Bioinformática da UFSC, por ceder tempo e espaço para me ajudar com as análises de bioinformática.

Ao professor Marcelo Maraschin, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (CCA/UFSC), pela ajuda com a caracterização química dos extratos obtidos no meu trabalho.

Ao professor Daniel Mansur, do Laboratório de Imunobiologia (LIDI), por ceder a bolsa do projeto de bioinformática, para que eu conseguisse concluir o segundo ano de mestrado.

Agradeço a minha melhor amiga e parceira, Rhuanna Kamilla, que mesmo distante se fez presente durante estes anos de mestrado. Obrigado pela parceria durante a graduação, pelos perrengues que compartilhamos, as vídeos-chamadas para fofocar, rir e chorar nesta fase, pela dupla nos incontáveis estágios durante a graduação e pelos incríveis conselhos e palavras que só você sabe me dar. Você é muito especial e tenho muito orgulho de ser sua amiga.

Agradeço a minha grande amiga Yonne, por ter me apresentado este mestrado, e ter me ajudado durante toda minha fase de adaptação aqui em Floripa. Muito obrigada por todos os momentos que compartilhamos e que venham muitos mais. Você é uma benção de Deus na minha vida.

Agradeço aos amigos de Floripa, por tornarem esta jornada mais leve e feliz, vocês foram um pedacinho da minha família aqui na ilha da magia, a Julia, Sophia, Gabi, Rayza e Marina. Obrigada garotas por tudo.

Agradeço aos meus amigos do mestrado em Biotecnologia, Joana, Sheila, Hegger, Aline e Lander pelos ótimos momentos que compartilhamos, pelos cafés, risadas e conversas que tivemos ao longo desses anos. Foi um prazer conhecer vocês, tornaram a jornada na conclusão dos inúmeros créditos com disciplinas muito mais fácil.

Agradeço as minhas amigas de Pernambuco, especialmente Débora, Rayssa, Priscilla, Gyo e Duda por todo apoio e por acreditarem na minha capacidade durante esta etapa. Vocês são demais.

Agradeço a prof. Isabella Macário da UFPE, por ter me apresentado a microbiologia durante a graduação e ter sido fonte de inspiração para continuar nesta área. Gratidão por todos os ensinamentos e momentos que compartilhamos.

Agradeço a toda Equipe do LAMEB pela disponibilização dos equipamentos e espaço para que muitas pesquisas sejam prosseguidas e concretizadas.

Agradeço a CAPES e ao CNPq por todo apoio financeiro.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(Filipenses 4:13)

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores problemas para saúde pública, por isso muitos estudos se esforçam na busca por novas alternativas de tratamento para infecções causadas por microrganismos resistentes. Fungos endofíticos tem se mostrado como uma abordagem promissora na busca de biomoléculas com potencial antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de 49 fungos endofíticos isolados de diversas espécies de plantas no Brasil. Inicialmente, uma triagem da atividade foi realizada pelo método de bloco de difusão em ágar e demonstrou que 7 isolados identificados como *Penicillium* sp. (5 isolados), *Aspergillus* sp. (1 isolado) e *Trichoderma* sp. (1 isolado; DR19) exibiram halo de inibição para pelo menos uma das cepas padrão testadas. Buscando a identificação de espécies fúngicas com escassez de dados na literatura com relação à produção de antimicrobianos, foram adicionadas mais 3 amostras de fungos endofíticos no estudo: *Paecilomyces* sp. (DR26), *Alternaria* sp. (DR45) e *Annulohyphoxylon stygium* (DR47). Assim, os 4 isolados fúngicos DR19, DR26, DR45 e DR47 foram selecionados entre a coleção. Sobrenadantes concentrados de cada cultura líquida fúngica foram testados quanto sua atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. O fungo DR47 foi o que apresentou maior potencial de atividade antimicrobiana, apresentando halo de inibição contra duas cepas de *Staphylococcus aureus*, e contra uma cepa de *Candida albicans* em todas as condições testadas. Devido ao potencial antimicrobiano apresentado pelo isolado fúngico DR47, um extrato fúngico foi preparado com acetato de etila em um meio de cultivo em estado sólido. Em seguida, o extrato foi testado quanto a sua atividade antimicrobiana, apresentando halo inibitório contra três cepas estafilocócicas e a cepa de *C. albicans*, além de uma cepa clínica de MRSA. Desta forma, uma análise do genoma do isolado DR47 (*A. stygium* DR47) foi realizada e possibilitou a identificação de possíveis *clusters* biossintéticos associados a atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos com a análise genômica encontraram porcentagens de similaridade para 15 *clusters* biossintéticos de moléculas já conhecidas. Entre eles, 6 *clusters* apresentaram 100% de similaridade. Entre as moléculas codificadas por estes *clusters*, foram reportados desde compostos utilizados como corante alimentar, por exemplo, a Monascorubrina e também micotoxinas, como a Fusarina. A associação de ferramentas genéticas para exploração *in silico* e de testes antimicrobianos *in vitro* possibilitou neste estudo demonstrar que o fungo *A. stygium*, representa uma nova fonte promissora na busca de compostos contra patógenos humanos, visto que, ele é ainda pouco explorado quanto as suas

atividades biológicas. Sendo assim, a identificação de novas moléculas com potencial antimicrobiano pode contribuir, no futuro, na ampliação das opções de tratamentos contra as infecções microbianas, especialmente causadas por microrganismos resistentes, contribuindo para diminuição das taxas de mortalidade e morbidade relacionadas a estes microrganismos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; atividade antimicrobiana; análise genômica; *Annulohypoxyton stygium*.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a great challenge for public health. Therefore, many studies are striving to find new treatment alternatives for infections caused by resistant microorganisms. Endophytic fungi have been an interesting source in the search for biomolecules showing antimicrobial potential. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of 49 endophytic fungi isolated of plants from Brazil. Initially, the fungi collection was screened using the method of agar block diffusion against standard microbial strains. 7 fungi showed an inhibition halo against at least one of the tested strains. The fungi were identified as *Penicillium* sp. (5 isolates), *Aspergillus* sp. (1 isolate) e *Trichoderma* sp. (1 isolate; DR19). In order to explore fungi genders that are rarely studied as producers of antimicrobial compounds, the isolate of *Trichoderma* sp. (DR19) from the initial screening and 3 other isolates identified as *Paecilomyces* sp. (DR26), *Alternaria* sp. (DR45) and *Annulohyphoxylon stygium* (DR47) were selected among the collection and added to the following studies. Concentrated liquid cultures of the 4 fungi isolates were tested by agar diffusion method. The DR47 isolate presented the most prominent antimicrobial potential, presenting an inhibition halo against two strains of *Staphylococcus aureus* and one strain of *Candida albicans* in all tested conditions. Due to the antimicrobial potential presented by the isolate DR47, its fungal extract was obtained from a solid-state culture followed by extraction using ethyl acetate. Subsequently, the extract was tested by agar diffusion method, showing an inhibitory halo against the three staphylococcal strains and the *C. albicans* strain, as well as a clinical MRSA strain. Thus, an analysis of the whole genome sequencing of the isolate DR47 (*A. stygium* DR47) was performed and it was possible to identify probable antimicrobial biosynthetic clusters. The results regarding the genomic analysis found percentages of similarity for 15 biosynthetic clusters of molecules already known. Among them, 6 clusters presented 100% of similarity. The compounds codified by those clusters have been reported as food coloring (Monascorubrin) and also as mycotoxins, such as Fusarin. The combination between *in silico* exploration and *in vitro* antimicrobial assays made it possible to demonstrate that the fungus *A. stygium* represents a promising new source in the search for compounds against human microbial pathogens. This fungal specie is still little explored in terms of its biological activities. Thus, the identification of new molecules showing antimicrobial potential may contribute to the expansion of treatment options against microbial infections, especially

caused by resistant microorganisms. It will contribute to decrease of the mortality and morbidity rates related to these microorganisms.

Keywords: Endophytic fungi; antimicrobial activity; genomic analysis; *Annulohyphoxylon stygium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de novas drogas antibacterianas aprovadas nos últimos anos.....	26
Figura 2. Exemplo de <i>Monascus purpureus</i> e estrutura química da monascorubrina.....	33
Figura 3. Fluxograma metodologia bloco de difusão em ágar	40
Figura 4. Fluxograma da metodologia de cultivo submerso de fungos com indução de patógenos.....	42
Figura 5. Macro (A e B) e micro morfológica (C) dos isolados fúngicos 27, 35 e 59	48
Figura 6. Macro (A e B) e micro morfológica (C) dos isolados fúngicos 22, 55 e 62	50
Figura 7. Atividade antifúngica contra <i>C. albicans</i> dos sobrenadantes concentrados do DR47	51
Figura 8. Crescimento do <i>A. stygium</i> DR47 em arroz (30 dias 25°C).....	54
Figura 9. Teste antimicrobiano (metodologia dos poços) do isolado DR47 contra três linhagens de <i>S. aureus</i> A – Linhagem ATCC25923; B- Linhagem ATCC29213 e C- Linhagem ATCC6538P O extrato fúngico foi obtido a partir do cultivo em estado sólido (arroz). (47AE) – Extrato bruto do DR47; (C+) – Controle positivo: clorexidina 0,2%; (C-) – Controle negativo: DMSO 10%	55
Figura 10. Teste antimicrobiano (metodologia dos poços) do isolado DR47 contra uma linhagem de MRSA (16-005; foto do lado esquerdo) e uma linhagem de <i>C. albicans</i> (ATCC10231; foto do lado direito).	56
Figura 11. Estrutura química das moléculas previstas pelo antiSMASH e PUBCHEM	60
Figura 12. Espectrofotometria UV do extrato de <i>A. stygium</i> e Monascorubrina.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos do gênero <i>Annulohyphoxylon</i> e <i>Hyphoxylon</i> e algumas atividades e moléculas de interesse biotecnológico relatadas na literatura.....	36
Tabela 2. Triagem da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos por metodologia de bloco de difusão em ágar isolados de Soja (<i>Glycine max</i>), Pinheiro (<i>Pinus elliottii</i>) e Eucalipto (<i>Eucalyptus benthamii</i>).....	47
Tabela 3. Medidas dos halos de inibição (mm) dos sobrenadantes concentrados (5x) da cultura líquida fúngica preparados com culturas de <i>S. aureus</i> autoclavadas e filtradas (Média dos diâmetros dos halos de inibição, em mm \pm o desvio padrão).....	53
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de extrato bruto obtido a partir do cultivo em estado sólido (arroz) do fungo endofítico <i>Annulohyphoxylon stygium</i> frente a bactérias e levedura patogênica humana	55
Tabela 5. Clusters de genes relacionados a produção de metabólitos secundários em <i>Annulohyphoxylon stygium</i> (DR47)	58
Tabela 6. Moléculas previstas pelo antiSMASH e suas atividades relatadas na literatura.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

- antiSMASH *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*
- ATCC *American type culture collection*
- BCG *biosynthetic gene cluster*
- CDC *Centers for disease control and Prevention*
- CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- DMSO Dimetilsulfóxido
- ECDC Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
- ERC Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
- ESBL *Extended-spectrum beta-lactamases*
- EtOAc Acetato de Etila
- EUA Estados Unidos da América
- ITS *Internal Transcribed Spacer*
- KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)
- KPC *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos
- PKS *polyketide synthase* – policetídeo sintase
- PubCHEM Base de dados de substâncias e compostos químicos
- MRSA *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*
- NCBI *National Center for Biotechnology Information*
- NRPS *nonribosomal peptide synthetase* – peptídeo sintetase não ribossomal
- TS *terpene synthase* – terpeno sintase
- VRE *Vancomycin resistant Enterococcus*
- UFC Unidade formadora de colônia
- UV ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Infecções microbianas e resistência aos antimicrobianos	22
2.2	Fungos endofíticos e moléculas bioativas	27
2.2.1	Policetídeos	29
2.2.2	Peptídeos não ribossomais.....	31
2.2.3	Terpenos	31
2.2.4	Biomoléculas de interesse industrial	32
2.2.5	Família <i>Xylariaceae</i>	34
3	METODOLOGIA	38
3.1	Isolados fúngicos e linhagens bacterianas.....	38
3.2	Triagem da atividade antimicrobiana – Bloco de difusão em ágar	39
3.3	Identificação morfológicas dos fungos.....	40
3.4	Cultivo submerso dos fungos filamentosos baseados em indução com patógenos....	41
3.5	Avaliação da atividade antimicrobiana por metodologia dos poços	43
3.6	Obtenção de extratos fúngicos a partir de cultivo em estado sólido	43
3.7	Identificação e análise de clusters biossintéticos de metabólitos secundários no genoma do <i>Annulohyphoxylon stygium</i>	44
3.8	Determinação de concentração de Monascorubrina.....	45
3.9	Espectrometria de massas do extrato de <i>A. stygium</i>	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Triagem da atividade antimicrobiana em bloco de difusão em ágar e identificação morfológica dos isolados fúngicos endofíticos	47

4.2	Teste antimicrobiano em poços das culturas fúngicas em meio líquido	50
4.3	Teste antimicrobiano de extrato em cultivo em estado sólido do fungo <i>Annulohyphoxylon stygium</i> (DR47)	54
4.4	Análise genômica de <i>clusters</i> biossintéticos de metabólitos secundários no genoma do <i>A.stygium</i> (isolado DR47)	56
4.5	Dados de espectrofotometria ultra-violeta do extrato do <i>A. stygium</i> em comparação com a Monascorubrina	65
4.6	Dados de espectrotometria de massas do extrato do <i>A. stygium</i>	66
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO	77

1 INTRODUÇÃO

O tratamento das infecções microbianas tem sido um desafio na saúde pública, devido, principalmente, ao rápido aparecimento e disseminação de amostras microbianas resistentes a antibióticos (AKOVA, 2016). O impacto econômico e clínico provenientes do aparecimento de microrganismos com perfil de resistência está presente especialmente no ambiente hospitalar, e estão associados ao aumento de morbidade e mortalidade, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento (ECDC, 2018).

Dados de 2015 reportaram que processos infecciosos causados por patógenos resistentes aos antimicrobianos tem ocasionado a morte de cerca de 33.000 indivíduos por ano em toda a Europa (CASSINI et al., 2019). O perfil epidemiológico de resistência bacteriana na Europa é bastante variável de acordo com a região. Isso ocorre provavelmente porque existem diferenças significativas na utilização de antimicrobianos, no controle de infecções e nas práticas preventivas (CASSINI et al., 2019). Até 2050 estima-se que o impacto da resistência aos antimicrobianos custará a vida de 10 milhões de indivíduos no mundo e uma diminuição econômica importante no produto interno bruto (PIB) de países como a Grã-Bretanha (IACG, 2019).

Nos Estados Unidos (EUA), infecções por microrganismos resistentes são estimadas em mais de 2,8 milhões de casos por ano, além de mais de 35 mil mortes no mesmo período (CDC, 2019). Mesmo com a dificuldade de estimativa de custos econômicos, infecções associadas a estes microrganismos têm um impacto oneroso na economia em diversos países. Nos EUA, estima-se que o custo total está em torno de 55 bilhões de dólares (HWANG; GUMS, 2016). Dados da região da Catalunha relevam que os custos ocasionados pelas principais infecções hospitalares superaram os 30 milhões de Euros em 2013 (GRAU, 2017). Diversos fatores são responsáveis pelos custos elevados destas infecções, como o patógeno responsável pela infecção, às características do paciente, o tipo de infecção adquirida e a presença de diferentes mecanismos de resistência (GRAU, 2017).

A ocorrência de infecções por bactérias e fungos resistentes pode estar associada a alterações na microbiota do hospedeiro ou pode ocorrer por via exógena, através de contato direto, secreções, aerossóis ou artefatos contaminados em procedimentos médicos. Além disso, as condições imunológicas do paciente têm um papel relevante na gravidade e incidência das infecções, e podem estar associadas a faixa etária e a utilização indiscriminada

de antibióticos, esta última podendo contribuir para a disseminação da resistência aos antimicrobianos (GARCIA et al., 2013).

Dentre as principais causas de enfermidades infecciosas, as bactérias gram-negativas e gram-positivas se caracterizam como uma das mais importantes, devido ao aumento considerável nos perfis de resistência aos antimicrobianos. Elas são cada vez mais eficientes em processos infecciosos por apresentarem também diversos fatores de virulência que contribuem para sua alta patogenicidade e persistência, como a produção de biofilme em dispositivos médicos implantáveis (AKOVA, 2016).

A crescente incidência dos microrganismos multirresistentes tem estimulado os pesquisadores a buscar novos agentes antimicrobianos como uma estratégia importante para o estabelecimento de terapias alternativas no tratamento das infecções causadas por estes microrganismos. Nessa perspectiva, produtos naturais, como por exemplo extraídos de plantas e de fungos endofíticos, têm se apresentado como uma importante fonte biológica de novas moléculas bioativas, podendo, muitas destas moléculas, apresentar atividade antimicrobiana contra patógenos resistentes (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017).

Apesar do número crescente de estudos relacionados, as atividades biológicas de microrganismos endofíticos são ainda pouco exploradas em todo mundo. Aqui destacamos os fungos endofíticos, que são microrganismos que habitam tecidos internos de plantas sem causarem nenhum dano aparente (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017). Estes microrganismos apresentam uma grande diversidade e tem um papel importante no crescimento e saúde da sua planta hospedeira, principalmente através da produção de metabólitos bioativos com inúmeras atividades biológicas já relatadas (NISA et al., 2015). Existem aproximadamente 300.000 espécies de plantas na Terra e cada planta individual é hospedeira de um ou mais endófitos, sendo esses hiperdiversos, com uma estimativa de mais de um milhão de táxons diferentes de fungos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Contudo, as populações descritas de linhagens endofíticas são poucas, o que significa que a oportunidade de encontrar novas linhagens e produtos naturais de microrganismos endofíticos que colonizam plantas em diferentes nichos e ecossistemas é abundante. Assim, devido à problemática da resistência aos antimicrobianos e a demanda por novas opções de tratamento das infecções relacionadas, o presente estudo busca identificar fungos endofíticos isolados no Brasil que produzam moléculas com potencial antimicrobiano.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos por meio de bloco de difusão em ágar contra linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC e *Candida albicans* ATCC.
- Identificar por meio de características morfológicas (microcultivo e repique pontual) as espécies de fungos endofíticos que apresentaram atividade antimicrobiana na triagem inicial.
- Determinar a atividade antimicrobiana de extratos fúngicos selecionados através da metodologia dos poços.
- Utilizar ferramentas *in silico* para identificação de *clusters* biossintéticos de metabólitos secundários no genoma do fungo que apresentou maior potencial antimicrobiano.
- Identificar as moléculas bioativas presentes nos extratos fúngicos e comparar com os resultados *in silico*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções microbianas e resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça mundial para a saúde pública. Muitas organizações internacionais de saúde em diferentes países, tem investido em pautas que visem combater o seu aumento. Principalmente porque infecções ocasionadas por microrganismos resistentes têm apresentado inúmeros impactos negativos na saúde e vida da população, como o aumento da mortalidade, internações mais demoradas e alta nos custos com tratamentos médicos (OPAS, 2017).

A rápida capacidade de disseminação da resistência microbiana acontece devido um ciclo perpetuado na sociedade humana através do uso prolongado, desnecessário ou incorreto de antibióticos pela população, práticas inadequadas de segurança e prevenção nos serviços de saúde e utilização de antibióticos como fertilizantes de crescimento e prevenção de infecções na indústria agropecuária (SCOTT et al., 2019). Esse ciclo de utilização favorece a aquisição de genes de resistência por bactérias e fungos, facilitando sua sobrevivência e disseminação em diferentes ambientes, por exemplo, por meio da água e do solo (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017; SCOTT et al., 2019). Através de dados epidemiológicos hospitalares foi possível identificar os principais grupos bacterianos associados às infecções nosocomiais em humanos, reportados através da sigla ESKAPE, que inclui as bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Dentre eles, podemos destacar o *Staphylococcus aureus*, um coco gram-positivo que é encontrado fazendo parte de mucosas e da pele saudáveis de humanos e alguns outros animais (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Entretanto, este microrganismo também está associado a processos infecciosos, sendo o principal patógeno gram-positivo causador de infecções na corrente sanguínea, endocardites infecciosas, infecções osteoarticulares, de pele e tecidos moles graves e infecções relacionadas a dispositivos médicos (TURNER et al., 2019). Um dos seus perfis de resistência bastante disseminado em todo mundo é conhecido como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA; *methicillin-resistant S. aureus*), reportado como uma ameaça global em processos infecciosos nosocomiais e comunitários

(TURNER et al., 2019). Estima-se que MRSA coloniza de forma assintomática a cavidade nasal e/ou a pele de aproximadamente 5% da população hospitalar nos EUA e que 2 em cada 100 pessoas saudáveis contém MRSA em sua narina (CDC, 2019). MRSA dispõe de fatores de virulência associados à evasão a resposta imune do hospedeiro, dificultando o tratamento. Isso acontece devido à capacidade da bactéria de produzir enzimas e toxinas com função citolítica e formar biofilme, que contribuem para adaptação cada vez mais rápida ao hospedeiro e às intervenções terapêuticas e cronificação das infecções (REIJER et al., 2016). Segundo o CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças), 323 mil casos de MRSA são notificados por ano nos EUA, estimando-se ser a causa de morte de mais de 10 mil pessoas por ano (CDC, 2019).

Outro gênero gram-positivo importante é o *Enterococcus*, que são microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal humana e podem ocasionar diversas patologias, sobretudo às associadas aos cuidados de serviços de saúde do trato urinário, de sítio cirúrgico e infecções de corrente sanguínea. Em 2017, aproximadamente 20 mil casos de infecções por enterococos estavam correlacionados com a assistência à saúde nos EUA (CDC, 2019). Quando em quadros infecciosos, esses patógenos desenvolveram variadas estratégias de resistência aos antibióticos, dentre eles podemos citar a capacidade de produção de beta-lactamases e a diminuição da permeabilidade celular a entrada de antibióticos (LEVITUS; PERERA, 2018). A partir da década de 80, surgiram as primeiras linhagens de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE, *vancomycin-resistant Enterococcus*). Estes microrganismos são caracterizados por apresentarem resistência à vancomicina através da diminuição na afinidade de ligação do fármaco no seu sítio de ação, que é caracterizado pela substituição do terminal D-Alanina pelo D-lactato (D-Lac) durante a síntese do peptidoglicano (LEVITUS; PERERA, 2018). A aquisição deste mecanismo de resistência ocasionou uma diminuição significativa na terapia disponível para o tratamento de patologias relacionadas aos enterococos, visto que a vancomicina é uma droga comumente utilizada no tratamento de infecções graves causadas por estes microrganismos. Além disso, a resistência aos antimicrobianos também levou ao aumento da disseminação bacteriana em ambientes hospitalares, ocasionando mais de 54 mil casos de infecções por VRE em pacientes hospitalizados, o que tem levado a morte de quase 5.400 pessoas a cada ano nos EUA (CDC, 2019).

Atualmente, os patógenos gram-negativos são considerados como um grupo de ampla dificuldade de tratamento clínico, porque apresentam elevada resistência aos antimicrobianos, que aumentam as taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (OLIVEIRA; REYGERT, 2019). Um dos principais conjuntos de patógenos neste âmbito são as bactérias entéricas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, especialmente *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Salmonella*, estando estas associadas a infecções gastrointestinais, urinárias, pneumonias, infecções de corrente sanguínea, entre outras (OLIVEIRA; REYGERT., 2019; DOI et al., 2017). Um dos principais perfis de resistência relacionados a essas bactérias é a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL; *extended-spectrum beta-lactamases*) que são β -lactamases que podem hidrolisar drogas da classe das penicilinas e cefalosporinas (DOI et al., 2017). Infecções de corrente sanguínea ocasionadas por enterobactérias produtoras de ESBL aumentam em 50% a chance de morte quando comparada ao mesmo tipo de infecção por linhagens não produtoras (CDC, 2019). Esse tipo de resistência se tornou uma problemática principalmente porque estes microrganismos são os maiores produtores de β -lactamases em todo o mundo e são capazes de disseminar plasmídeos contendo genes de resistência por conjugação, o que acarretou no aparecimento de espécies multirresistentes. Adicionalmente, a aquisição de resistência à classe de fármacos carbapenêmicos nestas bactérias, conhecidas como ERC (Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos) (CODJOE; DONKOR, 2017) também tem sido bastante incidente em todo o mundo e está associada a aquisição de plasmídeos conjugativos (ARIAS; MURRAY, 2012). Os patógenos resistentes aos carbapenêmicos são considerados pelo CDC como uma ameaça urgente, principalmente as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, por serem as bactérias mais frequentemente associadas a infecções do grupo e ocasionarem aproximadamente mais de 190 mil infecções por ano nos EUA (CDC, 2019).

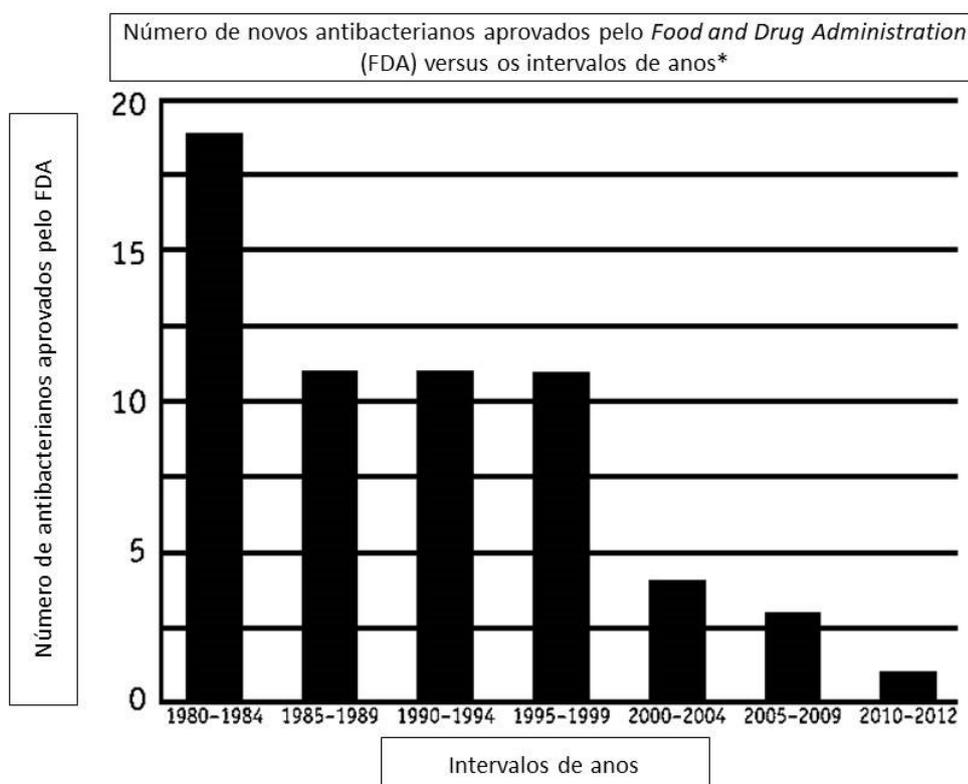
Os bacilos gram-negativos não-fermentadores são outro grupo de patógenos importantes, por serem responsáveis por muitas das infecções fatais no ambiente hospitalar e apresentarem uma sensibilidade consideravelmente baixa a terapia antimicrobiana devido à resistência encontrada em muitas das linhagens (OLIVEIRA; REYGERT., 2019). Dentre estes microrganismos, as principais espécies que se destacam são: *Acinetobacter Baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia linhagemcia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entre

outras. A capacidade de multirresistência por algumas dessas linhagens pode ocorrer através de mutações cromossômicas, que podem causar uma alta produção de beta-lactamases, superexpressão de bombas de efluxo, mudanças em sítios alvo de antimicrobianos e alterações na permeabilidade celular. Esses mecanismos de multirresistência são comumente observados em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Adicionalmente, este grupo de bactérias também é capaz de produzir carbapenamases (enzimas que clivam os carbapenêmicos, conferindo resistência) através da aquisição de elementos genéticos móveis. Assim, estes microrganismos são considerados uma ameaça no âmbito hospitalar devido à limitação no tratamento das infecções associadas a eles (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; CDC, 2019). De acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), na União Européia, 32,1% dos isolados de *P. aeruginosa* eram resistentes a pelo menos um dos grupos antimicrobianos utilizados no tratamento, enquanto espécies de *Acinetobacter* spp. apresentaram uma porcentagem de 56,4% para resistência a um dos fármacos comumente utilizados (ECDC, 2018).

Adicionalmente, a busca de novas abordagens terapêuticas antimicrobianas também se estende atualmente a microrganismos fúngicos, como a levedura *Candida albicans*, que é a quarta principal causa de infecções na corrente sanguínea nos EUA (CDC, 2019). Dados revelam que 1 a cada 4 pacientes com infecções de corrente sanguínea causadas por espécies de *Candida* resistente aos fármacos disponíveis vem a óbito (CDC, 2019). Esta levedura está presente principalmente na pele e mucosas, fazendo parte da microbiota humana. Entretanto, é prevalentemente associada a patologias em indivíduos imunocomprometidos, podendo levar ao óbito em certos casos, apresentando uma letalidade de até 40% dos casos em infecções sistêmicas (DADAR et al., 2018). Além disso, esse patobionte tem adquirido resistência aos antimicrobianos utilizados em seu tratamento convencional, tornando cada vez mais difícil a sua terapêutica, que é baseada sobretudo nas classes de medicamentos polienos e azólicos (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Fármacos azólicos, como o fluconazol, inibem o crescimento fúngico de *Candida albicans* através de alterações na estrutura da membrana celular da levedura, por meio da ligação a um dos seus componentes, o ergosterol (FORD et al., 2015). Contudo, nos últimos anos, a aquisição de estratégias moleculares de resistência aos azólicos tem tornado este patógeno uma problemática na clínica, visto que a resistência está associada a aquisição de genes como *CDR1* e *CDR2*, que

codificam para os transportadores do tipo ABC, capazes de aumentar o efluxo do fármaco para fora da célula, além do gene *MDR1* que codifica para uma bomba de efluxo que também diminui a concentração intracelular do fármaco. Outro mecanismo de resistência relatado neste caso é a supressão do efeito do fármaco no seu sítio alvo, através do aumento no nível de produção e ação de enzimas da via do ergosterol, codificados pelo gene *ERG11* (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; FORD et al., 2015; DADAR et al., 2018).

Figura 1. Número de novas drogas antibacterianas aprovadas nos últimos anos



*Intervalos de 1980-2009 são intervalos de 5 anos; 2010-2012 é um intervalo de 3 anos. Drogas são limitadas a agentes sistêmicos. Dados cedidos pelo Centro de Avaliação e Pesquisa de Drogas (CDER) do FDA.

Fonte: Adaptado de CDC (2013).

O Fórum Econômico Mundial (2019) enquadrou a resistência antimicrobiana como um dos mais graves problemas de saúde global, alertando para os riscos da utilização irrestrita de antibióticos (WEF, 2019), visto que ao longo das décadas houve uma considerável diminuição no número de desenvolvimentos e aprovação de drogas antimicrobianas, levando a restrição no número de terapias disponíveis (Figura 1). O

desenvolvimento de políticas públicas em saúde, adoção de medidas preventivas, educação em saúde, investimentos em pesquisa científica sobre resistência e a busca por novas fontes de moléculas antimicrobianas são as principais propostas para uma tentativa de conseguir conter os avanços cada vez mais rápidos da disseminação da resistência e os impactos negativos em saúde (WEF, 2019; O'NEILL, 2014; OMS, 2015; OPAS, 2016). Quanto à última proposta citada, fontes de moléculas antimicrobianas de origem natural e renováveis tem despertado maior interesse da comunidade científica atualmente (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017).

2.2 Fungos endofíticos e moléculas bioativas

Endófitos são definidos como microrganismos capazes de sobreviver uma parte do seu ciclo de vida dentro do tecido vegetal de plantas sem causarem danos sistêmicos (ANCHEEVA; DALETOS; PROKSCH, 2019). A capacidade de microrganismos tornarem-se endófitos se dá através da colonização dos tecidos do hospedeiro vegetal geralmente por meio de fendas naturais e feridas nas raízes das plantas (YAN et al., 2019). As bactérias e fungos são reportados na literatura como espécies capazes de construir este tipo de relação e podem ser encontrados em diversos tecidos vegetais, especialmente em folhas e ramos (POLESI, 2015), mas podem ser localizados também vivendo em raízes (WHITE et al., 2019). A relação endófito-hospedeiro é considerada como uma simbiose principalmente mutualística (SCHULZ; BOYLE, 2006).

Os fungos endofíticos podem ser encontrados dentro de plantas das mais diferentes regiões e climas globais, e sua presença tem sido relatada desde plantas medicinais até comestíveis. A exploração biotecnológica de fungos endofíticos é cada vez maior, visto que, esses microrganismos são capazes de produzir moléculas que fornecem inúmeros benefícios para seus hospedeiros e que são ainda pouco exploradas (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017). Ao longo dos anos observou-se que a associação entre fungos endofíticos e seu hospedeiro, vai além de uma situação simbiótica, mas sim, pode promover benefícios para as duas espécies (AZEVEDO et al., 2000). Plantas fornecem nutrientes e um ambiente saudável para o desenvolvimento e crescimento fúngico. Em contra partida, as vantagens fornecidas pelos metabólitos produzidos pelos endófitos aos vegetais são inúmeras, como a proteção

contra fitopatogénos e herbicida (YAO et al., 2017). Além disso, a resistência da planta hospedeira também é promovida através da produção e secreção de moléculas antimicrobianas pelos próprios fungos, competição pelo espaço tecidual com patógenos e estimulação da produção de moléculas com outras atividades biológicas (YAN et al., 2019). Fungos endofíticos também podem ajudar a tolerar problemas abióticos, como salinidade, metais pesados e mudanças hídricas do ambiente para que a planta consiga se desenvolver e crescer, através da síntese de fitohormônios e metabolização de nutrientes tóxicos do meio (YAN et al., 2019).

Com o desenvolvimento populacional e as demandas na busca por compostos bioativos oriundos de fontes renováveis que possam ser empregados em diversas áreas industriais, os metabólitos de fungos endofíticos surgiram como uma alternativa de exploração biotecnológica (YAN et al., 2018). As atividades antifúngicas, antibacteriana (GONÇALVES, FREIRE, LIMA, 2013), herbicida (CANUTO, 2012), antiviral, anticancerígena (SILVA, 2016) e antiparasitária (ALVES et al., 2018) apresentadas por compostos produzidos por estes microrganismos estão sendo cada vez mais empregados em processos farmacêuticos, alimentícios e agrícolas (YAN et al., 2018). Entretanto, os endófitos são ainda pouco explorados quanto à produção de biocompostos quando comparados a outras fontes naturais como as plantas. O Brasil é um país com uma grande diversidade biológica ainda inexplorada e com grande potencial para investigação de endófitos de plantas nativas da flora brasileira (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019). Estima-se que existam mais de 5,1 milhões de espécies fúngicas no mundo, inúmeras ainda desconhecidas (BLACKWELL et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que o potencial biológico de certas ervas e folhas medicinais está relacionado a presença de determinados endófitos (IDRIS; AL-TAHIR; IDRIS, 2013; (NISA et al., 2015). Isso pode ser observado, por exemplo, pela produção de taxol, um medicamento anticancerígeno bastante utilizado em todo o mundo, que foi isolado inicialmente de uma árvore conhecida popularmente como Teixo (*Taxus baccata*), e posteriormente descobriu-se que a substância era produzida também pela espécie endofítica denominada *Taxomyces andreanae*. A partir destes dados, foi possível explorar a produção deste composto através do cultivo do microrganismo, tornando o processo menos oneroso e mais sustentável para o meio ambiente (GUO et al., 2008).

O foco nas classes químicas e na via de biossíntese de muitos compostos naturais é o principal objetivo de inúmeras pesquisas, visto a urgência na obtenção de novos fármacos e a busca por processos mais eficientes e menos demorados de isolamento e purificação de biomoléculas. Substâncias antimicrobianas são um alvo extremamente importante nesta busca, dado a diminuição significativa na taxa de medicamentos disponíveis e o aumento da resistência antimicrobiana. Um estudo demonstrou que mais de 30% de isolados endófitos tem o potencial de produzir alguma substância antimicrobiana (MUSSI-DIAS et al., 2012).

O metabolismo secundário de fungos é responsável por produzir moléculas que não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo. Entretanto, esses compostos são necessários na modulação do ambiente em que este se encontra, ajudando o fungo a desenvolver-se e sobreviver em locais de alta competitividade espacial, baixa oferta de nutrientes e forte pressão seletiva (BILLS; GLOER, 2016). Policetídeos, terpenos, alcaloides e peptídeos não ribossomais estão entre os grupos químicos produzidos e isolados de fungos endófitos com alguns destes papéis biológicos (NISA et al., 2015). A síntese desses compostos é mediada por diferentes classes enzimáticas multifuncionais de policetídeo sintases (PKS), peptídeo sintase não ribossomal (NRPS) e terpenos sintases (TS), que utilizam diferentes substratos para a produção desses compostos. Por exemplo, PKS e NRPS usam basicamente grupos malonil, além de aminoácidos e derivados para construção de seus produtos químicos (BILLS; GLOER, 2016; DEEPIKA; MURALI; SATYAMOORTHY, 2016).

Os genes que codificam para estas enzimas, tanto em eucariotos como procaríotos, são encontrados em *clusters* gênicos biossintéticos (BCG). BCG's são definidos como um agrupamento de genes correlacionados, não homólogos, que participam de uma via metabólica comum e estão fisicamente próximos dentro do genoma, sendo expressos de forma co-regulada (SLOT, 2017).

2.2.1 Policetídeos

Moléculas policetílicas estão entre uma das classes mais comuns de metabólitos secundários conhecidos, que compartilham a mesma origem biossintética, apesar da diversidade estrutural encontrada entre elas (BILLS; GLOER, 2016). Fungos, bactérias e

plantas podem produzir estes tipos de compostos, que estão associados a uma variedade de atividades biológicas, como atividade antiviral, anticancerígenas, anti-hipertensivas, herbicidas e imunossupressoras, assim como também podem atuar como micotoxinas (COX; GLOD 2004). Vários fármacos de importância clínica são policetídeos, tais como a rapamicina, lovastatina, eritromicina, anfotericina B e entre outros (BILLS; GLOER, 2016).

A síntese desses compostos é mediada por diferentes tipos de enzimas chamadas de PKS (policetídeo sintases), que são estreitamente associadas a síntese do ácido graxo e são agrupadas em três diferentes grupos (tipo I, II e III) de acordo com a combinação dos seus domínios (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Ceto-sintase (KS), a acil-transferase (AT) e a proteína carreadora de acil (ACP) são os três domínios básicos compartilhados entre essas enzimas para formação de policetídeos. Outros domínios podem também estar associados e são responsáveis pelas modificações posteriores, gerando moléculas estruturalmente diversas. PKS do tipo I são caracterizadas como enormes proteínas multifuncionais que contém domínios individualmente funcionais e são encontradas principalmente em fungos e bactérias. PKS do tipo II são proteínas individuais restritas as bactérias e as PKS tipo III são chalconas e estilbeno sintases que podem ser encontradas tanto em eucariotos (plantas e fungos) como procaríotos (bactérias) (COX, 2007).

PKS iterativa do tipo I são as mais comumente encontradas em fungos. São conhecidas pelo termo “iterativa” porque esse grupo enzimático utiliza um sistema iterativo na formação de suas moléculas, onde uma enzima multifuncional, a partir de acetato e malonato, é capaz de reutilizar repetidas vezes os seus sítios ativos para síntese e ampliação da sua cadeia (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). De acordo com seus domínios adicionais para construção do policetídeo e da sua estrutura, as PKS fúngicas podem ser classificadas em: não reduzidas PKS (NR-PKS ou aromáticas), parcialmente reduzidas (PR-PKS) e altamente reduzidos (HR-PKS), formando moléculas com alta diversidade estrutural (BILLS; GLOER, 2016). Moléculas como o ácido 6-metilsalicílico (6-MSA), a lovastatina e a esqualestatina são encontradas sendo produzidas por PKS do tipo I (COX; GLOD 2004).

2.2.2 Peptídeos não ribossomais

Peptídeos não ribossomais (NRP) são uma extensiva classe química de produtos naturais produzidos por bactérias e fungos filamentosos, sintetizados a partir de vias biossintéticas que não envolvem ribossomos (GONZÁLEZ; SIGRIST; PAULO, 2016). Essa classe de moléculas é sintetizada principalmente por peptídeos sintetases não ribossômicas (NRPS), enzimas com múltiplos domínios responsáveis por catalisar reações específicas no alongamento da cadeia e formação dos seus peptídeos (BLOUDOFF; SCHMEING, 2017). Elas utilizam principalmente substratos de acila na construção de seus metabólitos, como aminoácidos proteogênicos e não proteicos, ácidos graxos e ácidos hidroxilos, gerando uma ampla variedade de compostos químicos lineares, cíclicos ou ramificados (BLOUDOFF; SCHMEING, 2017).

2.2.3 Terpenos

Terpenos são uma classe bioativa de metabólitos produzidos por uma diversidade de organismos, desde plantas até fungos (FELIPE; BICAS, 2016). Inúmeras atividades são relacionadas com esses compostos, que são extensivamente empregados na indústria de aromas, mas também estão associados a atividades antibióticas e podem atuar como hormônios vegetais e animais, entre outras atividades (BILLS; GLOER, 2016).

As principais classes desses compostos são os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e moléculas derivadas de cinco carbonos simples: o dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP) (QUIN; FLYNN; SCHMIDT-DANNERT, 2014). Esses compostos precursores em fungos são produzidos a partir da via do mevalonato do acetil-CoA e posteriormente, a partir de sua condensação. Resultam em hidrocarbonetos lineares, que através de desfosforilação e ciclização catalizado por terpenos sintases (TS) formaram os terpenos. Há dois grupos de terpenos sintases conhecidos, classificadas de acordo com o mecanismo de ativação do substrato: as terpenos sintases do tipo I, que catalisam uma ciclização dependente da ionização do substrato; e as terpenos sintases do tipo II, que catalisam uma cascata dependente da protonação (QUIN; FLYNN; SCHMIDT-DANNERT, 2014). Terpenos sintases podem produzir uma ampla

gama de compostos por vias biossintéticas que são também mediadas por enzimas auxiliares na obtenção do composto final, como as monoxigenases do citocromo P450, oxidoredutases e transferases. Estas enzimas auxiliares podem realizar modificações na estrutura inicial do terpeno, produzindo então moléculas como sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (QUIN; FLYNN; SCHMIDT-DANNERT, 2014).

Dentre os compostos, destacam-se a produção de um antibiótico, a retapamulina, sintetizado a partir do diterpenoide antibacteriano denominado pleuromutilina, produzido pelo fungo *Clitopilus passeckerianus* (JACOBS, 2010). Outro composto amplamente empregado no tratamento de infecções orais por bactérias gram-positivas é o ácido fusídico, um derivado de triterpenoide produzidos por *Acremonium fusidioides* (FERNANDES, 2016).

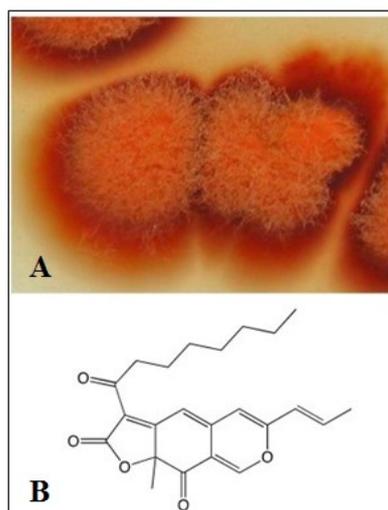
2.2.4 Biomoléculas de interesse industrial

O crescente interesse em produtos naturais com aplicação biotecnológica fez com que fungos se tornassem uma das principais fontes de exploração em todo o mundo. Isto porque eles são capazes de produzir uma ampla variedade de substâncias com interesse industrial e tem sido cada vez mais fácil o seu manuseio em larga escala (SCHUEFFLER; ANKE, 2014). Com os avanços tecnológicos dos sequenciamentos de última geração, diversos genomas fúngicos puderam ser completamente sequenciados, possibilitando o estudo a nível genético dos diferentes compostos produzidos pelos fungos, facilitando assim o conhecimento biológico e o isolamento das moléculas (KELLER, 2019). A partir do estudo dos genomas fúngicos é possível explorar, por exemplo, grupos de genes envolvidos em vias biológicas associadas a síntese e regulação de uma ou mais moléculas de interesse biotecnológico (PFANNENSTIEL; KELLER, 2019). Com isso, a possibilidade de exploração dos genomas aumentou consideravelmente, tornando cada vez mais fácil seu manuseio e diminuindo os custos com os processos. O foco da indústria então se voltou para melhoramento no processo de produção e captação de substâncias com alto valor agregado, principalmente voltado para o desenvolvimento de plataformas para a produção comercial de muitos produtos biológicos fúngicos (SAINI; KEUM, 2018).

A indústria tem explorado desde pigmentos até moléculas com propriedades antimicrobianas produzidas por fungos para produção em larga escala. Alguns pigmentos,

utilizados como corantes alimentares, sendo exemplo a monascorubrina, tem um alto valor agregado fazendo com que muitos estudos se voltem para explorar seu potencial no mercado (Figura 2 - DUFOSSÉ, 2018). A indústria nos últimos anos se esforçou em entender a biossíntese da monascorubrina, sua via de produção e sua estrutura química. Esse pigmento é utilizado a milênios pela população chinesa, principalmente no cultivo de arroz e em aplicações também na medicina, sendo a indústria alimentícia seu principal foco (LIU et al., 2018). Este pigmento é produzido principalmente por espécies fúngicas do gênero *Monascus*, mas alguns estudos demonstram que também pode ser produzido por algumas espécies de *Talaromyces* (WOO et al., 2014). É um policetídeo do tipo azafilona e tem algumas enzimas chaves em sua produção, sendo uma PKS a responsável pelo arcabouço da sua estrutura química (LIU et al., 2018). O grande problema encontrado pela indústria é a produção de micotoxinas por espécies de *Monascus*, como exemplo a citrinina, dificultando seu manuseio e uso na indústria alimentícia por ser tóxica para consumo humano. Diversos estudos recentes têm buscado estratégias para superar este problema de produção de toxinas, aumentar a produção de monascorubrina e então conseguir conquistar mercados mais abrangentes como a Europa e a América (DUFOSSÉ, 2018).

Figura 2. Exemplo de *Monascus purpureus* e estrutura química da monascorubrina



Legenda: A- Crescimento micelial de *Monascus purpureus* em placa de petri; B- Estrutura química da monascorubrina. (Fonte: Adaptado de Dufossé, 2018)

2.2.5 Família *Xylariaceae*

A família *Xylariaceae* (Ascomycota) compreende aproximadamente 1300 espécies separadas dentro de 81 gêneros fúngicos (KUHNER et al., 2017). Fungos pertencentes a essa família são encontrados nas mais diversas regiões do mundo, reportados principalmente em climas tropicais. São saprófitos ou endófitos de plantas, capazes de decompor matéria orgânica e de decompor compostos como a lignina e celulose (STADLER, 2011). Muitos compostos produzidos por essa família têm despertado o interesse da indústria farmacêutica e agroquímica, devido a potencial capacidade biotecnológica e também pela presença de gêneros fúngicos poucos explorados, potenciais fontes produtoras de novas moléculas. Alguns fungos desta família apresentam a produção de moléculas naturais com aplicações biológicas em muitas áreas, sendo policetídeos a maior classe química produzidos por essas espécies (STADLER, 2011). Um exemplo é a produção de azafilonas, moléculas com alta afinidade pela amônia e capazes de reagir com grupos aminos (proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos), com isso produzindo diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, citotóxica e anti-inflamatória (OSMANOVA et al., 2010).

Dentre os gêneros fúngicos pertencentes a esta família fúngica, o gênero *Annuhyoxylon*, anteriormente denominado *Hypoxyylon* seção *Annulata*, foi segregado em um novo gênero por diferenças em suas características morfológicas e quimiotaxonômicas (HSIEH; JU; ROGERS, 2005). Atualmente, são relatadas na literatura mais de 40 espécies dentro deste gênero (CRUZ; CORTEZ, 2016). Estes fungos podem ser encontrados vivendo como saprófito de alguns materiais orgânicos, como madeira morta (STADLER, 2011), ou em alguns casos como endófito de plantas, principalmente sendo descoberto em regiões tropicais e subtropicais (IKEDA et al., 2014).

A capacidade em produzir metabólitos bioativos já foi relatada neste gênero em espécies endofíticas (HELALY; THONGBAI; STADLER, 2018). Esta produção está associada particularmente aos seus corpos de frutificação e seus pigmentos (KUHNER et al., 2017; STADLER; FOURNIER, 2006). Na literatura é possível encontrar alguns estudos voltados para a busca de novos compostos derivados do metabolismo secundário destas espécies fungicas com potenciais aplicações terapêuticas, reportando principalmente atividade antitumoral, antimicrobiana, fotoprotetiva, antiinflamatória, antifúngica, entre outras, de

linhagens do gênero *Hypoxylon* sp. e *Annulohypoxylon* sp. (Tabela 1). Apesar dessas atividades relatadas na literatura por alguns estudos, pouco ainda foi explorado quanto a capacidade antimicrobiana, principalmente em fungos do gênero *Annulohypoxylon*, indicando que este pode ser uma fonte para bioprospecção promissora de novas moléculas antimicrobianas.

Tabela 1. Microrganismos do gênero *Annulohyphoxylon* e *Hyphoxylon* e algumas atividades e moléculas de interesse biotecnológico relatadas na literatura

Microrganismo	Molécula	Atividade	Referência
<i>Hyphoxylon multifforme</i>	azafilonas (multiforminas A, B, C e D)	Atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>C. albicans</i>	Quang et al., 2005a
<i>Hyphoxylon submoniticulosum</i>	trienilfuranol A	Atividade antifúngica contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Burgess et al., 2017
<i>Annulohyphoxylon truncatum</i>	truncaquinonas A e B (asterriquinonas)	Atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas / atividade citotóxica contra linhagem celular cancerígena de fibroblastos de rato L929 e a linhagem celular KB3.1 de carcinona do colo do útero	Surup et al., 2016
<i>Annulohyphoxylon minutellum</i>	azafilonas (minutellins A, B, C e D) e binaftil hinnulin A	Atividade citotóxica contra a linhagem celular KB3.1 de carcinona do colo do	Kuhnert et al., 2017

		útero	
<i>Annulohypoxylon cohaerens</i>	azafilonas (coaerina C, D, E, F)	Atividade antimicrobiana contra <i>Bacillus subtilis</i>	Quang et al., 2006
<i>Annulohypoxylon cohaerens</i>	coaerina K	Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Surup et al., 2013
<i>Annulohypoxylon truncatum</i>	annulohypoxyloman A, B, C / annulohypoxylomarin A / xylariphilone / annulohypoxylomanol A, B / annulohypoxyloside	Atividade anti-inflamatória	Li et al., 2017
<i>Annulohypoxylon ilanense</i>	Ilanefuranone	Atividade antimicobacteriana	Wu et al., 2013
<i>Annulohypoxylon stygium</i>	Pirogalol	Atividade antimicrobiana contra MRSA e <i>E. coli</i>	Medina et al., 2018
<i>Annulohypoxylon stygium</i>	Multiformina A, annulosquamulina	Fotoproteção	Maciel et al., 2018
<i>Annulohypoxylon squamulosum</i>	Annulosquamulina (di-hidrobenzofuran-2,4-diona)	Atividade antitumoral	Ming-Jen Cheng et al., 2012

Fonte: AUTORA (2020).

3 METODOLOGIA

3.1 Isolados fúngicos e linhagens bacterianas

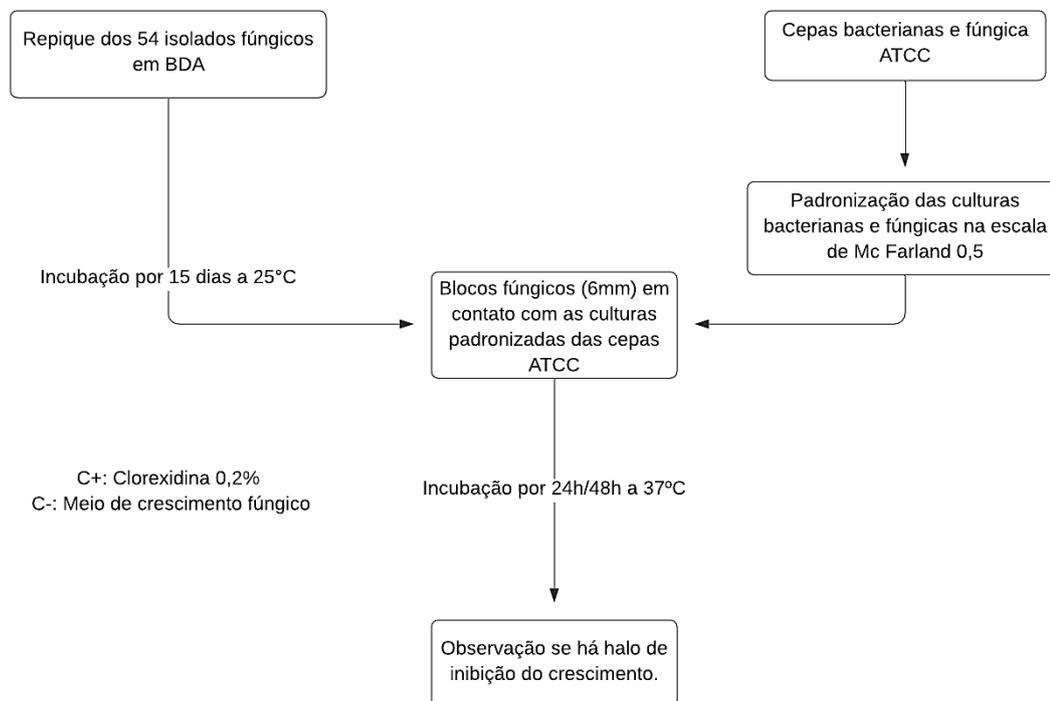
As amostras de fungos endofíticos utilizados neste estudo fazem parte da coleção de amostras do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR - Prof. Ida Chapaval Pimentel). As linhagens foram previamente isoladas pelo grupo de pesquisa da UFPR de *Eucalyptus benthamii* (Eucalipto), *Glycine max* (Soja), *Platanus orientalis* (Plátano-oriental), *Solanum tuberosum* (Batata-inglesa), *Saccharum officinarum* (Cana-de-açúcar) e *Pinus elliottii* (Pinheiro) e conservados em tubo contendo meio BDA (Batata-Dextrose ágar – Sigma-Aldrich). Inicialmente, foram utilizadas no projeto 54 amostras fúngicas. Entre eles, quatro amostras de fungos endofíticos deste banco já haviam sido identificadas e denominadas DR19(*Trichoderma* sp.), DR26 (*Paecilomyces* sp.), DR45 (*Alternaria* sp.) DR47 (*Annulohyphoxylon stygium*) (ROBL et al., 2013). Os isolados DR19, DR45 e DR47 foram isolados de folhas de Eucalipto (*Eucalyptus benthamii*), enquanto o DR26 é um isolado de soja (*Glycine max*).

As linhagens padrões utilizadas em todo o estudo foram: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Escherichia coli* ATCC25922, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 e *Enterococcus faecalis* ATCC29212. As amostras clínicas bacterianas resistentes a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, isolado 16-005), *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL e Enterococo resistente à Vancomicina (VRE) utilizadas foram obtidas previamente de pacientes hospitalizados em Santa Catarina e fazem parte da coleção do Laboratório de Genética Molecular da UFSC, sob coordenação da professora Fabienne Ferreira. As amostras clínicas de MRSA e *K. pneumoniae* foram gentilmente cedidas em colaboração com a professora Thais Sincero (UFSC) e a linhagem de VRE com o professor Fernando Spiller (UFSC).

3.2 Triagem da atividade antimicrobiana – Bloco de difusão em ágar

Inicialmente, os fungos endofíticos foram repicados em placas contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar – Sigma-Aldrich) e incubados a 25°C durante 15 dias (Figura 3). Posteriormente, blocos da colônia fungica (6 mm) foram retirados e transferidos para a placa de Ágar Mueller-Hinton previamente inoculadas com auxílio de um furador de rolha. Paralelamente, as culturas bacterianas e leveduriformes das linhagens padrão foram preparadas semeando-as em Ágar Mueller-Hinton (Kasvi) por esgotamento e incubadas por 24h a 37°C. Os inóculos das linhagens padrões foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v), para obtenção de uma suspensão bacteriana com uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e para uma suspensão de leveduras a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, de acordo com a escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2018). Em seguida, cada bloco de ágar contendo o crescimento do fungo foi transferido para a superfície de placas de Ágar Mueller-Hinton (MHA) inoculadas previamente com as linhagens *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC25923, e ATCC6538P), *E. coli* (ATCC25922) e *C. albicans* (ATCC10231), minutos antes da inoculação do bloco. As placas contendo o bloco de fungo endofítico e o inóculo bacteriano e leveduriforme foram incubadas a 37°C por 24h e 48h, respectivamente (SANTOS, 2013). O controle positivo utilizado foi uma solução de clorexidina a 0,2% (p/v) e o controle negativo foi um bloco de meio BDA estéril utilizado para o crescimento do fungo endofítico. Em seguida, as placas que apresentaram formação do halo de inibição ao redor do bloco de ágar foram selecionadas e os halos foram medidos. Halos com diâmetro maior que 9mm (incluindo o tamanho do bloco na medição) foram considerados como atividade antimicrobiana positiva (GONG; GUO, 2009). O teste foi realizado em duplicata técnica e biológica.

Figura 3. Fluxograma metodologia bloco de difusão em ágar



Fonte: AUTORA (2020).

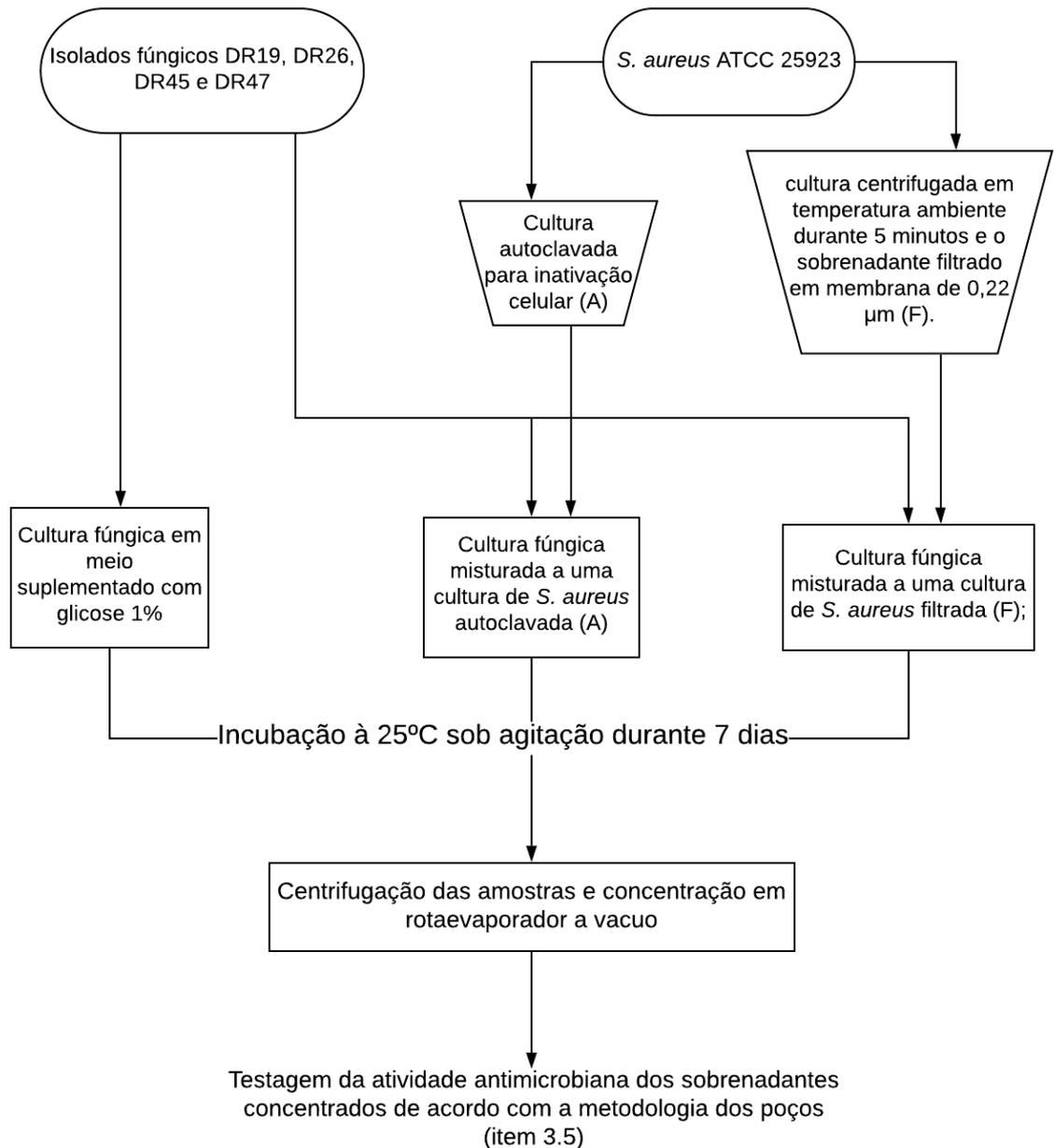
3.3 Identificação morfológica dos fungos

Inicialmente, os fungos que apresentaram atividade antimicrobiana no bloco de difusão (item 3.2) e que não foram previamente identificados taxonomicamente foram submetidos à identificação. Para a obtenção das estruturas microscópicas, foi realizado o microcultivo de cada linhagem fúngica em meio BDA (CBS, 2000). Após incubação a 25°C por 7 dias, as lamínulas foram coradas com lactofenol (azul de algodão) e posteriormente visualizadas em microscópio óptico em aumento de 40x. Além disso, para avaliação de características da macromorfologia da colônia fúngica, foi realizado o repique pontual dos fungos em meio BDA e o crescimento foi observado diariamente e comparado com literatura atual de identificação fúngica (CBS, 2000).

3.4 Cultivo submerso dos fungos filamentosos baseado em indução com patógenos

Os isolados fúngicos DR19, DR26, DR45 e DR47 foram selecionadas para um novo cultivo em meio líquido, uma vez que apresentaram atividade antimicrobiana prévia nos testes em bloco de ágar (item 3.2) e pertencem a gêneros fúngicos pouco estudados a respeito desta atividade (Figura 4). As linhagens fúngicas foram preparadas em meio líquido de 3 formas diferentes: **a.** cultura em meio Sabouraud (HIMEDIA) com glicose; **b.** Cultura fúngica em meio Sabouraud misturada a uma cultura de *S. aureus* filtrada (F); e **c.** Cultura fúngica em meio Sabouraud misturada a uma cultura de *S. aureus* autoclavada (A). A linhagem de *S. aureus* utilizada nestes experimentos foi a ATCC25923. Primeiramente, *S. aureus* foi cultivado em caldo Muller-Hinton (KASVI) sob agitação à 37°C por 18-20h. Posteriormente, esta cultura foi separada em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi autoclavada para inativação celular (A), e a outra alíquota foi centrifugada à 4000 x g em temperatura ambiente durante 5 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm(Kasvi) (F). Uma amostra controle também foi preparada contendo apenas o fungo em meio líquido Sabouraud suplementado com 1% de glicose (G). Em seguida, os três erlenmeyers (250mL) foram inoculados com os respectivos fungos DR47, DR45, DR19 e DR26. Os frascos foram, então, incubados à 25°C sob agitação durante 7 dias. Após esse período, as amostras foram centrifugadas à 4000 x g por 10min à 10°C. O sobrenadante de cada cultivo foi concentrado em concentrador à vácuo (*Vacuifuge Vacuum Concentrators from eppendorfs* - BioCompare) à 45°C e ressuspensão em DMSO 1% (p/v). Cada sobrenadante concentrado foi então testado quanto à atividade antimicrobiana, conforme descrito a seguir. Após o período de incubação verificou-se ausência de crescimento microbiano através de microscopia óptica.

Figura 4. Fluxograma da metodologia de cultivo submerso de fungos com indução de patógenos



Fonte: AUTORA (2020).

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana por metodologia dos poços

Inicialmente, o inóculo das linhagens teste de *Staphylococcus aureus* (ATCC29213, 25923, e 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC10231), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) e as linhagens clínicas de MRSA16005, VRE, e *K. pneumoniae* ESBL+ foram preparados através da inoculação das linhagens em Ágar Mueller-Hinton (KASVI) por esgotamento e incubadas à 37°C por 24h. Cada inóculo destas linhagens foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v) para obtenção de uma suspensão bacteriana com uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e para uma suspensão de leveduras a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, de acordo com a escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2018). Em seguida, cada inóculo padronizado foi semeado em placas contendo ágar Mueller-Hinton através de um swab estéril. Cada placa de ágar continha, previamente, poços (6mm). Em seguida, 70µL de cada cultivo fúngico foi aplicado no poço. O controle positivo utilizado foi 70 µL de clorexidina 0,2% (p/v) no poço, e o controle negativo foi a adição de 70µL de DMSO 1% (p/v), usado como solvente no extrato. Para cada amostra foi realizada uma replicata técnica e o teste foi repetido duas vezes nas mesmas condições para replicação biológica dos resultados. As placas foram então incubadas por 24h à 37°C. (CLSI, 2018). O resultado foi considerado positivo quando observado presença de halo de inibição ao redor dos poços.

3.6 Obtenção de extratos fúngicos a partir de cultivo em estado sólido

O fungo *A. stigyum* (DR47) foi cultivado em BDA à 28°C durante 7 dias. Ao mesmo tempo, foram preparados erlenmeyers (500mL) contendo 180g de arroz e 100 mL de água destilada. Os frascos foram então esterilizados em autoclave. Após o crescimento dos fungos nas placas, eles foram inoculados nos erlenmeyers contendo o arroz através de uma suspensão de esporos com Tween 80 0,01% (p/v) e mantidos à 28°C por 30 dias (SANTIAGO et al., 2005). Após o crescimento do fungo no arroz, o processo de extração foi iniciado, adicionando-se em cada Erlenmeyer 500mL de Acetato de Etila (EtOAc - DINÂMICA). Os

frascos foram mantidos sob agitação (120rpm) por 48h. Após o processo de extração, o extrato foi filtrado e rotaevaporado sob pressão reduzida (60mmBar) à 50°C por cerca de 30 minutos (ROTAVEVAPORADOR R-210, BUCHI) para obtenção do extrato concentrado. Os extratos foram ressuspensos em 50mL de DMSO (VETEC) 10% (p/v) e então submetidos a testes de atividade antimicrobiana, conforme descrito no item 4.5 (MEDINA et al., 2018).

3.7 Identificação e análise de *clusters* biossintéticos de metabólitos secundários no genoma do *Annulohyphoxylon stygium*

O genoma do *Annulohyphoxylon stygium* (DR47) foi sequenciado em colaboração com a pesquisadora Gabriela Felix Persinoti do Laboratório Nacional de Biorrenováveis, do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas-SP. A biblioteca genômica foi preparada utilizando o Kit Nextera DNA Library (Illumina). Em seguida, o genoma foi sequenciado na plataforma Illumina HiSeq2500 NGS (*Next-generation Sequencing*) do Laboratório Nacional de Biorrenováveis da Universidade de São Paulo (USP). A montagem foi feita pelo método *de novo* utilizando o *software* Velvet (<https://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>) com *kmer*=41 e em seguida o *scaffolding* foi feito utilizando-se o *software* SSPACE (BaseClear; <https://www.baseclear.com/services/bioinformatics/basetools/sspace-standard/>). Para predição de genes foi utilizado o *software* Augustus (Universidade de Gottingen, <http://augustus.gobics.de/>) (ROBL et al. dados não publicados).

O genoma sequenciado foi submetido a busca de *clusters* biossintéticos de metabólitos fúngicos conhecidos através da plataforma antiSMASH Fungal versão 5.0 (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*; <https://fungismash.secondarymetabolites.org>). Esse *software* permite a rápida identificação, anotação e análise de agrupamentos de genes relacionados a biossíntese de metabólitos secundários em todo o genoma. Ele integra e compara os dados utilizando um grande número de ferramentas de análise de metabólitos secundários *in silico* que foram publicadas anteriormente (BLIN et al., 2019).

Adicionalmente, também foi realizada uma busca no genoma do *A. stygium* das principais proteínas envolvidas nas vias biossintéticas de uma molécula denominada pirogalol (Tabela 1). O pirogalol foi anteriormente citado em um recente estudo brasileiro, sendo este produzido por uma cepa do fungo *A. stygium* e relacionado a atividade antimicrobiana contra MRSA e *E. coli* (MEDINA et al., 2018). Inicialmente, foi realizada uma busca na plataforma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; <https://www.genome.jp/kegg/>) para identificar as vias metabólicas onde o pirogalol estava inserido e quais os principais genes de proteínas e enzimas envolvidos nestas vias. Foram encontradas três vias relacionadas a síntese de compostos onde o pirogalol foi reportado, sendo elas: 1. Degradação de aminobenzoato (map00627); 2. Metabolismo microbiano em ambientes diversos (map01120); 3. Inibidores de transferases catecolaminas (map07226). A partir dessa busca inicial, com as sequências FASTA do total de 331 genes envolvidos com cada uma dessas vias disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi criado um banco de dados na plataforma Stingray@galaxy (*System for Integrated Genomic Resources and Analyses*) utilizando o programa *Make Blast Database* (Galaxy Version 0.1.08 – sequencias proteicas – Nomeado banco de dados: Pirogalol) (COCK et al., 2015). Em seguida, foi realizado uma busca no genoma do *A. stygium* contra o banco de dados anteriormente criado do pirogalol no programa NCBI BLAST+ blastp (Galaxy Version 0.1.08), utilizando como parâmetros um e-value de 0.005 e formato de saída Pairwise HTML.

3.8 Determinação da concentração de Monascorubrina

Uma alíquota (3mL) do extrato bruto fúngico do cultivo em arroz da amostra DR47 foi diluída numa proporção de 1:3 em etanol 100% (v\v) e submetido a leitura em espectrofotômetro (SPETRONIC UNICAM - GENESYS 20 *vis*) em uma faixa de comprimento de onda entre 320nm a 800nm para rastreamento do pigmento monascorubrina. Esse experimento foi realizado em colaboração com a técnica Denise Moritz no Laboratório de Engenharia Bioquímica do EQA/UFSC (MORITZ, 2005). A curva de absorbância do extrato do DR47 foi comparada com a curva da Monascorubrina (padrão) para possível identificação desta molécula em nossa amostra.

3.9 Espectrometria de massa do extrato de *A. stygium*

A análise do perfil metabólico foi realizada em espectrômetro de massas (Thermo Scientific, Q Exactive Plus Orbitrap), com infusão direta, equipado com fonte de ionização por *electrospray*, operando em modo negativo e positivo. Os analitos foram tentativamente identificados coletando-se espectros (*full scan*) na região de m/z de 180 a 600, com resolução de 60.000. Uma amostra controle (DMSO, grau MS) foi injetada previamente às análises das amostras para monitoramento da performance do espectrômetro de massa e obtenção de um espectro de *background* analítico. Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (CCA/UFSC sob supervisão do Prof. Marcelo Maraschin; UFSC).

4 RESULTADOS

4.1 Triagem da atividade antimicrobiana em bloco de difusão em ágar e identificação morfológica dos isolados fúngicos endofíticos

Os resultados obtidos na triagem com blocos de ágar possibilitaram realizar uma seleção dos principais isolados fúngicos com atividade antimicrobiana. Os isolados com atividade positiva foram considerados aqueles onde foi observado um halo inibitório ao redor do bloco.

Inicialmente, todos os 54 isolados fúngicos em estoque foram submetidos a esta triagem. Entre estes, apenas 7 (14,3%) apresentaram atividade contra as linhagens de microrganismos-teste. Os isolados fúngicos que apresentaram atividade contra a linhagem padrão de *S. aureus* ATCC25923 foram o 22, 27, 35, 55, 59, 62 e DR19 (Tabela 2). Dentre eles, o único isolado fúngico com atividade contra *E. coli* ATCC25922 foi o 59, e dois desses isolados fúngicos (59 e 35) apresentaram atividade contra *C. albicans* ATCC10231.

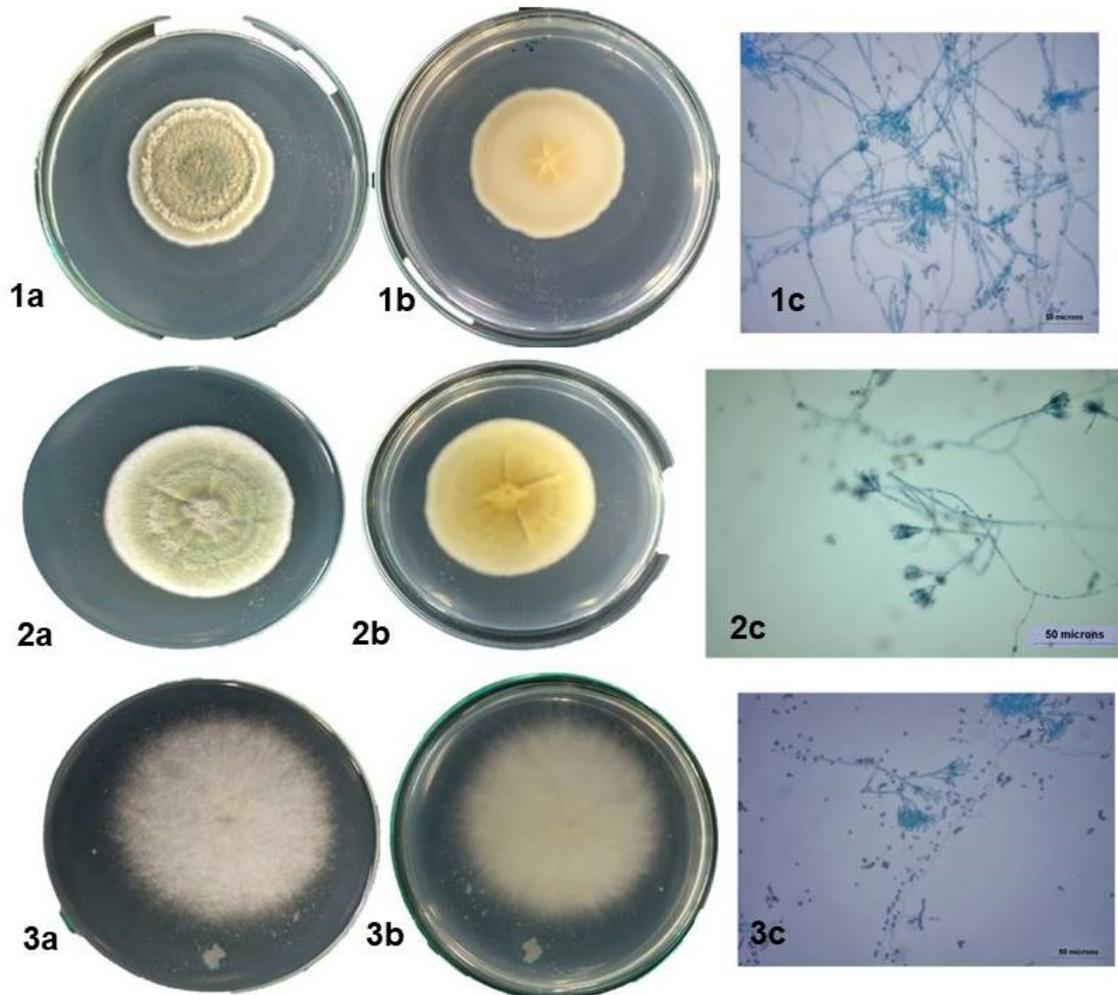
Tabela 2. Triagem da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos por metodologia de bloco de difusão em ágar isolados de Soja (*Glycine max*), Pinheiro (*Pinus elliottii*) e Eucalipto (*Eucalyptus benthamii*).

Isolado Fúngico	Identificação Morfológica	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
		25923	ATCC 25922	ATCC 10231
22	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-
27	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-
35	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	+
55	<i>Aspergillus</i> sp.	+	-	-
59	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+
62	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-
DR19	<i>Trichoderma atroviridae</i>	+	-	-

Legenda: +:observada presença de halo de inibição; -: não foi observado nenhum halo de inibição. (Fonte: Autora, 2020).

Todos os isolados fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana neste teste foram identificados por meio das características morfológicas do crescimento das colônias e microscópicas (Tabela 2; Figura 3 e 4). O principal gênero identificado foi *Penicillium* sp. (5 isolados), seguido de um *Aspergillus* sp. (1 isolado) e um *Trichoderma* sp. (1 isolado).

Figura 5. Macro (A e B) e micro morfológica (C) dos isolados fúngicos 27, 35 e 59



Legenda: 1a,b,c – Isolado 27 (*Penicillium* sp.); a/b- verso e reverso da colônia em meio BDA, c- microscopia óptica (40x). 2a,b,c – Isolado 35 (*Penicillium* sp.); a/b – verso e reverso da colônia em meio BDA, c-

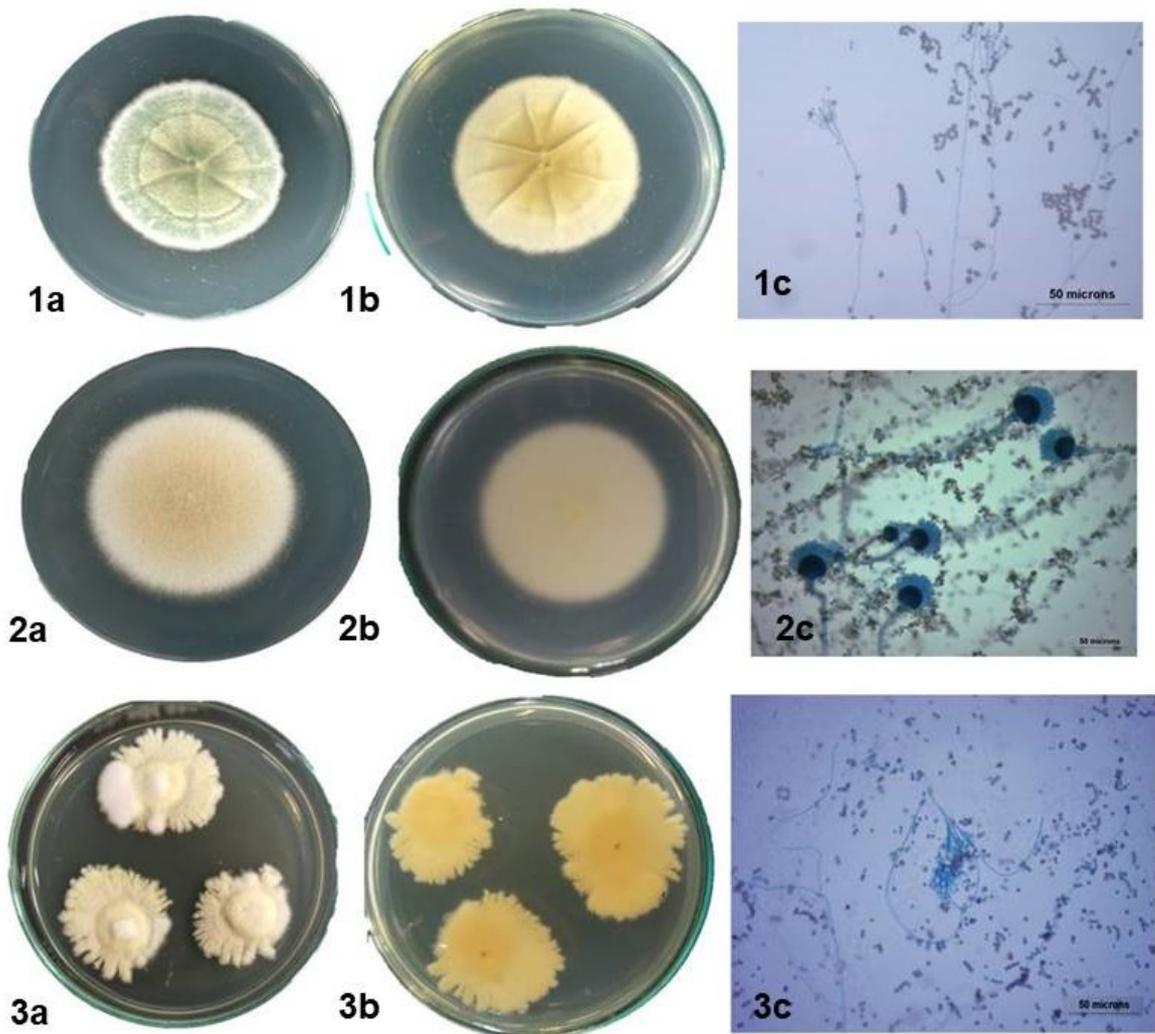
microscopia óptica (40x). 3a,b,c- Isolado 59 (*Penicillium* sp.); a/b - verso e reverso da colônia em meio BDA, c- microscopia óptica(40x) (Fonte: Autora, 2020).

Observa-se pela tabela 2 que o isolado fúngico com atividade antimicrobiana na triagem foi a linhagem 59, que apresentou atividade contra os três microrganismos-teste. Esta amostra foi identificada como *Penicillium* sp. (Figura 3 - 3a,b,c), através de suas características morfológicas e microscópicas de acordo com a literatura (CBS, 2000), apresentando aspecto macroscópico de crescimento das colônias algodonoso em meio sólido. À microscopia apresentou ramificações de conidióforos com conídios em seu entorno (Figura 3 - 3c).

As imagens apresentam as peculiaridades macroscópicas e microscópicas dos isolados fúngicos: 22, 55 e 62 (Figura 4). As linhagens endofíticas 22 e 62, foram classificadas dentro do gênero *Penicillium* sp. por exibirem, na microscopia, conidióforos ramificados (Figura 4 - 1c e 3c, respectivamente). Macroscopicamente, o isolado 22 tem uma coloração esverdeada com bordos esbranquiçados (Figura 4 - 1a), enquanto o isolado 62 tem uma coloração bege (Figura 4 - 3a). O isolado 55 (Figura 4 - 2a,b,c) foi identificado como *Aspergillus* sp. por apresentar em sua microscopia (Figura 2 - 2c) um conidióforo vesiculado, característico de espécies deste gênero.

A linhagem endofítica DR19, pertencente à coleção e utilizado nestes testes, já havia sido anteriormente identificada através da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) como uma espécie de *Trichoderma atroviridae* (Número de acesso GenBank: KC31184) (ROBL et al., 2013).

Figura 6. Macro (A e B) e micro morfológica (C) dos isolados fúngicos 22, 55 e 62



Legenda: 1a,b,c – Isolado 22 (*Penicillium* sp.); a/b- verso e reverso da colônia em meio BDA, c- microscopia óptica (40x). 2a,b,c – Isolado 55 (*Aspergillus* sp.); a/b – verso e reverso da colônia em meio BDA, c- microscopia óptica (40x). 3a,b,c- Isolado 62 (*Penicillium* sp.); a/b - verso e reverso da colônia em meio BDA, c- microscopia óptica(40x) (Fonte: Autora, 2020).

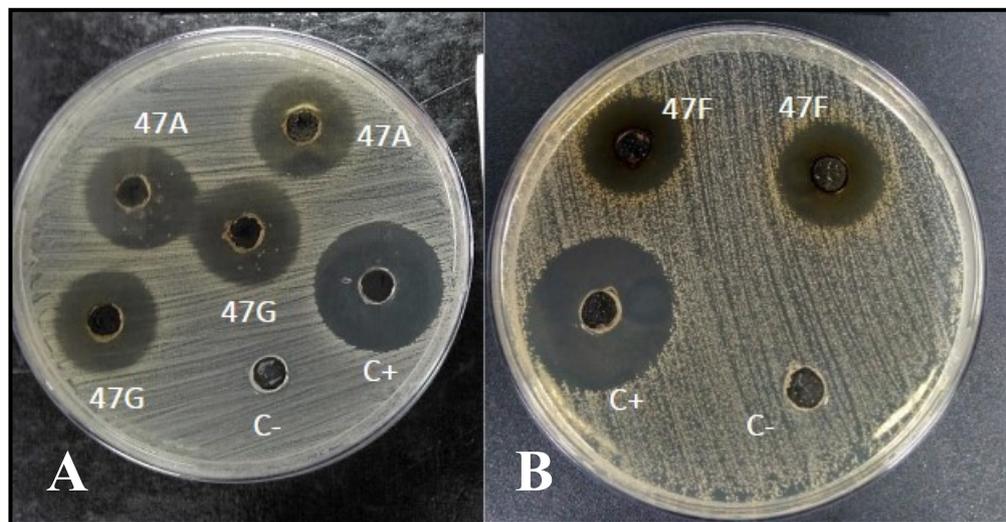
4.2 Teste antimicrobiano em poços das culturas fúngicas em meio líquido

Os resultados dos testes com o sobrenadante das culturas fúngicas cultivadas juntamente com *S. aureus* autoclavado e filtrado estão detalhados na Tabela 2. A partir dos resultados da triagem, foi selecionado para os testes posteriores apenas o isolado DR19 (*T. atroviridae*), por se tratar de um gênero fúngico com menos relatos sobre seu potencial

biotecnológico na literatura do que os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que são amplamente estudados. Adicionalmente, a partir deste momento, foram adicionados ao projeto os isolados DR26, DR45 e DR47, por se tratar de espécies de fungos endofíticos ainda pouco estudados quanto à atividade antimicrobiana e já identificados em um estudo anterior (ROBL et al., 2013). Estes isolados foram anteriormente identificados como *Trichoderma atroviride*, *Paecilomyces* sp., *Alternaria* sp. e *Annulohyphoxylon stygium*, respectivamente.

Cada isolado fúngico foi cultivado em três Erlenmeyers, um contendo apenas meio líquido Sabouraud para crescimento fúngico e o inóculo fúngico, outro com inóculo fúngico juntamente com o inóculo de cultura líquida de *S. aureus* que foi autoclavada (A) e um terceiro Erlenmeyer contendo o inóculo fúngico mais um inóculo de *S. aureus* filtrado em membrana de 0,22 μ m (F). Este teste foi realizado desta forma, uma vez que hipopetizamos que a presença de outro microrganismo no meio de cultivo do fungo poderia induzir a produção de mecanismos de defesa pelo isolado fúngico, dentre eles, a produção de substâncias antimicrobianas.

Figura 7. Atividade antifúngica contra *C. albicans* dos sobrenadantes concentrados do DR47



Legenda: A e B – *C. albicans* ATCC10231; (47A) – Cultura líquida com *S. aureus* autoclavado; (47F) – Cultura líquida com *S. aureus* filtrado; (47G) – apenas inóculo fúngico; (C+) Controle positivo; (C-) Controle negativo. (Fonte: Autora, 2020).

Os halos de inibição da atividade antimicrobiana de cada sobrenadante concentrado das culturas foram medidos e estão detalhados abaixo (Tabela 3). Observa-se que o DR19 não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana, sendo o único isolado fúngico com nenhuma atividade neste teste. Já o DR47 foi o mais efetivo dentre os isolados, demonstrando atividade principalmente com os sobrenadantes autoclavado (A) e filtrado (F), onde foi possível observar halo inibitório contra duas linhagens estafilocócicas e *C. albicans*. O cultivo do DR47 em meio contendo apenas o fungo (G) apresentou apenas halo de inibição contra a levedura *C. albicans* (figura 5). Os isolados DR26 e DR45 apenas exibiram uma capacidade antifúngica com os cultivos A e F. Nenhuma dos isolados apresentou atividade contra as linhagens clínicas de MRSA e *K. pneumoniae* ESBL+ testadas.

Tabela 3. Medidas dos halos de inibição (mm) dos sobrenadantes concentrados (5x) da cultura líquida fúngica preparados com culturas de *S. aureus* autoclavada e filtrada (Média dos diâmetros dos halos de inibição, em mm \pm o desvio padrão calculado a partir de duplicatas técnicas)

Microrganismo-teste	AMOSTRA FÚNGICAS											
	DR47			DR26			DR19			DR45		
	A	F	G	A	F	G	A	F	G	A	F	G
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	5,3 \pm 4,7	9,5 \pm 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	15 \pm 4,4	10 \pm 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	19,6 \pm 0,6	19 \pm 1,4	20,3 \pm 2,5	16,3 \pm 1,1	18,3 \pm 1,5	-	-	-	-	8,3 \pm 7,3	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ESBL+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Culturas fúngicas em meio líquido sabouraud com *S. aureus* (F) – Filtrado em membrana de 0,22 μ m; (A) – Autoclavado por autoclave à 120°C por 15 minutos; (G) – Crescimento apenas de amostra fúngica em meio líquido com glicose.; (-) sem presença de halo de inibição. (Fonte: Autora, 2020)

4.3 Teste antimicrobiano de extrato em cultivo em estado sólido do fungo *Annulohyphoxylon stygium* (DR47)

De acordo com os resultados do teste da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes da cultura líquida dos isolados fúngicos (Tabela 3) foi selecionado o isolado DR47 (*Annulohyphoxylon stygium*), por seu maior potencial antimicrobiano, para a preparação de um extrato deste fungo a partir de cultivo em estado sólido usando o arroz como substrato e suporte. Esse fungo ainda é pouco explorado quanto a sua capacidade antimicrobiana, sendo encontrado apenas um estudo que isolou e demonstrou a atividade antimicrobiana deste isolado contra algumas linhagens bacterianas (MEDINA et al., 2018).

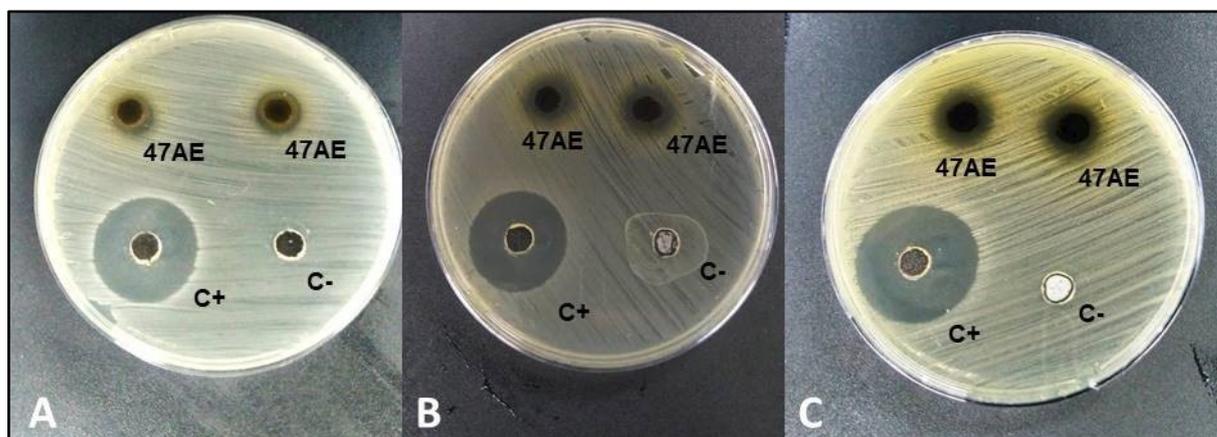
Figura 8. Crescimento do *A. stygium* DR47 em arroz (30 dias 25°C)



(Fonte: Autora, 2020)

O extrato obtido após extração com acetato de etila apresentou uma coloração marrom escura. Todo o solvente orgânico foi rotaevaporado sob pressão reduzida e o extrato bruto foi ressuspensionado em 50mL de DMSO 10%, obtendo uma concentração de 54,2 mg/L

Figura 9. Teste antimicrobiano (metodologia dos poços) do isolado DR47 contra três linhagens de *S. aureus* A – Linhagem ATCC25923; B- Linhagem ATCC29213 e C- Linhagem ATCC6538P O extrato fúngico foi obtido a partir do cultivo em estado sólido (arroz). (47AE) – Extrato bruto do DR47; (C+) – Controle positivo: clorexidina 0,2%; (C-) – Controle negativo: DMSO 10%



(Fonte: Autora, 2020)

O extrato bruto (47AE) foi então testado contra linhagens gram-positivas e gram-negativas de microrganismos ATCC e clínicos, através da metodologia dos poços. O isolado demonstrou atividade principalmente contra linhagens gram-positivas de *S. aureus* (Figura 7), com halos variando entre 11mm e 14,3mm (Tabela 4). Entretanto, o DR47 não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma linhagem gram-negativa, porém apresentou atividade contra a levedura *C. albicans* (Tabela 4 – Figura 8) e apresentou halo de inibição contra uma linhagem clínica de MRSA (Figura 8).

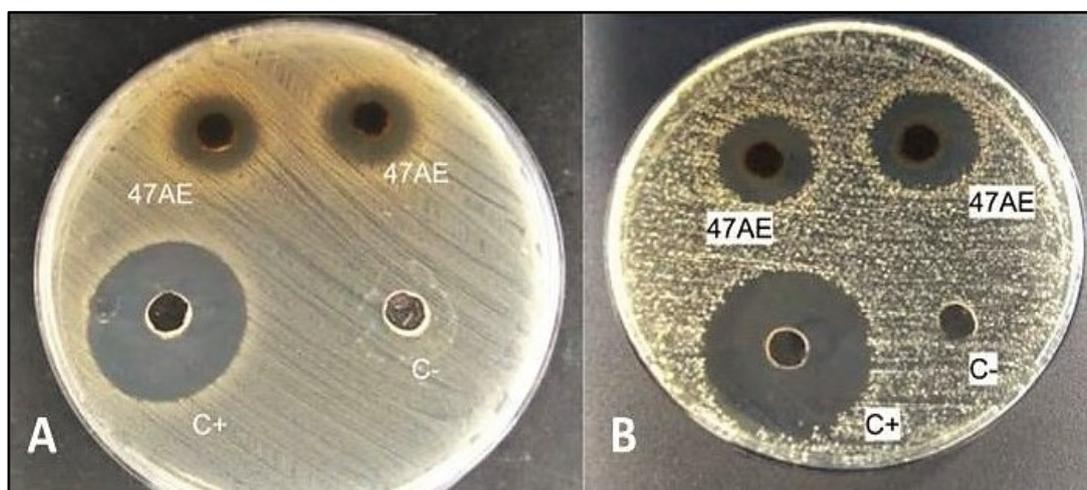
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de extrato bruto obtido a partir de cultivo em estado sólido (arroz) do fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium* DR47 frente linhagens de bactérias e *C. albicans*. O desvio padrão foi calculado de acordo com duplicatas técnicas.

Microrganismo-teste	Extrato bruto - DR47AE
	(medidas dos halos de inibição em mm) ± desvio padrão
<i>S. aureus</i> ATCC25923	14,3±3,2
<i>S. aureus</i> ATCC29213	11±0,8
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	11,75±0,5

<i>E. coli</i> ATCC25922	-
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028	-
<i>C. albicans</i> ATCC10231	18,5±1,7
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	-
VRE	-
MRSA	14,3±2,3
<i>K. pneumoniae</i> ESBL+	-

Legenda: (-) sem halo de inibição. (Fonte: Autora, 2020)

Figura 10. Teste antimicrobiano (metodologia dos poços) do isolado DR47 contra uma linhagem de MRSA (16-005; foto do lado esquerdo) e uma linhagem de *C. albicans* (ATCC10231; foto do lado direito).



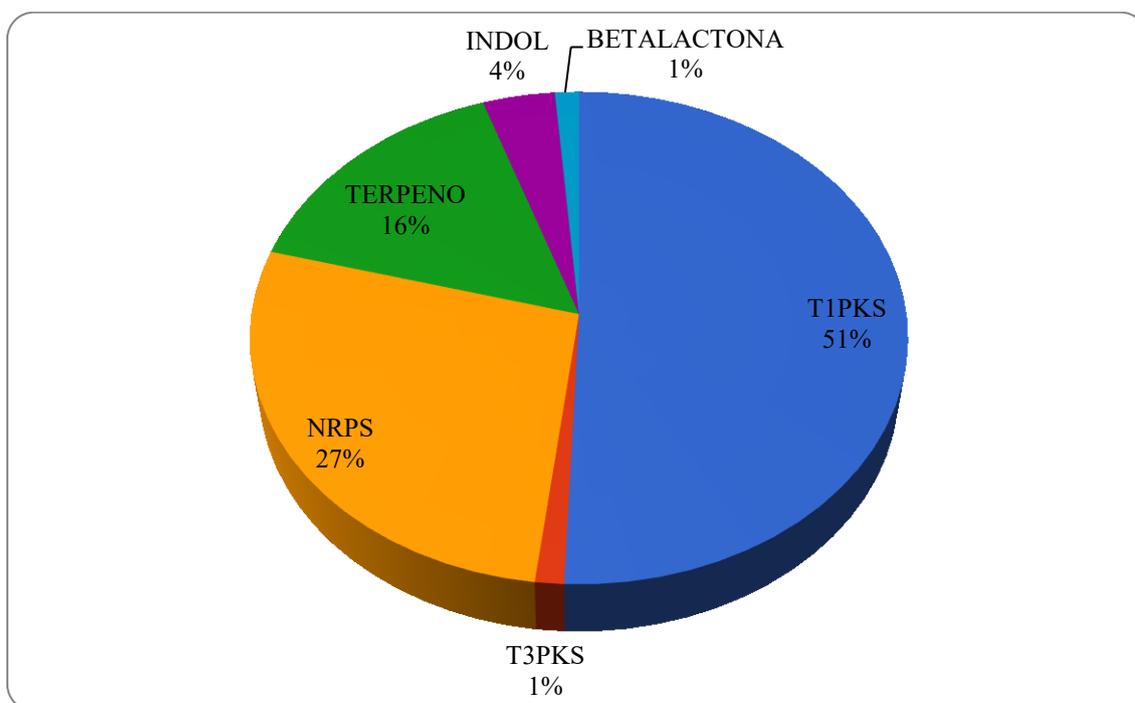
Legenda: A- MRSA16005; B- *C. albicans* ATCC10231 (47AE) – Extrato bruto do DR47; (C+) – Controle positivo: clorexidina 0,2%; (C-) – Controle negativo: DMSO 10%. O extrato fúngico foi obtido a partir de cultivo em estado sólido (arroz). (Fonte: Autora, 2020)

4.4 Análise genômica de *clusters* biossintéticos de metabólitos secundários no genoma do *A.stygium* (isolado DR47)

A montagem final do genoma apresentou tamanho de 38.3Mb e a cobertura estimada em 98% com BUSCO (Universidade de Genebra, <https://busco.ezlab.org/>). A análise genômica foi

realizada através da plataforma antiSMASH, que identificou 70 *clusters* biossintéticos envolvidos com o metabolismo secundário dos fungos no genoma do *A. stygium* (DR47). A principal categoria de *clusters* encontrada está relacionada à produção de policetídeos sintases do Tipo I (T1PKS), correspondendo a 51% das regiões, sendo seguida por 27% de *clusters* envolvidos na produção de peptídeo sintases não-ribossomais (NRPS), 16% de terpeno sintases, 4% na produção de indol, 1% de policetídeo sintase do tipo 3 (T3PKS) e de um inibidor de protease contendo beta-lactona (Gráfico 1).

Gráfico 1. Principais categorias de clusters de genes de metabólitos secundários encontrados na plataforma antiSMASH do isolado DR47 (*Annulohyphoxylon stygium*)



Legenda: (T1PKS) – Policetídeo sintase do Tipo 1; (T3PKS) – Policetídeo sintase do Tipo 3 (NRPS) – Peptídeo sintase não-ribossomal; (TERPENO) – terpeno sintase; (INDOL) – indol; (BETALACTONA) - inibidor de protease contendo beta-lactona. (Fonte: Autora, 2020)

Entre os clusters descritos, 9 deles estão envolvidos com dois tipos diferentes de enzimas, sendo 4 clusters envolvidos tanto na produção de policetídeos do tipo 1 quanto na de peptídeos não-ribossomais (T1PKS-NRPS/ *Clusters* 35, 43, 44 e 60), 2 envolvidos tanto na produção de terpeno quanto na de policetídeos do tipo 1 (Terpeno-T1PKS/ *Clusters* 29 e 62), 2

envolvidos na produção de indol e T1PKS (Indol-T1PKS / *Clusters* 40 e 58) e 1 cluster envolvido na produção de NRPS e betalactona (NRPS-Beta-lactona/ *Cluster* 39).

Tabela 5. Clusters de genes relacionados a produção de metabólitos secundários em *Annulohyphoxylon stygium* (DR47)

CLUSTER	TIPO	Similaridade	Produto predito para o cluster
Cluster 1	T1PKS	100%	1,3,6,8-tetrahidronaftaleno
Cluster 11	T1PKS	11%	Chaetoviridina / Chaetomugilina
Cluster 13	T1PKS	100%	Fusarina
Cluster 27	T1PKS	100%	Monascorubrina
Cluster 35	T1PKS-NRPS	100%	Wortmanamide A
Cluster 40	T1PKS-indol	26%	Neurosporina A
Cluster 47	T1PKS	14%	Xenovuleno
Cluster 50	T1PKS	100%	Ácido úsnico
Cluster 55	NRPS	100%	Dimetilcoprogen
Cluster 57	T1PKS	12%	Fusaridiona A
Cluster 58	T1PKS-indol	25%	Ácido micofenólico
Cluster 59	T1PKS	28%	Shanorellin
Cluster 62	T1PKS-terpeno	14%	Oosporeína
Cluster 66	T1PKS	14%	Ácido estipiático
Cluster 68	T1PKS	25%	Betaenona A, B e C

Fonte: AUTORA (2020).

Entretanto, apenas 15 *clusters* se apresentaram como possíveis vias para moléculas já conhecidas (Cluster 1, 11, 13, 27, 35, 40, 47, 50, 55, 57, 58, 59, 62, 66 e 68) por conterem um ou mais genes envolvidos em vias biossintéticas. Todos os outros *clusters* não foram associados a nenhuma molécula conhecida quando alinhados contra bancos de dados. Dentre os *clusters* encontrados no genoma do *A. stygium* envolvidos em vias biossintéticas relatadas na literatura, 6 deles apresentaram uma similaridade de 100% (Tabela 6) com genes envolvidos na via de metabólitos com diversas aplicações relatadas, desde a utilização como corantes alimentares (WOO et al., 2014) até sua utilização em processos biológicos do próprio microrganismo, como a melanina (WOO et al., 2010), micotoxinas (KYEKYEKU et al., 2017), pigmentos (ALURAPPA et al., 2014), siderofóros e furonquinonas (ZHAO et al., 2017). Além disso, dentro de alguns destes *clusters* foi possível identificar outros genes envolvidos com a via como genes regulatórios, de resistência, de transferência e codificadores de enzimas importantes na via de produção destas moléculas, como desidrogenases, oxireductases e metiltransferases. Algumas

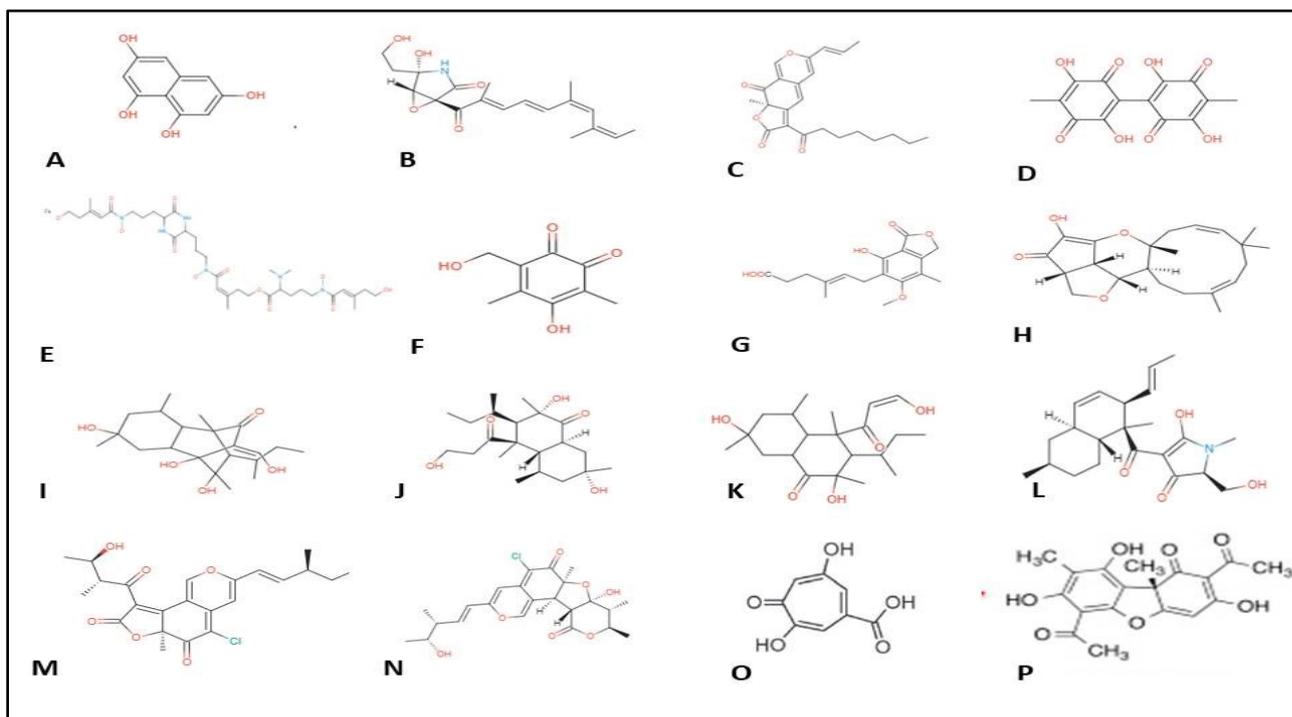
delas estão reportadas na literatura com diversas atividades biológicas em diferentes microrganismos fúngicos, entre elas atividade antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, entre outras.

Além desses resultados, o antiSMASH também realizou uma predição da estrutura química das moléculas encontradas para as referidas vias biossintéticas. Com base nestas informações, fizemos uma busca no PubCHEM (Centro Nacional de Informação Biotecnológica, Estados Unidos - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e foi possível identificar o nome molecular e estrutura química de algumas moléculas (Figura 8). Foram encontradas três estruturas diferentes para as betaenonas, pois estas correspondem a três tipos de moléculas produzidas pela mesma via biossintética e que podem ter funções diferentes ainda não identificadas (Figura 8 – I, J e K). Estes dados podem servir como base para busca dessas moléculas no extrato do isolado DR47.

As análises realizadas na busca das vias do pirogalol no genoma do isolado DR47 (item 3.7) demonstraram não haver nenhuma das proteínas e enzimas do banco de dados dentro do genoma, visto que nenhuma porcentagem de similaridade foi encontrada para nenhuma das vias de síntese testadas.

Figura 11. Estrutura química das moléculas previstas pelo antiSMASH e PUBCHEM

Legenda: (A) 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno; (B) Fusarina C; (C) Monascorubrina; (D) Oosporeína; (E) Dimetilcoprogênio; (F) Shanorellin; (G) Ácido micofenólico; (H) Xenovuleno; (I) Betaenona A; (J) Betaenona B; (K) Betaenona C; (L) Fusaridiona A; (M) Chaetoviridina A; (N) Chaetomugilina D; (O) Ácido estipiático; (P) Ácido úsnico.



Fonte: Autora (2020).

Tabela 6. Moléculas previstas pelo antiSMASH e suas atividades relatadas na literatura

Molécula	Aplicação/ Uso	Similaridade / Tipo	Atividade relatada	Microrganismo	Referência
1,3,6,8-tetrahidronaftaleno	Precursor da Melanina	100% - T1PKS	NR	NR	NR
Fusarina C	Micotoxina	100% - T1PKS	7 Compostos derivados de fusarina C (7-desmetil Fusarina C) – Compostos 3,4 e 6 apresentaram atividade contra <i>Acinetobacter</i> sp. Todos os compostos apresentaram atividade contra <i>E. coli</i> ambiental	<i>Fusarium solani</i> JK10	Kyekyeku et al., 2017
Monascorubrina	Corante alimentar	100% - T1PKS	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Monascus purpureus</i>	Martínková et al., 1999
			<i>E. coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Monascus anka</i>	Nozaki et al., 1991
Dimetilcoprogênio	Sideróforo	100% - NRPS	NR	NR	NR
Ácido úsnico	Furanodiona	100% - T1PKS	Atividade antioxidante e pro-oxidante	<i>Xanthoparmelia farinosa</i>	Kohlhardt-Floehr et al., 2010

			Atividade citotóxica contra linhagens celulares cancerígenas HeLa, A2780, MCF-7, SK-BR-3 e HT-9	<i>Xanthoria parietina</i>	Bačkorová et al., 2011
			Atividade antifúngica contra <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	NR	Pires et al., 2012
			Atividade antiprotozoária contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Cladonia substellata</i>	Carvalho et al., 2005
			Atividade antimicrobiana contra MRSA, VRE e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NR	Elo et al., 2007; Lira et al., 2009
			Atividade antiviral	<i>Usnea</i> sp.	Sokolov et al., 2012
Wortmanamide A	Desconhecido	100% - T1PKS	NR	NR	NR
<i>Shanorellin</i>	Pigmento benzoquinona	28% - T1PKS	NR	NR	NR
<i>Neurosporin A</i>	Inseticida furocoumarino	26% - T1PKS/indole	Inseticida e resistência química	<i>Neurospora crassa</i>	Zhao et al., 2017

<i>Betaenone A, B e C</i>	Fitotoxinas	25% -T1PKS	Compostos derivados de betaenona com atividade inibitória de proteínas quinases	Gênero: <i>Microsphaeropsis</i>	Brauers et al., 1999
<i>Stipitatic acid</i>	Tropolona	14% - T1PKS	NR	NR	NR
Oosporeína	Pigmento vermelho	14% - T1PKS / terpeno	Atividade antimicrobiana: <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	Alurappa et al., 2014
			Atividade citotóxica contra células A549 por teste MTT	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	Alurappa et al., 2014
			Atividade antioxidante	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	Alurappa et al., 2014
			Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Micrococcus lysodeikticus</i> / e atividade antifúngica contra <i>Candida utilis</i> e <i>Rhodotorula rubra</i>	<i>Chaetomium aureum</i>	Taniguchi et al., 1984
			Atividade antiviral	<i>Beauveria</i> sp.	Terry et al., 1992

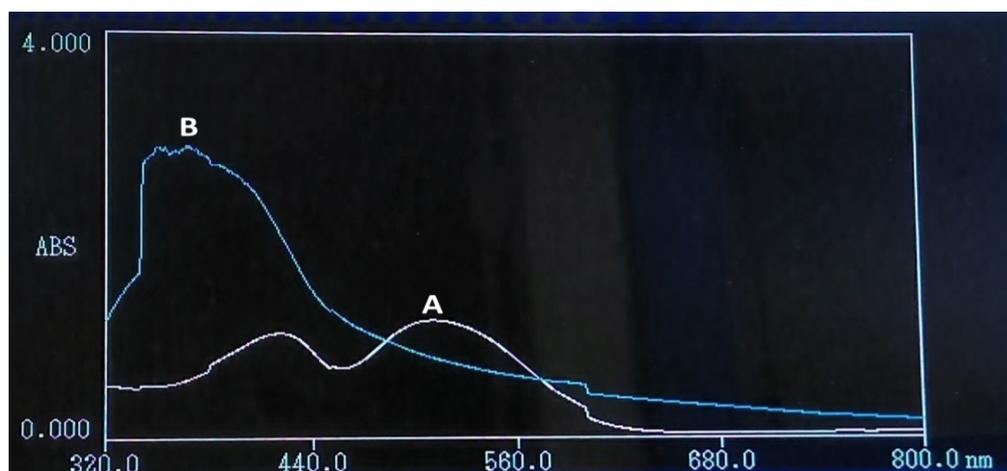
			Atividade inseticida	<i>Beauveria bassiana</i>	Amin et al., 2010
Fusaridiona A	Desconhecido	12% - nrps-T1PKS	NR	NR	NR
Xenovuleno	Meroterpenóide	14% - T1PKS	Inibidor do receptor benzodiazepínico	<i>Acremonium strictum</i>	Ainsworth et al., 1995
Chaetoviridin A	Azafilona	11% - T1PKS	Atividade antimicrobiana: <i>Vibrio vulnificus</i> MCCC E1758; <i>Vibrio rotiferianus</i> MCCC E385; <i>Vibrio campbellii</i> MCCC E333 e contra MRSA / atividade citotóxica contra células cancerígenas: A549, HeLa e Hep G2	<i>Chaetomium</i> sp. NA-S01-R1	Wang et al., 2018
Chaetomugilin D	Azafilona	11% - T1PKS	Atividade antimicrobiana contra <i>V. vulnificus</i> MCCC E1758; <i>V. rotiferianus</i> MCCC E385 e MRSA	<i>Chaetomium</i> sp. NA-S01-R2	Wang et al., 2018
Ácido micofenólico	Droga imunossupressora	25% - T1PKS/indole	Atividade antifúngica - <i>R. solani</i>	<i>P. brevicompactum</i>	Nicoletti et al., 2004
			Atividade antiviral: anti-HIV	NR	Borrot-Esoda et al., 2004
			Atividade antibacteriana - <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	NR	Kavanagh, 1947

Legenda: (NR) – Não relatado. (Fonte: Autora, 2020).

4.5 Dados de espectrofotometria ultra-violeta do extrato do *A. stygium* em comparação com a Monascorubrina

As análises de bioinformática forneceram dados de um gene ortólogo presente no genoma do *A. stygium* (DR47) que está envolvido na produção de uma molécula denominada monascorubina (Tabela 5). Considerando a capacidade antimicrobiana desta molécula relatada na literatura (Tabela 6; MARTINKOVA, 1999), o extrato bruto do isolado DR47 foi analisado por espectrofotometria com ultra-violeta (Figura 10), para verificar se a monascorubina estaria presente em nosso extrato. Na varredura do extrato fúngico por espectrofotometria, comparando com a curva padrão da monascorubina, foi observada uma curva com absorvância entre 310nm com pico em 410nm (Figura10) para o nosso extrato, com pico máximo de absorvância em 349nm, o que demonstra então que outra molécula com esse pico de absorvância está sendo observada em nosso extrato, não sendo compatível com a curva de absorvância da monascorubina. Assim, esta molécula não pode ser encontrada no extrato do DR47 através desta metodologia (Figura 10-A).

Figura 12. Espectrofotometria UV do extrato de *A. stygium* e Monascorubrina



Legenda: (A) Curva de absorvância da Monascorubrina; (B) Curva de absorvância do extrato do DR47 diluído 3x em Etanol 100% (SPETRONIC UNICAM - GENESYS 20 *vis.* Fonte: MORITZ, 2005). (Fonte: Autora, 2020).

4.6 Dados de espectrometria de massa do extrato do *A. stygium*

Os resultados obtidos com as primeiras análises da espectrometria do extrato do isolado DR47 (*A. stygium*) não foram conclusivos. Durante o ensaio realizado, observou-se um certo grau de degradação do extrato, não sendo possível realizar a caracterização bioquímica. Assim, são necessários experimentos adicionais para a caracterização do extrato do isolado DR47.

5 DISCUSSÃO

A busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana ocorre em todo o mundo, principalmente com o objetivo de contribuir para a expansão das opções terapêuticas no caso de infecções associadas a microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos. Os fungos endofíticos fazem parte deste contexto, pois através da sua interação com o hospedeiro vegetal são capazes de fornecer inúmeros benefícios protetivos, dentre eles, a produção de compostos antimicrobianos contra bactérias e fungos patogênicos de suas plantas hospedeiras (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017; YAN et al., 2019). O presente estudo encontrou através de uma triagem inicial, fungos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., pertencentes ao filo Ascomycota, com atividade antimicrobiana promissora. Estudos mostram que mais de 80% dos isolados endofíticos de importância biotecnológica relatadas são ascomicetos (MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017). Além disso, *Penicillium* e *Aspergillus* são dois gêneros fúngicos intensamente empregados em diversos processos biotecnológicos (NICOLETTI; FIORENTINO; SCOGNAMIGLIO, 2014; PARK et al., 2017) e também quando endófitos de plantas, principalmente medicinais, esses gêneros fúngicos são extensivamente estudados, expondo uma atividade antimicrobiana já conhecida (SILVA et al., 2011; BEZERRA et al., 2015; DINESH et al., 2017), corroborando assim com os resultados encontrados neste estudo.

Por serem exhaustivamente estudados, os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* muitas vezes produzem moléculas já conhecidas, isoladas ou comercializadas, o que tem feito com que a busca por novas biomoléculas se volte para gêneros fúngicos menos comuns e para novas estratégias de cultivo e obtenção de extratos fúngicos. Sendo assim, este estudo utilizou um teste qualitativo em cultivo líquido de quatro linhagens fúngicas de gêneros menos comumente estudados cultivadas juntamente com inóculos bacterianos em diferentes condições, sendo eles: *Paecilomyces* sp. (DR26), *Trichoderma atroviride* (DR19), *Annulohyphoxylon stygium* (DR47) e *Alternaria* sp. (DR45). Os sobrenadantes concentrados dessas culturas foram testados contra diferentes linhagens patogênicas, sendo a inibição antifúngica contra *C. albicans* a principal encontrada e produzida por três isolados fúngicos: DR26, DR47 e DR45.

Entre as atividades antimicrobianas observadas, este trabalho relatou a atividade antimicrobiana de um *Trichoderma* sp. contra uma linhagem estafilocócica (DR19, tabela 3). Esse gênero fúngico é o mais empregado no controle biológico de fitopatógenos em toda a América (EMBRAPA, 2009; EMBRAPA, 2018). Inúmeras empresas com patentes reconhecidas já comercializam este fungo no tratamento de pragas em distintas plantações, e atualmente as pesquisas voltam-se principalmente no melhoramento destes processos para obtenção de uma maior eficiência (CAVERO et al., 2015; HADDAD et al., 2017; MARRASCHI et al., 2019). Esses fungos também são citados como endófitos com habilidades antimicrobianas importantes: um trabalho de Ferreira e colaboradores (2017), isolou de uma planta tropical brasileira ameaçada de extinção, uma espécie de *Trichoderma effusum* com potencial antibacteriano contra micobactérias e *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA). Um número aproximado de mais de 40 metabólitos já foram isolados de espécies de *Trichoderma*, como micotoxinas, moléculas policetílicas, sesquiterpenos, composto aromáticos, dentre outras, apresentando aplicações biológicas tanto na inibição de patógenos humanos, até atividade antiparasitária, anti-inflamatória, antiproliferativa e de biocontrole (LEYLAIE; ZAFARI, 2018).

De acordo com Xu e colaboradores (2017), uma espécie de *Paecilomyces* sp. isolada do solo também exibiu produção de compostos antifúngicos capazes de inibir o crescimento de dois fungos fitopatogênicos: *Penicillium litchii* e *Fusarium verticillioides* (XU et al., 2017). Um outro estudo, com endófito de uma alga marinha vermelha, identificado como *Paecilomyces variotii*, avaliou extratos deste fungo quanto a produção de substâncias biológicas importantes e encontrou um composto alcaloide, denominado varioxepina A, com inibição microbiana contra linhagens de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, além de uma concentração inibitória mínima (MIC) de 4µg/mL contra o fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum* (ZHANG et al., 2014). A capacidade inibitória de fungos endófitos contra uma linhagem leveduriforme de *C. albicans* é também já reportada na literatura em um trabalho com *Paecilomyces* sp. endófito de uma planta originária de manguezal, capaz de produzir o metabólito secundário antifúngico denominado paeciloxocins A (WEN et al., 2010).

O isolado pertencente ao gênero *Alternaria* (DR45) foi o menos efetivo contra *C. albicans*, exibindo inibição em apenas uma das condições de cultivo testadas (Tabela 3). Espécies endofíticas de *Alternaria* tem sido mais comumente relatadas como potentes inibidores de fitopatógenos fúngicos, gerando biomoléculas ativas contra linhagens virulentas de plantas de interesse econômico (WANG et al., 2015; SOLTANI et al., 2014; LOU et al., 2016). Em contra partida, endófitos desse gênero foram descobertos como produtores de possíveis moléculas anti-leveduriforme: Fernandes e colaboradores (2009), testaram um extrato de uma linhagem isolada do café de *Alternaria alternata* com atividade antibacteriana e antifúngica (*C. albicans* ATCC69548) significativas (FERNANDES et al., 2009).

O isolado fúngico com maior espectro de inibição foi o DR47, classificado como *Annulohyphoxylon stygium*. Este isolado exibiu poder inibitório contra *C. albicans* nas três condições de cultivo (tabela 3). Além disso, essa linhagem foi a única capaz de apresentar halo inibitório contra 2 espécies bacterianas gram-positivas estafilocócicas. Essa espécie fúngica foi relatada anteriormente com alto potencial enzimático na produção de glicohidrolases, enzimas capazes de degradar biomassas, sendo uma alternativa para utilização na degradação de resíduos industriais, como o bagaço de cana-de-açúcar (ROBL et al., 2015). Estudos são ainda incomuns quanto à competência antimicrobiana desse gênero, porém alguns têm demonstrado sua capacidade de geração de moléculas bioativas para as mais diversas aplicações biológicas. Por exemplo, a produção de substâncias anti-inflamatórias (LI et al., 2017), antibacterianas contra *B. subtilis* e *S. aureus* e um moderado efeito citotóxico em células cancerígenas murinas pelo endófito *A. truncatum* já foram relatadas (SURUP et al., 2016). Uma linhagem da espécie *Annulohyphoxylon cohaerens* produziu também moléculas identificadas como coerinas, com atividade antibacteriana contra *S. aureus* e citotóxica frente a linhagem celular cancerígena de fibroblastos de ratos L-929 (SURUP et al., 2013).

A utilização do cultivo fúngico na presença de uma linhagem de *S. aureus* foi utilizada neste trabalho visando mimetizar condições mais próximas de contexto ambiental natural, onde o fungo interage com linhagens bacterianas potencialmente patogênicas, assim podendo induzir a produção de moléculas antimicrobianas como uma forma de proteção para si mesmo e de competitividade pelo espaço e nutrientes presente no meio (KARUPPIAH et

al., 2019; WU et al., 2019). Estudos de co-cultivo de fungos e bactérias tem sido explorados como uma estratégia para a produção de metabólitos desconhecidos (WAKEFIELD et al., 2017). O estudo de Wakefield e colaboradores (2017) demonstrou que quando uma cepa bacteriana foi cultivada em conjunto com uma linhagem fúngica, estas apresentaram perfis de produção de metabólitos que não foram observados quando eles foram cultivados isoladamente, indicando que a presença de outro microrganismo induziu a produção de metabólitos antes desconhecidos. Além disso, um outro trabalho observou que a indução de metabólitos por uma cepa bacteriana cultivada juntamente com *Aspergillus fumigatus* foi o estímulo principal para a produção de metabólitos fúngicos nesta espécie (RATEB et al., 2013).

O cultivo fúngico do isolado DR47 com cultura de *S. aureus* filtrada (F) favorece a interação do fungo principalmente com moléculas extracelulares produzidas pela bactéria, enquanto o cultivo fúngico com cultura de *S. aureus* autoclavada (A) favorece a interação com conteúdo hidrolisado da célula bacteriana total. No entanto, não foi possível observar um aumento da capacidade inibitória do fungo em uma condição de interação específica, considerando todos os isolados testados. Por outro lado, ao menos para o isolado DR47, a interação com a cultura de *S. aureus* (A ou F) favoreceu a atividade antimicrobiana, quando comparada com o cultivo do fungo apenas com glicose (tabela 3), sugerindo que a produção da (s) molécula (s) com atividade estão sendo induzidas na presença da linhagem bacteriana.

Sabendo da potencialidade antimicrobiana do fungo DR47 a partir do estudo de análise qualitativa, esse endófito foi escolhido para investigação da produção de compostos antimicrobianos através de um cultivo em estado sólido e de extração com solventes orgânicos para melhor eficácia e alcance de metabólitos antimicrobianos. Acerca de nosso conhecimento, apenas dois trabalhos recentes publicados abordam estudos com *Annulohyphoxylon stygium*, isolados como endófitos de algas marinhas (MACIEL et al., 2018; MEDINA et al., 2018). No estudo feito por Maciel e colaboradores (2018), os autores isolaram do extrato fúngico algumas moléculas com potencial fotoprotetivo, a partir de um cultivo em estado sólido, usando o arroz como substrato. A partir destes resultados, o presente trabalho também realizou esse tipo de cultivo, já que este é atualmente reportado como um método bastante utilizado com fungos para obtenção de metabólitos, visto que mimetizam

características do hábitat natural do microrganismo (SOCCOL et al., 2017). O crescimento em arroz também é capaz de fornecer um maior valor nutricional para o crescimento e desenvolvimento do fungo, quando comparados com trabalhos que usam para o crescimento fúngico resíduos agroindustriais, como bagaço de laranja, melado, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros nestes tipos de cultivo (SOCCOL et al., 2017). A utilização de acetato de etila como o solvente para extração visou selecionar moléculas polares, já que esse composto é bastante utilizado em processos extrativos uma vez que favorece o isolamento de compostos fenólicos, terpenos e flavonoides. Esses tipos de moléculas são produzidas por um amplo espectro de fungos endofíticos e estão também associadas a atividade antimicrobiana (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O extrato bruto do isolado DR47 apresentou atividade antimicrobiana contra linhagens 3 linhagens estafilocócicas, uma linhagem clínica de MRSA e uma linhagem de *C. albicans*. Comparativamente, um trabalho realizado por um grupo de pesquisa brasileiro reportou uma atividade antimicrobiana de um composto produzido por uma linhagem de *Annulohyphoxylon stygium* isolado de algas vermelhas marinhas contra uma linhagem bacteriana de *E. coli* e também para uma linhagem de MRSA. Porém, o extrato fúngico obtido não foi efetivo contra a linhagem de *C. albicans* (ATCC90028) testada, sendo essa cepa diferente da utilizada em nosso estudo (*C. albicans* ATCC10231). Neste estudo também, a espécie fúngica foi isolada de algas vermelhas, um ambiente bastante distinto de onde nosso isolado foi retirado (Eucalipto), o que poderia explicar essa diferença nas atividades entre cada estudo (MEDINA et al., 2018). Adicionalmente, estes autores reportaram a molécula denominada pirogalol como a responsável pelas atividades antimicrobianas observadas (MEDINA et al., 2018). Até o momento, não foi possível realizar testes para verificar se esta molécula está presente no extrato do DR47. No entanto, a análise genômica do isolado não apontou para genes associados a síntese de pirogalol.

Fungos endofíticos podem atuar como microrganismos de defesa para seus hospedeiros, através principalmente da produção de metabólitos antifúngicos contra patógenos vegetais (SOLIMAN et al., 2015). Além disso eles são capazes de competir pelo espaço com fitopatógenos, impedindo que estes se desenvolvam e causem doenças nas plantas (YAN et al., 2019). Isso explicaria porque fungos endofíticos são capazes de produzir

substâncias antifúngicas contra outras espécies, como foi o caso do presente estudo, onde isolados de fungos endofíticos produziram atividade contra outro fungo (*C. albicans*).

No presente estudo reportou-se dificuldade em encontrar substâncias com atividade antibacteriana contra linhagens gram-negativas. Provavelmente, esta dificuldade está associada as características do envoltório celular deste grupo de bactérias, por apresentarem uma estrutura mais complexa quando comparadas as bactérias gram-positivas, formado por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS), uma parede celular peptidoglicana delgada e uma membrana plasmática (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A membrana externa é uma das principais barreiras encontradas nestas bactérias para a entrada e efetividade de muitos antibióticos, por ser extremamente hidrofóbica e seletiva a entrada de diversas moléculas, incluindo as moléculas com potencial antimicrobiano (GHAI; GHAI, 2018; PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008). Em razão desta complexidade é que as bactérias gram-negativas constituem o maior desafio atual contra os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, apresentando característica de multirresistência em grande parte das linhagens associadas a infecções (OLIVEIRA; REYGERT, 2019).

A opção de utilizar estratégias de bioinformática como um caminho na busca de possíveis vias metabólicas biossintéticas dentro do genoma do *Annulohyphoxylon sytigum* (DR47) foi a estratégica inicial utilizada para identificar moléculas com potencial antimicrobiano. A plataforma online antiSMASH 5.0 utiliza o *ClusterBlast* (*Cluster and Annotate Blast Results Algorithm*) para identificação de *clusters* semelhantes dentro do genoma do fungo utilizado neste trabalho com outros já citados e depositados em banco de dados (BLIN et al., 2019). Além disso, ele é capaz de prever enzimas centrais co-ocorrentes no genoma utilizando perfis conservados entre as espécies, como as metiltransferases. Sendo assim, é possível identificar os sítios ativos das enzimas, auxiliando na identificação da composição química de cada molécula (MEDEMA et al., 2011).

A partir dos dados fornecidos pelo antiSMASH 5.0, foram detectadas 15 regiões relacionadas a via biossintética de moléculas já conhecidas, porém o presente estudo focou o interesse na busca das principais regiões com atividade antimicrobiana já relatadas na literatura e suas possíveis composições químicas (Tabela 6). Dentre estas, 6 moléculas apresentaram 100% de similaridade com o gene codificador da principal enzima da via, sendo

as policetídeos sintases (PKS) e as peptídeos sintetases não ribossomais (NRPS) as principais encontradas. No entanto, é importante ressaltar que a espécie *A. stygium* apresenta apenas 1 genoma sequenciado depositado no banco de dados do NCBI e este não está finalizado, apresentando apenas *scaffolds*. Assim, devido a poucas anotações genômicas depositadas sobre este fungo, não foi possível identificar mais moléculas.

O 1,3,6,8-tetrahidronaftaleno (THN) é um composto conhecido em fungos Ascomycetos como o principal precursor na via de produção da Melanina. O gene *pks1* em *Nodulisporium* codifica para a enzima polipeptídeo sintase envolvida na sua metabolização, informação esta confirmada através de estudos de Fulton e colaboradores (1999). Sabe-se que fungos podem produzir melanina por três vias biossintéticas, sendo uma delas realizada através dos substratos acetil coA ou manolil CoA, necessários para a síntese de THN (1,3,6,8-tetra-hidroxi-naftaleno) por uma PKS (policetídeo sintase). O THN é um dos precursores principais para a formação de DHN (1,8-dihydroxynaphthalene), que após sua polimerização é transformado em melanina (EISENMAN et al., 2012).

A fusarina C é uma micotoxina amarela, produzida por fungos do gênero *Fusarium*, encontrado em diversas plantas. Esta substância tem sido relatada como um importante contaminante de alimentos e plantas. Por isso a busca por estudos implicados em entender sua biossíntese tem sido realizado ao longo dos anos. Um estudo realizado por Díaz-Sánchez (2012) reportou um gene codificante para uma enzima polipeptídeo sintase envolvida na sua produção em *Fusarium fujikuroi*, relatado como gene *fusA*. Pesquisas realizadas a partir de manipulação genética em *Fusarium fujikuroi* determinaram e caracterizaram o *cluster* gênico envolvido na via biossintética de Fusarina C (NIEHAUS et al., 2013). O grupo reportou 9 genes dentro desse *cluster*. Entretanto, apenas quatro (*fus1*, *fus2*, *fus8* e *fus9*) deles estavam diretamente relacionados com a síntese desse composto e são necessários no processo. O *fus1* é um gene essencial associado a produção de uma enzima híbrida polipeptídeo sintase / peptídeo sintase não ribossomal (PKS-NRPS), necessária nas primeiras etapas para formação de uma molécula precursora (pre-fusarina C).

Já a monascorubrina é um pigmento vermelho-alaranjado encontrado principalmente em espécies fúngicas de *Monascus* (NOZAKI et al., 1991). Esta substância é utilizada milenarmente como corante alimentar e foi encontrada sendo sintetizada por *Penicillium*

marneffeii, um fungo relatado como causador de doenças respiratórias, principalmente no sudeste asiático. Atualmente é reportada principalmente em *Talaromyces marneffeii*, na sua forma teleomorfa. A via biossintética para produção de Monascorubrina em *P. marneffeii* foi elucidada por Woo e colaboradores (2014). Os autores reportaram 5 genes (*pks3*, *rp1*, *rp2*, *rp3* e *rp4*) envolvidos diretamente em sua síntese, sendo o *pks3* o gene codificante da enzima policetído sintase (PKS) desta via. Eles também relataram que esta via também está ligada a produção de ankaflavina e citrinina nesta espécie, sendo um o produto final juntamente com monascorubrina e o outro um produto secundário da via, respectivamente (WOO et al., 2014). A atividade antimicrobiana dessa molécula já foi relatada anteriormente contra *B. subtilis*, contra uma linhagem ambiental de *Candida pseudotropicalis* (MARTÍNKOVÁ et al., 1999), e também contra *E. coli* (NOZAKI et al., 1991). Sendo essa molécula reportada pelo antiSMASH como uma possível via metabólica presente no genoma do fungo DR47, foi realizada uma varredura por espectrofotometria visível para a busca da monascorubrina no extrato. No entanto, o método demonstrou uma curva de absorção do extrato diferente da curva encontrada para monascorubrina (JIA et al., 2019), indicando que possivelmente outro composto está envolvido na atividade antimicrobiana observada no extrato do DR47. Contudo, é necessário que mais estudos sejam realizados com este fungo (DR47) para avaliar se há ou não a produção dessa molécula e qual seu papel no metabolismo desta espécie fúngica. Neste contexto, uma das opções seria realizar cultivos fúngicos na presença de indutores para a síntese de monascorubrina (JIA et al., 2019).

O dimetilcoprogênio, outro *cluster* biossintético relatado, é um sideróforo (CHEN et al., 2013). Sideróforos são compostos quelantes de ferro produzidos por diversos microrganismos, incluindo fungos. O dimetilcoprogênio é um sideróforo hidroximato, sintetizados por NRPS (peptídeo sintases não ribossomais), enzimas multifuncionais que agrupam diversos substratos na formação de peptídeos lineares e cíclicos sem o envolvimento de ribossomos, com uma gama de atividades biológicas. CHEN e colaboradores (2013), demonstraram que o gene *AaNPS6*, caracterizado e identificado em *Altenaria alternata*, um fitopatógeno de tangerina (*Citrus reticulata*), codifica para uma NRPS fúngica, associada a

produção de sideróforos e melanina, absorção de ferro, resistência ao estresse oxidativo, conidiação e virulência.

O ácido úsnico também teve sua via biossintética reportada pelo antiSMASH no genoma do *A. stygium*. Esse metabólito é conhecido por ser produzido por classes de líquens e apresenta diversas atividades biológicas exploradas, sendo comercializado em todo o mundo (BARROS et al., 2019). Através do sequenciamento do genoma e observação de genes relativos a PKS de *Cladonia unicalis*, um espécie de líquen, um grupo de pesquisadores propôs uma via biossintética putativa para produção de ácido úsnico, identificando dois genes necessários para essa via, sendo *mpas* o possível gene codificador da PKS não-redutora envolvida na biossíntese desse composto; e o *mpao* seria o gene que codifica uma enzima oxidativa do tipo p450 (ABDEL-HAMEED et al., 2016).

O gene *TwmB* codifica para uma enzima chave PKS na produção de Wortmanamide A, que é uma molécula de função ainda desconhecida produzida por uma espécie de *Talaromyces wortmanii*. A estrutura química dessa molécula é parecida com a de ácidos graxos de cadeia longa, que são responsáveis por ativarem diversos canais e receptores celulares, como os GPCRs (Receptores acoplados à proteína G) que são proteínas transmembranas responsáveis por captar sinais extracelulares e enviarem para o meio intracelular para ativação de vias celulares (HAI; TANG, 2018).

Outros compostos também tiveram sua via predita pela plataforma antiSMASH, porém com baixa similaridade para os genes das principais enzimas chaves de diferentes vias (Tabela 6). Entre estes, destacamos os compostos oosporeína (14% - porcentagem de similaridade encontrada pelo antiSMASH), chaetoviridina A (11%), chaetomugilina D (11%) e o ácido micofenólico (25%), que apresentam atividade antimicrobiana contra uma diversidade de microrganismos relatados na literatura (ALURAPPA et al., 2014; WANG et al., 2018; KAVANAGH, 1947; NICOLETTI et al., 2004).

As estruturas químicas das principais moléculas finais também foram preditas pelo antiSMASH, podendo ser então comparadas com aquelas depositadas no PUBCHEM, possibilitando a utilização de abordagens cromatográficas para análise do extrato do DR47 na busca das moléculas fúngicas.

Apesar dos resultados obtidos com este estudo, algumas limitações podem ser observadas. Como exemplo, os testes realizados em blocos de ágar realizados na triagem inicial podem ter descartado alguns fungos produtores de substâncias com potencial antimicrobiano, uma vez que estes fungos podem produzir moléculas antimicrobianas que não se difundem bem no ágar.

Além disso, a utilização de ferramentas de química analítica para a caracterização química do extrato, como por exemplo, a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS) poderia nos ajudar a identificar as principais moléculas potencialmente envolvidas com a atividade antimicrobiana identificada neste estudo. A caracterização química do extrato associada aos resultados da análise genômica auxiliarão na identificação da molécula relacionada a atividade observada bem como ao seu isolamento para estudos posteriores.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, sete isolados fúngicos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas e fúngicas, demonstrando ser uma fonte promissora para estudos futuros contra cepas patogênicas.

Além disso, o isolado DR47, correspondente ao fungo *Annulohyphoxylon stygium*, possui metabólitos secundários com potencial antimicrobiano. Esta espécie é pouco explorada quanto as suas atividades biológicas e o aprofundamento no estudo deste fungo pode ser uma alternativa na exploração de novos compostos com atividade antimicrobiana.

Para as perspectivas futuras deste trabalho, a caracterização bioquímica através de MS-HPLC em associação com os dados genômicos coletados é de suma importância, visando a identificação e o isolamento das principais moléculas envolvidas na atividade antimicrobiana observada. Além disso, a avaliação da citotoxicidade do extrato fúngico e das moléculas associadas à atividade antimicrobiana também precisam ser realizadas para entender melhor sobre o potencial citotóxico do fungo frente a diferentes tipos de linhagens celulares.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEED, M. et al. Putative identification of the usnic acid biosynthetic gene cluster by de novo whole-genome sequencing of a lichen-forming fungus. **Fungal Biology**, v. 120, n. 3, p.306-316, mar. 2016.

ALVES, D. R. et al. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **Plos One**, v. 13, n. 6, p.0-1, 18 jun. 2018.

ANCHEEVA, E.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, 16 set. 2019.

AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 252–266, 2016. Taylor & Francis.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p.266-278, 16 mar. 2012.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 1, p.37-44, fev. 2011.

BARROS, D. M. et al. Bioactive properties of Usnic Acid: a literature review. **Brazilian Journal Of Health Review**, Curitiba, v. 2, n. 1, p.214-225, fev. 2019.

BARROS, L. M. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p.429-435, 2012.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. **American Society of Hematology**, v. 2013, p. 428–432, 2013.

Bettiol, Wagner. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. -- Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

BEZERRA, J. D. P. et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 46, n. 1, p.49-57, maio 2015.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. **Microbiol Spectrum**, v. 6, n. 4, p.1087-1119, nov. 2016.

BURGESS, K. M. N. et al. Trienylfuranol A and trienylfuranone A–B: metabolites isolated from an endophytic fungus, *Hypoxylon submonticulosum*, in the raspberry *Rubus idaeus*. **The Journal Of Antibiotics**, v. 70, n. 6, p.721-725, 1 mar. 2017.

BLIN, K. et al. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p.81-87, 29 abr. 2019.

BLOUDOFF, K.; SCHMEING, T. M.. Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1865, n. 11, p.1587-1604, nov. 2017.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American Journal Of Botany**, v. 98, n. 3, p.426-438, mar. 2011.

CARVALHO, E. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, n. 2, p.155-161, fev. 2005.

CAVERO, P. A. S. et al. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p.951-957, jun. 2015.

CBS. HOOG, D. et al. **Atlas of Clinical fungi. Baarn**, The Netherlands: 2000.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne- PA, USA, 2018.

COCK, P.J. et al. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. **Gigascience**, v.4, n.39, agosto. 2015.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, 21 dez. 2017.

COX, R. J; GOLD, F. Fungal Polyketide Synthases in the Information Age. In: TKACZ, Jan S.; LANGE, Lene. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Springer**, 2004. Cap. 5. p. 69-97.

COX, Russell J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 13, p.0-1, 2007.

CANUTO, K.M; RODRIGUES, T.H.S; OLIVEIRA, F.S.A; GONÇALVES, F.J.S. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 34p.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current*, p. 114, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>>.

CDC. Centers For Disease Control And Prevention. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CDC. Centers For Disease Control And Prevention. Biggest Threats and Data. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fthreat-report-2013%2Findex.html#flu>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CRUZ, K. S.; CORTEZ, V. G. *Annulohypoxylon* (Xylariales) from western Paraná, Brazil. *Mycotaxon*, v. 131, n. 2, p.395-402, 17 ago. 2016.

DADAR, M. et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, v. 117, p.128-138, abr. 2018.

DEEPIKA, V. B.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. *Microbiological Research*, v. 182, p.125-140, jan. 2016.

DINESH, S. et al. Pharmacological evaluation of endophytic *Penicillium pimateouiense* SGS isolated from *Simarouba glauca* DC. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, n. 9, p.142-147, set. 2017.

DOI, Y.; IOVLEVA, A.; BONOMO, R. A. The ecology of extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in the developed world. , v. 24, p. 44–51, 2017.

EMBRAPA. MORANDI, Marcelo Augusto Boechat et al. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. In: EMBRAPA. **Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras**. JaguariÚna, Sp: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

EMBRAPA. **Seleção e bioprospecção de *Trichoderma* spp. para desenvolvimento de bioprodutos visando promoção do crescimento de plantas e controle biológico de patógenos habitantes do solo**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/211325/selecao-e-bioprospeccao-de--itrichoderma-ispp-para-desenvolvimento-de-bioprodutos-visando-promocao-do-crescimento-de-plantas-e-controle-biologico-de-patogenos-habitantes-do-solo>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 93, n. 3, p.931-940, 16 dez. 2011.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E.. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 6, p.465-468, 24 jan. 2007.

FERNANDES, M. R. V. et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p.677-685, dez. 2009.

FERNANDES, P. Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 6, n. 1, jan. 2016.

FERREIRA, M. C. et al. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p.692-697, out. 2017.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p.99-105, fev. 1998.

FORD, C. B.; FUNT, J. M.; ABBEY, D.; et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 2015, n. 4, p. 1–27, 2015.

FULTON, T. R. et al. A melanin polyketide synthase (PKS) gene from *Nodulisporium* sp. that shows homology to the *pks1* gene of *Colletotrichum lagenarium*. **Molecular And General Genetics Mgg**, v. 262, n. 4-5, p.714-720, 15 dez. 1999.

GARCIA, L.M. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.3, n.2, p.45-49, 2013.

GHAI, I.; GHAI, S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. **Infection And Drug Resistance**, v. 11, p.523-530, abr. 2018.

GOŁABEK, K.; STRZELCZYK, J. K.; OWCZAREK, A.; et al. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 2, p. 247–251, 2015.

GONG, L.; GUO, S. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal Of Biotechnology**, v. 8, n. 5, p.731-736, 6 mar. 2009.

GONÇALVES, F.J.T; FREIRE, F.C.O; LIMA, J.S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, v.15, p. 71-92, 2013

GRAU, S. Principales variables que determinan el coste económico en el tratamiento de una infección. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 35, n. 1, p.41–45, 2017.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry And Microbiology**, v. 44, n. 2, p.136-142, mar. 2008.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p.1140-1148, dez. 2017.

HELALY, S. E.; THONGBAI, B.; STADLER, M. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 9, p.992-1014, 2018.

HSIEH, H.; JU, Y.; ROGERS, J. D. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. **Mycologia**, v. 97, n. 4, p.844-865, set. 2005.

HWANG, A. Y.; GUMS, J. G. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6440–6445, 2016.

IACG. INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (Reino Unido). Organização das Nações Unidas. **NÃO HÁ TEMPO A PERDER: ACAUTELAR O FUTURO CONTRA INFECCÕES RESISTENTES AOS MEDICAMENTOS: RELATÓRIO PARA O SECRETÁRIO GERAL DAS NAÇÕES UNIDAS**. Reino Unido: ONU, 2019. 4 p.

IDRIS, A.; AL-TAHIR, I.; IDRIS, E. Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigelia africana*. **Egyptian Academic Journal Of Biological Sciences, G. Microbiology**, v. 5, n. 1, p.1-9, 1 jun. 2013.

IKEDA, A. et al. Comparison of the diversity, composition, and host recurrence of xylariaceous endophytes in subtropical, cool temperate, and subboreal regions in Japan. **Population Ecology**, 17 out. 2013.

JACOBS, M. R. Retapamulin: focus on its use in the treatment of uncomplicated superficial skin infections and impetigo. **Expert Review Of Dermatology**, v. 5, n. 5, p.505-517, out. 2010.

JIA, L. et al. Monascorubrin and rubropunctatin: Preparation and reaction characteristics with amines. **Dyes And Pigments**, v. 170, nov. 2019.

KARUPPIAH, V. et al. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p.0-1, 16 maio 2019.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p.937-947, dez. 2005.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p.167-180, mar. 2019.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 101, n. 1, p.97-102, out. 2010.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p.478-482, maio 2017.

KUHNERT, E. et al. Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus *Annulohyphoxylon* (*Xylariaceae*) including four new species. **Fungal Diversity**, v. 85, n. 1, p.1-43, 5 dez. 2016.

KUHNERT, E. et al. Minutellins A – D, azaphilones from the stromata of *Annulohyphoxylon minutellum* (*Xylariaceae*). **Phytochemistry**, v. 137, p.66-71, maio 2017.

LEVITUS, M.; PERERA, T. B. **Vancomycin Resistant Enterococci (VRE)**. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From Vinca Plants. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.0-1, 11 jul. 2018.

LI, W. et al. Isochromans and Related Constituents from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon truncatum* of *Zizania caduciflora* and Their Anti-Inflammatory Effects. **Journal Of Natural Products**, v. 80, n. 1, p.205-209, 23 dez. 2016.

LI, H. et al. The Genome Sequences of 90 Mushrooms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.0-1, 2 jul. 2018.

LIRA, M. C. B. et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal Of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p.49-58, mar. 2009.

LIU, L. et al. Diversifying of Chemical Structure of Native *Monascus* Pigments. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, 21 dez. 2018.

LOU, J. et al. Alternariol 9-methyl ether from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01 and its bioactivities. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 1, p.96-101, jan. 2016.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.

MEDINA, R. P. et al. Aromatic compounds produced by endophytic fungi isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis* - Falkenbergia stage. **Natural Product Research**, v. 33, n. 3, p.443-446, 26 mar. 2018.

NICOLETTI, R.; FIORENTINO, A.; SCOGNAMIGLIO, M. Endophytism of *Penicillium* Species in Woody Plants. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p.1-26, 11 jul. 2014.

NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p.50-59, maio 2015.

O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014. v. 4, n. December, 2014.

OLIVEIRA, J.; REYGAERT, W. C. **Gram Negative Bacteria**. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>>. Acesso em: 20 agos. 2019

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group**. 2013. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/integrated/en/>. Acesso em: 12 ago. 2019

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Líderes mundiais se comprometem a agir em relação à resistência antimicrobiana. 22 set. 2016. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5231:naonul-ideres-mundiais-se-comprometem-a-agir-em-relacao-a-resistenciaantimicrobiana&Itemid=838>. Acesso em: 12 ago. 2019.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p.315-342, 21 mar. 2010.

PAGÈS, J.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p.893-903, 10 nov. 2008.

PARK, H. et al. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances In Applied Microbiology**, p.161-202, 2017.

PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, nov. 2019.

PIRES, R. H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Effect of Usnic Acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p.595-597, 17 out. 2011.

POLESI, N. P. E. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropopagação de *Eucalyptus benthamii***, 2015. 151f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 25, n. 7, p.792-798, jul. 2019.

QUANG, D. N. et al. Antimicrobial Azaphilones from the Fungus *Hypoxyylon multiforme*. **Planta Medica**, v. 71, n. 11, p.1058-1062, out. 2005.

QUANG, D. N. et al. Cohaerins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxyylon cohaerens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxyylon* sect. *Annulata*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 7, p.797-809, abr. 2005.

QUANG, D. N. et al. Cohaerins C–F, four azaphilones from the xylariaceous fungus *Annulohypoxyylon cohaerens*. **Tetrahedron**, v. 62, n. 26, p.6349-6354, jun. 2006.

QUIN, M. B.; FLYNN, C. M.; SCHMIDT-DANNERT, C. Traversing the fungal terpenome. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 10, p.1449-1473, 2014.

RATEB, M. E. et al. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. **Rsc Advances**, v. 3, n. 34, 2013.

REIJER, P.M. et al. Detection of alpha-toxin and other virulence factors in biofilms of *Staphylococcus aureus* on polystyrene and a human epidermal model. **PLoS One**, v.11, p.1-19, 2016.

ROBL, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzyme. **Bmc Biotechnology (online)**, v. 13, p.94, out. 2013.

ROBL, D. et al. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohypoxyylon stygium* glycohydrolases. **Bioresource Technology**, v. 177, p.247-254, fev. 2015.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, 12 ago. 2015.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 46, n. 5, p.657-674, 10 nov. 2018.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SAVI, D.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Erratum: Brazilian Plants. **Planta Medica**, p.619-636, 21 fev. 2019.

SILVA, A.D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral**, 2016. 150f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

STADLER, M.; FOURNIER, J. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the *Hypoxyloideae* (*Xylariaceae*). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 3, p.160-170, set. 2006.

STADLER, M. Importance of secondary metabolites in the *Xylariaceae* as parameters for. **Current Research In Environmental & Applied Mycology**, v. 1, n. 2, p.75-133, 29 out. 2011.

SCOTT, H. M. et al. Antimicrobial resistance in a One Health context: exploring complexities, seeking solutions, and communicating risks. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1441, n. 1, p.3-7, 29 mar. 2019.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 10, p.1425-1448, 14 ago. 2014.

SCHULZ, Barbara; BOYLE, Christine. What are Endophytes? In: SCHULZ, B.j.e; BOYLE, C.j.c; T.N.SIEBER. **Microbial Root Endophytes**. 9. ed. Berlim: Springer, 2006. Cap. 1. p. 1-13.

SLOT, J. C. Fungal Gene Cluster Diversity and Evolution. **Fungal Phylogenetics And Phylogenomics**, p.141-178, 2017.

STEFANI, S. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, p.273-82, 2012.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 2, n. 5, p.0-1, 14 abr. 2010.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research And Innovation**, v. 1, n. 1, p.52-71, jan. 2017.

SOLTANI, J.; MOGHADDAM, M. S. H. Antiproliferative, Antifungal, and Antibacterial Activities of Endophytic *Alternaria* Species from Cupressaceae. **Current Microbiology**, v. 69, n. 3, p.349-356, 7 maio 2014.

- SOLIMAN, S. S. M. et al. An Endophyte Constructs Fngicide-Containing Extracellular Barriers for Its Host Plant. **Current Biology**, v. 25, n. 19, p.2570-2576, out. 2015.
- SOKOLOV, D. N. et al. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p.7060-7064, dez. 2012.
- SURUP, F. et al. Cohaerins G–K, azaphilone pigments from *Annulohyphoxylon cohaerens* and absolute stereochemistry of cohaerins C–K. **Phytochemistry**, v. 95, p.252-258, nov. 2013.
- SURUP, F. et al. Truncaquinones A and B, asterriquinones from *Annulohyphoxylon truncatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 20, p.2183-2185, maio 2016.
- TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p.203-218, 8 fev. 2019.
- XU, L. et al. Antifungal and Cytotoxic β -Resorcylic Acid Lactones from a *Paecilomyces* Species. **Journal Of Natural Products**, v. 80, n. 8, p.2215-2223, 27 jul. 2017.
- ZHANG, P. et al. Varioxepine A, a 3H-Oxepine-Containing Alkaloid with a New Oxa-Cage from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Paecilomyces variotii*. **Organic Letters**, v. 16, n. 18, p.4834-4837, 28 ago. 2014.
- YAO, Y. Q. et al. Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 3, p.1-0, 15 mar. 2017.
- YAN, L. et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, n. 8, p.3327-3340, 7 mar. 2019.
- WAKEFIELD, J. et al. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.0-1, 11 jul. 2017.
- WANG, J. et al. Identification and Bioactivity of Compounds from the Mangrove Endophytic Fungus *Alternaria* sp. **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p.4492-4504, 20 jul. 2015.
- WEN, L. et al. Two new paeciloxocins from a mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. **Russian Chemical Bulletin**, v. 59, n. 8, p.1656-1659, ago. 2010.
- WHITE, J. F. et al. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p.2558-2565, 27 jul. 2019.
- WOO, P. C. Y. et al. High diversity of polyketide synthase genes and the melanin biosynthesis gene cluster in *Penicillium marneffeii*. **Febs Journal**, v. 277, n. 18, p.3750-3758, 13 ago. 2010.

World Economic Forum. (WEF) LAGERSTEDT, Kristina. **How we can win the war against antibiotic resistance**. 2019. Disponível em: <<https://www.weforum.org/agenda/2019/01/how-to-win-the-war-against-antibiotic-resistant-bacteria/>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

WU, Y. et al. Induction of Antiphytopathogenic Metabolite and Squalene Production and Phytotoxin Elimination by Adjustment of the Mode of Fermentation in Cocultures of Phytopathogenic *Nigrospora oryzae* and *Irpex lacteus*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 67, n. 43, p.11877-11882, 9 out. 2019.

WU, M. et al. Phytochemical Investigation of *Annulohypoxyton ilanense*, an Endophytic Fungus Derived from *Cinnamomum* Species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 3, p.493-505, mar. 2013.