UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

GABRIELLE VIEIRA

Rio Claro – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

GABRIELLE VIEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profª. Drª. Daiane Cristina Sass

Rio Claro – SP
2022

V658c

Vieira, Gabrielle
Compostos bioativos produzidos por fungos da Antártica : produção, isolamento e identificação / Gabrielle Vieira. -- Rio Claro, 2022
182 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Biotecnologia microbiana. 2. Microbiologia agrícola. 3. Química microbiológica. 4. Produtos naturais na agricultura. 5. Ambientes extremos Microbiologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

AUTORA: GABRIELLE VIEIRA
ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participaçao Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. SIMONE POSSEDENTE DE LIRA (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciências Exatas / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ - USP

Profa. Dra. SUIKINAI NOBRE SANTOS (Participaçao Virtual)
Tecnologia Microbiana / Biodiversita

Profa. Dra. ELIS MARINA TURINI CLARO (Participaçao Virtual)
Faculdade de Medicina / Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participaçao Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de outubro de 2022

A Deus e minha família. Dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelas oportunidades concedidas e pela proteção e direção de minha vida. À minha família pelo apoio incondicional durante o percurso de minha jornada acadêmica, em especial, aos meus pais, Silvia e José, e minhas irmãs, Grá e Dani. Que eu possa ser fonte de conforto e inspiração a vocês, como vocês tem sido pra mim.

À Profª Drª Daiane Cristina Sass que me recebeu em seu laboratório e me orientou com empenho e dedicação. Obrigada pelas oportunidades e confiança depositadas em mim durante todo esse tempo, vejo em você um exemplo de mulher e pesquisadora. Aos amigos que conheci durante esses anos de pesquisa, Jelena Puric, Vítor Marin, Juliano Ferrarezi, Giovane Böerner, Isabela Ferreira e Charles Freire; e àqueles que a mais tempo tem convivido comigo, Mari Frutuoso, Davi Prado, Mateus Rússolo, Allan Rychiel, Michel Gracioli, Dayane Hewitt, Juanita Solano e Mariana Tarallo, obrigada pelo suporte e momentos de descontração ao longo desses quatro anos.

Aos professores Lara Durães Sette, Henrique Ferreira e Maria Lúcia Carneiro Vieira por gentilmente cederem os microrganismos necessários para a realização desta pesquisa. Ao professor Robert J. Capon e à Zeinab Khalil, do Institute for Molecular Bioscience, da Universidade de Queensland, que me orientaram durante parte do projeto conduzida por meio do Programa Ciências sem Fronteiras, e aos membros do grupo de pesquisa Capon Group, que me acolheram em Brisbane.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro concedido (Processo CNPq 141988/2018-5), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro concedido pelo Programa CAPES PRInT (Processo 88887.467270/2019-00).

Processo 2018/11747-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo 2016/07957-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“Porque nós somos de ontem e nada sabemos; porquanto nossos dias sobre a terra são como a sombra.”

(Jó 8:9)

RESUMO

Os produtos naturais são uma importante fonte de compostos bioativos com estruturas químicas complexas e diversificadas. Na busca por compostos bioativos, estudos têm explorado a bioprospecção de moléculas produzidas por microrganismos provenientes de ambientes extremos, entre eles, os ambientes terrestre e marinho da Antártica. As condições severas desse habitat requerem a adaptação dos microrganismos ali encontrados para sobrevivência, adaptações que podem ser fisiológicas ou bioquímicas e trazem consigo o desenvolvimento de rotas metabólicas alternativas ou novas, o que potencializa a produção de estruturas químicas únicas por esses isolados. Na agricultura, o interesse pelo emprego de metabólitos bioativos consiste em alternativa aos produtos químicos sintéticos tradicionalmente empregados no controle de pragas, doenças e na promoção do crescimento vegetal, visto que o amplo e continuo uso de alguns produtos pode levar à pressão de seleção entre fitopatógenos e outros impactos ambientais. Na indústria, a procura por compostos alternativos é ponto de interesse de diversos estudos para reduzir a toxicidade de resíduos. Neste contexto, o isolamento e identificação de compostos bioativos produzidos por fungos da Antártica é o foco dessa pesquisa, com o objetivo de explorar o potencial de tais compostos no desenvolvimento de formulações viáveis para a agricultura e, ao mesmo tempo, contribuir para a ampliação do conhecimento da diversidade de metabólitos produzidos por esses isolados. Quatro isolados de sedimentos marinhos, CRM1545A, CRM1540, CRM 1527 e CRM1545B foram cultivados em três meios distintos. O cultivo e bioprospecção da linhagem *Penicillium* sp. CRM1540 resultou no isolamento de dois compostos bioativos contra fitopatógenos, o ácido penicílico (AP) e o ácido ciclopáldico (AC). O ácido penicílico inibiu o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em 90% a 25 µg/mL *in vitro* e diminuiu a emergência de sintomas de cancro cítrico em folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em 75,31% em casa de vegetação. Experimentos com ácido ciclopáldico, revelaram o potencial desse composto como agente antifúngico contra *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Um composto de interesse na indústria da biomassa, ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico foi isolado e identificado a partir do extrato produzido pelo isolado CRM 1545A. Os compostos isolados pela aplicação de métodos de cromatografia e espectroscopia, consistem em potenciais alternativas na formulação de novas moléculas-chave para a agricultura e indústria e provam o potencial de microrganismos de ambientes marinhos extremos como um reservatório de compostos úteis ainda inexplorado.

Palavras-chave: Extremófilos; Ácido penicílico; Ácido ciclopáldico; *Penicillium*; *Xanthomonas*.

ABSTRACT

Natural products are an important source of bioactive compounds with complex and diversified chemical structures. Aiming to discover bioactive compounds, researches have been exploring the bioprospection of molecules produced by microorganisms from extreme environments such as the terrestrial and marine regions of Antarctica. The harsh conditions of this habitat require that microorganisms adapt to survive, these adaptations can be physiological or biochemical and can lead to the development of alternative or new metabolic pathways, which increases the potential for the production of novel chemical structures for these isolates. In agriculture, the interest in the use of bioactive metabolites is an alternative to synthetic chemicals traditionally used to control pests, diseases and to promote plant growth, since the continuous use of some products can lead to pressure selection among phytopathogens and other environmental impacts. In the industry, the search for alternative compounds is a point of interest of several studies to reduce toxicity of residues. Understanding this context, the isolation and identification of bioactive compounds produced by fungi from Antarctica is the focus of this research, with the aim of exploring the potential of these compounds in the development of viable formulations for agriculture and, at the same time, to contribute to the expansion of the knowledge of the diversity of metabolites produced by these isolates. Four isolates from marine sediments, CRM1545A, CRM1540, CRM 1527 and CRM1545B were cultivated in three different media. Growth and bioprospecting of strain *Penicillium* sp. CRM1540 resulted in the isolation of two bioactive compounds against phytopathogens, penicillic acid (PA) and cyclopaldic acid (CA). Penicillic acid inhibited the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in 90% at 25 µg/mL *in vitro* and decreased the symptoms emergence of citrus canker on leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by 75.31% in greenhouse conditions. Assays with cyclopaldic acid revealed the potential of this compound as an antifungal agent against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. Another compound of interest for biomass energy industry, 5-hydroxymethyl-furan-2-carboxilic acid, was isolated and identified from the crude extract of CRM 1545A. The compounds were isolated through chromatography and spectroscopy methods are potential alternatives for the formulation of key-compounds for agriculture and industry use and prove the potential of microorganisms from extreme marine environments as a reservoir of useful compounds still untapped.

Keywords: Extremophiles; Penicillic acid; Cyclopaldic acid; *Penicillium*; *Xanthomonas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em frutos, folhas e ramos. 27
Figura 2. Sintomas da mancha-bacteriana em maracujá. 31
Figura 3. Sintomas da podridão negra em crucíferas. 32
Figura 4. Tombamento ou podridão negra causada por *Rhizoctonia solani*. 33
Figura 5. Sementes e caule de feijão-caupi infectadas por *Macrophomina phaseolina* 34
Figura 6. Sintomas de mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. 35

CAPÍTULO 1 BIOPROSPECÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA

Figura 7. Produção de metabólitos secundários e obtenção dos extratos orgânicos secos. 56
Figura 8. Disposição das amostras em microplaca de 96 poços para teste de atividade antimicrobiana *in vitro* 57
Figura 9. Ensaio de atividade antimicrobiana com resazurina 59
Figura 10. Potencial inibitório in vitro de extratos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem WT 306. 63
Figura 11. Potencial inibitório in vitro de extratos contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* linhagem LM4a. 65
Figura 12. Potencial inibitório in vitro de extratos contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* linhagem ACM477 66
Figura 13. Metabólitos secundários produzidos em meio Malte 2% e Czapek 69
Figura 14. Metabólitos secundários produzidos em meio Malte 2% e Czapek. 70
Figura 15. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento do extrato produzido por *Penicillium* sp. CRM 1545A em meio Malte 2% 74
Figura 16. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Malte 2%. 75
Figura 17. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Czapek. 76

Figura 18. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1545B em meio Czapek.....77

CAPÍTULO 3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO PENICÍLICO: ENSAIOS COMPLEMENTARES

Figura 19. Tautomeria do ácido penicílico. 90
Figura 20. Esquema de tratamento do ácido penicílico 92
Figura 21. Comparação da atividade antibacteriana de ácido penicílico (AP) em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.....95
Figura 22. Microscopia de fluorescência em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para observação de ação na divisão celular bacteriano pelo composto teste ácido penicílico. 97
Figura 23. Formação de biofilme por *Xanthomonas citri* subps. *citri* após tratamento com ácido penicílico 99

CAPÍTULO 4 CYCLOPALDIC ACID PRODUCED BY AN ANTARCTIC MARINE *PENICILLIUM*: ISOLATION AND *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Scheme 1. Isolation scheme of cyclopaldic acid.....118
Figure 1. DAD Chromatogram (290 nm) of the cyclopaldic acid fraction 119
Figure 2. Growth Inhibition (%) of *Rhizoctonia solani* by different concentrations of cyclopaldic acid *in vitro* over time 120
Figure 3. Inhibitory effect of cyclopaldic acid after 72h (**a**) and 96h (**b**) of contact with *Rhizoctonia solani* 121
Figure 4. Growth Inhibition (%) of *Macrophomina phaseolina* by different concentrations of cyclopaldic acid *in vitro* over time.....122
Figure 5. Inhibitory effect of cyclopaldic acid after 72h (**a**) and 96h (**b**) of contact with *Macrophomina phaseolina* 123
Figure S1. Fractionation process of the crude extract of *Penicillium* sp. 125
Figure S2. LCMS chromatogram and HRESI spectra of F17 127

Figure S3. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid 129
Figure S4. ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid 129
Figure S5. ^{13}C Attached-Proton-Test NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid 130
Figure S6. 2D NMR HSQC (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid 131
Figure S7. 2D NMR HMBC (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid 132
Figure S8. 2D NMR COSY (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid 132
Figure S9. ^{1}H NMR (400 MHz, *CDCl*$_3$) spectrum of cyclopaldic acid 133
Figure S10. Evaluation of fungistatic activity of cyclopaldic acid against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* 134

CAPÍTULO 5 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-FURANO-2-CARBOXÍLICO DE *Penicillium* sp. CRM 1545A DE AMBIENTE MARINHO ANTÁRTICO

Figura 24. Cromatogramas DAD da fração F4 após agrupamento. 142
Figura 25. Espectrometria de massas da fração F4. 143
Figura 26. Espectro ^{1}H de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-d*6* 145
Figura 27. Espectro ^{13}C de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-d*6* 146
Figura 28. Espectros 2D de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-d*6* 147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 BIOPROSPECÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA

Tabela 1 Extratos obtidos após cultivo em três diferentes meios de cultura.....61

CAPÍTULO 3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO PENICÍLICO: ENSAIOS COMPLEMENTARES

Tabela 2. Formação de biofilme por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.....98

CAPÍTULO 4 CYCLOPALDIC ACID PRODUCED BY AN ANTARCTIC MARINE *PENICILLIUM*: ISOLATION AND *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Table S1. 1D and 2D NMR (400 MHz) data for cyclopaldic acid.....128
Table S2. Inhibitory activity (%) *in vitro* of cyclopaldic acid in *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina* phaseolina 133

CAPÍTULO 5 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-FURANO-2-CARBOXÍLICO DE *Penicillium* sp. CRM 1545A DE AMBIENTE MARINHO ANTÁRTICO

Tabela 3. Frações da purificação do extrato CRM 1545A-M após agrupamento....140
Tabela 4. Ressonância Magnética Nuclear para F4 144

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1. Objetivos 17
1.1.1. Objetivo Geral 17
1.1.2. Objetivos Específicos 17
2 CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE 18
3 REVISÃO DE LITERATURA 19
3.1. Produtos naturais 19
3.2. Biotecnologia de microrganismos marinhos e da Antártica 20
3.2.1. Potencial de fungos como produtores de metabólitos secundários 22
3.3. Fitopatógenos e a agricultura 24
3.3.1. O gênero *Xanthomonas* 25
3.3.1.1. Xanthomonas citri subsp. *citri* *26*
3.3.1.2. Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* *30*
3.3.1.3. Xanthomonas campestris pv. *campestris* *32*
3.3.2. *Rhizoctonia solani* 33
3.3.3. *Macrophomina phaseolina* 34
3.3.4. *Sclerotinia sclerotiorum* 35
3.4. Controle de fitopatógenos 36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39
CAPÍTULO 1 BIOPROSPECÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA .. 50
1 INTRODUÇÃO 52
1.1. Objetivos 53
2 MATERIAIS E MÉTODOS 54
2.1. Recursos microbianos 54
2.2. Seleção de isolados de interesse 55
2.2.1. Condições de cultivo e extração de metabólitos 55
2.2.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos 57
2.3. Produção de metabólitos para fracionamento 59
2.4. Análise do perfil cromatográfico dos extratos brutos 59
2.5. Fracionamento dos extratos brutos 60

2.5.1. Análise de pureza e similaridade das frações 60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
3.1. Seleção de isolados de interesse 61
3.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos 61
3.3. Análise do perfil cromatográfico dos extratos brutos 68
3.4. Fracionamento dos extratos brutos 72
4 CONCLUSÃO 78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79
CAPÍTULO 2 ISOLATION AND AGRICULTURAL POTENTIAL OF PENICILLIC ACID AGAISNT CITRUS CANKER 83
1 ARTIGO PUBLICADO 84
1.1. Objetivos 84
CAPÍTULO 3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO PENICÍLICO: ENSAIOS COMPLEMENTARES 85
1 INTRODUÇÃO 87
1.1. Objetivos 89
2 MATERIAIS E MÉTODOS 90
2.1. Ensaios de atividade antibacteriana do ácido penicílico 90
2.2. Microscopia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de AP 92
2.3. Atividade anti-biofilme de AP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 95
3.1. Ensaios de atividade antibacteriana do ácido penicílico 95
3.2. Microscopia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de AP 96
3.3. Atividade anti-biofilme de AP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 97
4 CONCLUSÃO 100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101
CAPÍTULO 4 CYCLOPALDIC ACID PRODUCED BY AN ANTARCTIC MARINE *PENICILLIUM*: ISOLATION AND *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI 103
1 ARTIGO SUBMETIDO 104
2 MATERIAL SUPLEMENTAR 124

CAPÍTULO 5 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-FURANO-2-CARBOXÍLICO DE *Penicillium* sp. CRM 1545A DE AMBIENTE MARINHO ANTÁRTICO 135
1 INTRODUÇÃO 137
1.1. Objetivos 138
2 MATERIAIS E MÉTODOS 139
2.1. Detalhes gerais dos experimentos 139
2.2. Identificação da fração F4 139
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 140
3.1. Detalhes gerais dos experimentos 140
3.2. Identificação da fração F4 141
4 CONCLUSÃO 150
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 151
CONSIDERAÇÕES FINAIS 155
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO 157
APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR 166

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são considerados uma importante fonte para novos compostos bioativos, pois suas estruturas químicas complexas e diversificadas fornecem uma base para a construção de moléculas distintas. Estima-se que a variedade de produtos naturais é tanta que cerca de 40 % de esqueletos químicos que eles contêm ainda não são encontrados nos produtos sintéticos (LAGUNIN; FILIMONOV; POROIKOV, 2010; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2015).

Os produtos naturais são metabólitos secundários produzidos por diversos organismos vivos; eles não estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos organismos produtores, mas frequentemente desempenham um importante papel como moléculas de defesa (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012), agindo principalmente como moléculas de adaptação, auxiliando na sobrevivência dos organismos produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Devido a estes fatores os metabólitos secundários apresentam diversas atividades biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2016; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2015).

Nos últimos anos, a relevância dos microrganismos na bioprospecção para a descoberta de moléculas bioativas tanto na medicina quanto na agricultura, tem aumentado significativamente (ALAM *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2018; SANG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

Na agricultura há um interesse crescente pelo emprego de metabólitos bioativos produzidos por microrganismos, como alternativa aos produtos químicos sintéticos, tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle de pragas e doenças de plantas, se constituindo em potenciais substitutos de produtos químicos sintéticos e com nenhum ou mínimo impacto ambiental (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Dessa maneira, na tentativa de descobrir novos produtos naturais ativos, diversos estudos tem se dedicado a bioprospecção de moléculas bioativas de microrganismos presentes em ambientes inexplorados e/ou extremos, o que representa uma estratégia interessante para encontrar novas vias metabólicas e, finalmente, novos constituintes bioativos (GONÇALVES *et al.*, 2015).

A Antártica é um continente que além de ser relativamente isolado do resto do mundo, apresenta baixa temperatura, diferentes níveis de pH, baixa disponibilidade de nutrientes orgânicos e água, ventos fortes e radiação UV alta. Estas condições

fazem com que os microrganismos se adaptem neste ambiente evoluindo diversas adaptações bioquímicas e fisiológicas essenciais para a sobrevivência (ENCHEVA-MALINOVA *et al.*, 2014; FURBINO *et al.*, 2014; VINCENT, 2000). Assim, estes microrganismos são uma fonte rica de novos produtos naturais baseados em estruturas químicas únicas (FURBINO *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2015; TIAN; LI; ZHAO, 2017).

Pesquisas recentes tem evidenciado o potencial de fungos do ambiente antártico, tanto marinhos quanto terrestres, em produzir novos produtos naturais para aplicações farmacêuticas, agrícolas e industriais (DUARTE *et al.*, 2019; VARRELLA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2018).

Na área agrícola estes microrganismos têm apresentado potencial para produção de metabólitos secundários com atividade contra fitopatógenos responsáveis por doenças em diversas espécies vegetais economicamente importantes (ENCHEVA-MALINOVA *et al.*, 2015; PURIĆ *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018).

As culturas de maracujá, citros e uma variedade das crucíferas sofrem perdas significativas devido a doenças causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* e culturas como a da soja, milho e café são alvo de fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani, Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. O controle destas infecções tem sido geralmente realizado por adição de produtos químicos à base de cobre, erradicação de plantas contaminadas e uso de variedades resistentes. Porém, estas medidas têm sido ineficientes, devido à acumulação de material químico no ambiente, suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e perdas de área plantada (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018; AN *et al.*, 2020; MARQUEZ *et al.*, 2021; TIMILSINA *et al.*, 2020).

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle a fitopatógenos bacterianos e fúngicos que visam substituir os produtos químicos sintéticos e ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente, nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em procurar extratos metabólicos de fungos com potencial ação contra fitopatógenos de importância para a agricultura brasileira.

Estudos recentes, realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram 32 fungos isolados da Antártica (gêneros: *Penicillium, Pseudogymnoascus, Cadophora, Paraconiothyrium* e *Toxicocladosporium)*, produtores de metabólitos com atividade antibacteriana contra *X. citri* subsp. *citri, X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X.*

euvesicatoria (PURIĆ *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018). Demonstrando assim a capacidade destes microrganismos em produzir compostos com potencial ação contra *Xanthomonas.*

Assim, neste trabalho demos continuidade ao estudo de metabólitos de fungos filamentosos de sedimentos marinhos da região Antárctica, isolando os componentes do meio metabólico, identificando compostos puros, e avaliando seu potencial como moléculas chave para o desenvolvimento de soluções a serem utilizadas em campo.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

Isolar e identificar metabólitos secundários a partir de extratos brutos ativos obtidos pelo cultivo de fungos filamentos de sedimentos marinhos da Antártica.

1.1.2. Objetivos específicos

a. Extrair metabólitos secundários produzidos em três meios de cultivo distintos e avaliar sua atividade antibacteriana;
b. Selecionar os meios de cultivo para produção de metabólitos;
c. Fracionar os extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – "*High Pressure Liquid Chromatography*");
d. Avaliar a atividade antibacteriana e/ou antifúngica *in vitro* das frações;
e. Avaliar a atividade protetiva de frações ativas contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em ensaio em casa de vegetação;
f. Elucidar a estrutura dos compostos ativos por meio de técnicas espectroscópicas como Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS – "*Liquid Chromatography Mass Spectometry*") e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE

O Capítulo 1 reúne os objetivos específicos *a*, *b* e *c*. Esse capítulo aponta para a necessidade do estudo das condições de cultivo de microrganismos em estudos de bioprospecção com foco na descoberta de novas moléculas e compostos com estruturas únicas com atividade biológica. Além disso, demonstra a importância das técnicas de cromatografia líquida na velocidade de separação e purificação dos componentes de extratos brutos, muitas vezes um fator limitante em pesquisas que visam a identificação de compostos.

O Capítulo 2 compreende os objetivos específicos descritos nos itens de *c* até *f* para o extrato produzido pelo isolado *Penicillium sp.* CRM1540 em meio Czapek. O estudo desse extrato bruto resultou no isolamento e identificação de um composto conhecido, ácido penicílico. Essa molécula purificada, componente de uma fração ativa contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, apresentou atividade antibacteriana em 25 µg/mL em ensaio *in vitro* e atividade protetiva contra cancro cítrico em folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em ensaio em casa de vegetação. Os resultados foram compilados e publicados no artigo *Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker* (DOI: 10.1111/jam.15413) publicado no periódico *Journal of Applied Microbiology*.

O Capítulo 3 complementa os resultados apresentados no Capítulo 2 com ensaios com ácido penicílico para determinação do mecanismo de ação responsável pela atividade antibacteriana observada em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

O Capítulo 4 abrange itens *c, d* e *f* para o extrato produzido em meio Malte 2% pelo isolado *Penicillium* sp. CRM 1540. A purificação do extrato resultou em um composto identificado como ácido ciclopáldico com ação antifúngica em dois fitopatógenos, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Os resultados foram agrupados em um artigo, que foi submetido para a revista Extremophiles.

O Capítulo 5 compreende o isolamento e identificação de um terceiro composto (*f*). O processo de purificação descrito no Capítulo 1, deu origem a uma fração relativamente pura, a qual foi submetida a análises de cromatografia e espectroscopia para identificação de seu componente principal: o composto ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico, conhecido como HMFCA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produtos naturais

Produtos naturais apresentam uma variedade de atividades biológicas de relevância para a humanidade, incluindo atividades antibióticas, antifúngicas, anticâncer, imunosupressiva, anti-inflamatória e anti-biofilme. Essas moléculas naturais tem sua origem em metabólitos secundários de um grande número de fontes, como vegetais e animais do ambiente terrestre, organismos marinhos ou aquáticos, microrganismos, invertebrados e vertebrados (CHIN *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2019).

Os microrganismos são líderes na produção de compostos naturais considerados úteis, isto é, com alguma aplicação ou benefício para a sociedade. Esses metabólitos são compostos de baixo peso molecular (< 3000 da) associados com diversas atividades, dentre as quais se destacam: antibióticos contra bactérias e fungos, agentes anticâncer, imunossupressores, antivirais, reguladores do crescimento vegetal, inibidores enzimáticos, polímeros, biosurfactantes e bioherbicidas são alguns dos produtos produzidos por esses indivíduos (DEMAIN, 2014; MOHAMMED *et al.*, 2021; TWAIJ; HASAN, 2022).

Essas diversas moléculas são estrutural e quimicamente variáveis, tendo sido aplicadas como compostos terapêuticos desde a antiguidade, na Mesopotâmia, conforme registros. No começo do século XX, cerca de 80% dos medicamentos eram obtidos de plantas, no entanto a descoberta em 1928 da penicilina produzido por *Penicillium notatum* por Alexander Fleming foi um marco na mudança para o foco nos microrganismos como fontes de produtos naturais. Atualmente, compostos derivados de microrganismos são utilizados na medicina, agricultura, na indústria e para pesquisas científicas (PHAM *et al.*, 2019; SANCHEZ *et al.*, 2012).

Dentre os primeiros antibióticos descobertos estão a estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, o cloranfenicol, produzido por *S. venezuelae*, a clorotetraciclina, de *S. aureofaciens*, a cefalosporina C de *Cephalosporium acremonium*, a eritromicina de *Saccharopolyspora etythrae* e a vancomicina, produzida por *Amycolatopsis orientalis*. Na área da saúde, em torno de 60% dos medicamentos oriundos de pequenas moléculas tem relação com produtos naturais,

e 69% do total de agentes antibacterianos tem sua origem em moléculas naturais (MATSUMURA *et al.*, 2018; PATRIDGE *et al.* 2016; PHAM *et al.*, 2019).

A descoberta de novas drogas, embora ainda foco de estudos por parte da comunidade científica e de interesse de farmacêuticas, encontra desafios. A baixa disponibilidade dos compostos naturais com potencial para se tornarem novas drogas ou moléculas-chave na natureza é um empecilho que torna não apenas o processo de descoberta, mas também o desenvolvimento de agentes economicamente inviável (SONG *et al.*, 2014). Nesse contexto, a busca por soluções alternativas como expressão de genes em hospedeiros microbianos para aumento de produção, ou expansão de habitats investigados se fazem necessários (PHAM *et al.*, 2019).

3.2. Biotecnologia de microrganismos marinhos e da Antártica

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre, e é o habitat de uma grande diversidade de organismos, como bactérias, fungos, corais, micro e macro algas, esponjas e tunicados, sendo assim uma fonte de moléculas quimicamente diversificadas e relevantes para a descoberta de drogas com potencial farmacológico (BARZKAR *et al.*, 2019).

O ambiente marinho é um *habitat* hostil dado as extremas temperaturas, mudanças de salinidade e pressão e a presença de patógenos virais e bacterianos. Essas condições conferiram aos organismos marinhos, incluindo os microrganismos, mecanismos para sobrevivência a partir de processos evolutivo e favoreceram a produção de moléculas novas e únicas que apresentam funções estruturais e funcionais diversificadas em comparação aos compostos isolados de microrganismos do ambiente terrestre (KONG, 2018).

Nos últimos anos o número de composto bioativos derivados de bactérias e fungos do ambiente marinho aumentou. As bactérias termofílicas e arqueobactérias, por exemplo, produzem diferentes classes de enzimas termoestáveis, outros isolados bacterianos de sedimentos marinhos ou água do mar, como *Bacillus subtillis* apresentaram potencial como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea*, um fitopatógeno do tomateiro (BARZKAR *et al.*, 2019; KONG, 2018; ZHAO; LI; KONG, 2003).

Três linhagens bacterianas quitinolíticas, *Pseudomonas* sp., *Pantoea dispersa* e *Enterobacter amnigenu*, isoladas do ambiente aquático na Índia foram relatadas por Gohel *et al*. (2004) como potenciais agentes antifúngicos contra *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp. e em 2015, um isolado *Streptomyces vinaceusdrapus* apresentou propriedades quitionolíticas e antifúngica contra *Rhizoctonia solani* (YANDIGERI *et al.*, 2015).

O potencial biotecnológico de leveduras marinhas também tem sido estudado e relatado (KONG, 2018). *Rhodosporidium paludigenum* reduziu significativamente a incidência de diversas doenças e lesões causadas por fungos de pós colheita, enquanto que *Debaryomyces hansenii* reduziu em 80% a incidência de doença causada por *Penicillium italicum* em lima (HERNÁNDEZ-MONTIEL *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

Em estudo subsequente, *D. hansenii* inbibiu o crescimento micelial de *Mucro circinelloides*m *Aspergillus* sp., *Fusarium proliferatum* e *F. subglutians* além de reduzir a produção de fumonisinas e a degradação causada por *Penicillium citrinum* em Lima-da-Pérsia no pós colheita (GONZÁLEZ-ESTRADA *et al.,* 2017; MEDINA-CÓRDOVA *et al.*, 2016).

Entre os fungos provenientes de ambientes marinhos, chaetociclinona A, isolada *Chaetomium* sp., exibiu atividade antifúngica dose-dependente contra *Phytophtora infestans*. O isolado *Microsphaeropsis* sp. derivado da esponja marinha *Myxilla inscrustans* produziu microesfaeropisina, uma molécula derivada de eremofilana com atividade contra *Ustilago violácea* e *Mycotypha microspora* (HÖLLER; KÖNIG; WRIGHT, 1999; LÖSGEN *et al.*, 2007).

Outro grupo de fungos muito estudado é o gênero *Trichoderma*, conhecido como agente de controle biológico e cujo compostos bioativos produzidos foram identificados (GAL-HEMED *et al.*, 2011; GARO *et al.*, 2003).

O ecossistema antártico consiste em um dos ambientes mais hostis no mundo e a região marinha apresenta uma grande biodiversidade, com novas espécies sendo descobertas anualmente. Apesar das condições extremas do ambiente, os fungos estão fortemente presentes nesse ecossistema, devido a produção de enzimas, metabólitos secundários e moléculas bioativas que proporcionam vantagens competitivas aos fungos (VARRELLA *et al.*, 2021; YARZÁBAL, 2016).

A produção de metabólitos secundários produzidos por isolados de ambientes extremamente frios como a Antártica tem despertado o interesse como fontes

alternativas de moléculas para com aplicações biotecnológicas nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e na agricultura (MURATE *et al.*, 2015; VARRELLA *et al.*, 2021).

Estudos envolvendo a produção de compostos ativos por microrganismos contra *X. axonopodis* pv. *glycinas*, *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseol*, *X. campestris* e *X. vesicatoria* tem sido desenvolvidos desde 2002 (ENCHEVA-MALINOVA *et al.*, 2015; MONCHEVA *et al.*, 2002; SILBER *et al.*, 2013). Em relação a moléculas associadas a fungos, Henriquez *et al.* (2014) relatam a atividade de 22 fungos de esponjas da região da Antartica contra *X. campestris*. Extratos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* associados a algas na Antártica apresentaram alta e seletiva atividade antifúngica, tripanocida e contra febre amarela. Espécies de *Pseudogymnoascus*, *Guehomyces* e *Metschnikowia* também apresentaram atividade antifúngica contra *Candida krusei*, *C. albicans* e Cladosporium *sphaerospermum* (VARRELLA *et al.*, 2021).

Dentre as moléculas produzidas e identificadas, destacam-se os compostos produzidos por membros do gênero *Penicillium*. *Penicillium citreonigrum* produziu fenóis e dicetopiperazinas com atividade inibitória contra células HCT116, *Penicillium crustosum* produziu dicetopiperazinas com atividade citotóxica em células K562, *P. glabrum* apresentou compostos com atividade anti-inflamatória e com capacidade de inibir tirosina fosfatase B1 (HA *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019).

As enzimas produzidas por isolados da região antártica marinha também apresentam uma variedade de atividades biológicas. Dentre as enzimas produzidas, foram relatadas β-agarase, α-amilase, esterase, lacase, quitinase, entre outras (BHARUDIN *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2018; FURBINO *et al.*, 2018; HASHIM *et al.*, 2018; PENG; PENG; LING, 2020).

3.2.1. Potencial de fungos como produtores de metabólitos secundários

Aproximadamente 38% dos 22000 produtos naturais oriundos dos microrganismos são produzidos por fungos, o que torna esses organismos fontes importantes de compostos bioativos na natureza. Os fungos competem com outros indivíduos pelos mesmos nutrientes e substratos, além de sobreviverem em

condições muitas vezes hostis, como no caso de isolados encontrados em ambientes extremos. Para garantir sua sobrevivência, diversas estratégias foram desenvolvidas por esses organismos, como a produção de substâncias tóxicas aos seus competidores ou de compostos para proteção (DEMAIN, 2014; SHIN, 2020; STADNIK; BETTIOL; SAITO, 2003).

O solo é o ambiente mais extensivamente explorado quanto a produção de produtos naturais bioativos por microrganismos, mas o número de compostos ativos isolados de ambientes marinhos tem crescido (DEMAIN, 2014; SHIN, 2020).

Em 2017, 57% dos compostos marinhos naturais relatados foram produzidos por microrganismos marinhos. As bactérias foram responsáveis pela produção de 242 novos compostos, sendo 137 desses metabólitos produzidos pelo gênero *Streptomyces*, 16 por representantes do gênero *Pseudoalteromonas*, 15 por *Nocardiopsis* e 14 por *Bacillus*. Para fungos de origem marinha, exceto mangues, em 2015 foram 369 novos compostos relatados, seguido de 328 no ano de 2016 e 448 novas moléculas em 2017. Grande parte, 34%, dos fungos produtores de novos compostos foram isolados de sedimentos marinhos, enquanto o restante foi isolado de esponjas, cnidários, invertebrados, algas e ervas-marinhas. Dentre os fungos associados a mangues foram 101 novos compostos (CARROLL *et al.*, 2019).

O aumento do número de estudo de novos produtos naturais produzidos por fungos marinhos ainda tem crescido, e conforme a revisão apresentada por Carroll *et al.* (2021) representa 47% do total de produtos naturais desse ambiente sendo relatados durante todo o ano de 2019, com mais de 600 novos compostos descritos. No entanto, de acordo com Shin *et al.* (2020), embora mais de um milhão de metabólitos secundários associados aos fungos de ambientes marinhos tenham sido relatados, apenas ciclosporina A é comercializada, o que mostra que um esforço na compreensão dos métodos de triagem e otimização deve ser feito.

Os organismos extremófilos são classificados em sete categorias, dependendo do habitat em que são encontrados. Piezófílos ou barófilos são encontrados em regiões de altas pressões hidrostáticas e são isolados geralmente de sedimentos ou das entranhas de animais que vivem no mar profundo ou região abissal. Os termófilos são organismos com temperatura ótima de crescimento entre 50 e 80 ºC enquanto para os hipertermófilos a temperatura ótima excede os 80 ºC (HORIKOSHI, 1998; SKROPETA, 2008; WILSON; BRIMBLE, 2009).

No outro extremo das faixas termais estão os psicrófilos, encontrados na Antártica, no Ártico e nas regiões glaciais, com temperaturas ótimas abaixo de 15 ºC. Halófilos são os organismos que requerem mais de 3% de NaCl para crescimento, já os xerófilos se desenvolvem em ambientes com baixa atividade de água como cinzas e desertos. Os acidófilos tem crescimento ótimo em pH<4 e os alcalófilos em pH>9 (DEMING, 2002; EVANS; JOHANSEN, 1999; WILSON; BRIMBLE, 2009). Os ambientes extremos requerem a adaptação da regulação de genes e do metabolismo celular para reprodução e desenvolvimento dos organismos que ali sobrevivem, assim, esses organismos constituem uma fonte de produtos naturais novos (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001).

Os fungos de ambientes extremos são uma fonte rica de novos compostos. Zhang *et al.* (2018) compilaram 314 compostos produzidos por fungos extremófilos dos quais 161 apresentaram atividade biológica. Essas moléculas foram obtidas de 56 linhagens fúngicas dentre as quais estão: *Penicillium* sp. (21), *Aspergillus* sp. (11), *Acaromyces* sp. (1), *Malbranchea* sp. (1) e pertencem a uma variedade de classes de compostos, incluindo terpenóides, alcalóides, peptídeos, ésteres, lactonas e xanthonas.

3.3. Fitopatógenos e a agricultura

Grande parte das culturas agrícolas de importância econômica se espalharam para além de seu ambiente natural original, estando presentes ao redor do mundo, por isso as culturas se tornaram vulneráveis a novas doenças em seus novos ambientes. Esse fenômeno que levou a implementação de listas de quarentena específicas de patógenos não endêmicos ou de nível elevado de contenção para cada país, para minimizar e proteger a agricultura da região de danos causados por essas pragas (GAMLIEL, 2008).

De maneira geral os fitopatógenos podem ser agrupados em: biotróficos, organismos altamente dependentes do hospedeiro e que obtém nutrientes de células vivas causando dano mínimo; necrotróficos, patógenos que efetivamente matam as células do hospedeiro a partir da secreção de fitotoxinas e enzimas de degradação da parede celular, se alimentando de nutrientes do tecido vegetal morto,; hemibiotróficos, indivíduos que inicialmente comportam-se como biotróficos

mas ao atingirem a fase de colonização atuam como necrotróficos, levando a morte do hospedeiro (DE SILVA *et al.*, 2016; SHUPING; ELOFF, 2017).

3.3.1. O gênero *Xanthomonas*

O gênero de bactérias *Xanthomonas* é formado, em sua maioria, por bactérias associadas a plantas e geralmente não encontradas em outros ambientes. Esse gênero compreende cerca de 27 espécies e seus patovares que afetam aproximadamente 400 hospedeiros vegetais, muitos dos quais tem importância econômica, e que apresentam uma alta especificidade entre patógeno-hospedeiro (RYAN *et al.*, 2011). Algumas das bactérias desse grupo não apresentam patogenicidade, mas infecções ocorrem em pelo menos 124 monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas de acordo com Leyns *et al.* (1984).

As *Xanthomonas* são bastonetes, Gram-negativas, aeróbias obrigatórias, com um flagelo polar e não formadoras de esporos. Estão distribuídas ao redor do mundo e os danos causados nos vegetais pode causar perdas no rendimento do produtor. No Brasil, citros, mandioca, tomate, feijão, cana-de-açúcar, maracujá e pimentão são algumas das culturas de importância econômica e social afetadas por *Xanthomonas* (RODRIGUEZ-R *et al.*, 2012; RYAN *et al.*, 2011).

As doenças causadas por esses fitopatógenos tem geralmente origem em sementes contaminadas, porém a disseminação dos patógenos para plantas sadias pode ocorrer devido à praticas agriculturais como a poda, nebulização, e também por fatores naturais como a chuva, ventos fortes, solos contaminados e insetos. As bactérias estão presentes na superfície foliar das plantas e crescem como epifíticas nesse habitat, a infecção ocorre quando o hospedeiro é invadido através de aberturas naturais, como hidatódios e estômatos, ou através de feridas mecânicas. Um outro foco de contaminação é o material vegetal morto acumulado, pois algumas espécies do gênero podem sobreviver no solo em associação com essa matéria e causar contaminação em futuras plantações por meio de feridas na região radicular (RYAN *et al.*, 2011).

3.3.1.1. Xanthomonas citri subsp. *citri*

O cancro cítrico é uma doença que ataca todas as espécies de citros de importância comercial, bem como suas variedades. As maiores perdas relacionadas à doença ocorrem em país localizados em regiões de clima favorável ao desenvolvimento da doença, como Brasil, Japão, Índia, e algumas áreas dos Estados Unidos da América. A doença está presente endemicamente na América do Sul, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai. No Brasil, o cancro cítrico é considerado um dos principais problemas fitossanitários relacionados ao plantio de citros e se faz presente nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Roraima, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (CABI, 2017; EPPO, 2017; SANCHES *et al.*, 2014).

O agente causal do cancro cítrico são as bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas.* Essa doença acomete todas as variedades comerciais de citros no mundo, e tem um impacto severo na citricultura mundial (DAS, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010). As lesões protuberantes provocadas pelo patógeno surgem em folhas jovens, ramos e nos frutos após infecção (Figura 1), apresentando um aspecto encharcado e circundado por um halo clorado, o diâmetro da lesão aumenta e sua coloração torna-se marrom com passagem do tempo (SCHUBERT *et al.*, 2001).

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em frutos, folhas e ramos.

Fonte: Fundecitrus

A doença apresenta um ciclo de 4 fases: disseminação, infecção, colonização e sobrevivência; que compreendem desde a chegada do patógeno ao pomar até sua permanência na área. A disseminação pode ser causada pela ação de chuvas, por ações antrópicas, pela contaminação de maquinário, de mudas ou materiais de colheita infectados. A infecção tem início com a penetração da bactéria por aberturas naturais ou ferimentos causados por equipamentos, atrito ou insetos como o minador dos citros. A multiplicação das bactérias se dá de forma localizada no ponto de penetração do tecido vegetal onde enzimas são liberadas para obtenção de nutrientes para os fitopatógenos e as células vegetais passam a ter aspecto encharcado e escurecido, uma vez que o tecido vegetal passa a ser degradado (DO AMARAL, 2003).

A partir do ponto de infecção continua o processo de colonização do hospedeiro, onde o fator fundamental é a temperatura, com faixa ótima entre 25 ºC e

35 ºC. Lesões remanescentes entre um ano e outro permitem que a bactéria permaneça no ambiente, e quando uma lesão é molhada, a bactéria tem a oportunidade de se locomover para o filme de água na superfície da planta e dar início ao ciclo da doença novamente (BEHLAU, 2019).

O cancro cítrico pode ser causado por diferentes patovars e linhagens da bactéria, sendo assim categorizado em diferentes tipos dependendo dos hospedeiros afetados, características e fisiologia das culturas, sorologia, sensibilidade, fenótipo e de características biomoleculares dos isolados (BEHLAU; BELASQUE JR, 2014).

O agente causal do cancro cítrico Tipo A é o isolado *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, enquanto que *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* linhagem B e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* linhagem C causam, respectivamente, o cancro cítrico Tipo B e C (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; MOREIRA *et al.*, 2010).

A maior porção do dano econômico no mundo é causado pelo Tipo A, originário da Ásia, provavelmente nas regiões do Sul da China, Índia ou Indonésia. Os tipos B e C, no entanto, estão confinados até o momento apenas à América do Sul onde o cancro Tipo B foi relatado na Argentina, Paraguai e Uruguai; e o Tipo C no Brasil, limitado ao Estado de São Paulo (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020; CIVEROLO, 1984; MALAVOLTA JÚNIOR *et al*, 1984; MOREIRA *et al.*, 2010).

Diversas espécies de citros são alvos da doença causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) porém, o nível de susceptibilidade entre os cultivares varia, com *Citrus paradisi* (toranja) e *C. aurantifolia* (limão-galego ou lima comum) sendo os mais susceptíveis em cultivo. Entre as espécies relativamente tolerantes à doença estão *C. reticulata* (tangerina) e *C. sinensis* (laranja doce) (MOREIRA *et al.*, 2010). Variantes do cancro cítrico Tipo A também foram descritas na literatura, a variante A* foi isolada de *C. auratifolia* no Sudeste Asiático (VERNIÈRE *et al.*, 1998). A variante A^w, considerada um subgrupo de A*, foi detectada no Sul da Flórida ao ser isolada de *C. auratifolia* e *C. macrophylla* (SUN *et al.*, 2004).

As espécies de *C. limon* (limão-siciliano) são predominantemente alvo do cancro cítrico Tipo B, mas a doença já foi identificada em *C. sinensis* e em *C. paradisi* e os sintomas da doença são similares, porém aparecem mais lentamente em relação ao Tipo A. O cancro cítrico Tipo C, por sua vez, é restrito a *C. aurantifolia*

e não ocorre em *C. paradisi* (CIVEROLO, 1984; DAS, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010; NAMEKATA, 1971).

Além de diferenças entre patogenicidade, os isolados do gênero *Xanthomonas* também apresentam variação em relação a sensitividade ao cobre. Casos de resistência a esse metal foram relatados para linhagens de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *X. alfafae* subsp. *citrumelonis* e seu desenvolvimento tem sérias implicações e impacto para o uso de produtos bactericidas a base de cobre (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020).

No estado de São Paulo o cancro cítrico foi detectado na região de Presidente Prudente em 1957 e de lá se disseminou para o restante do país de acordo com (BITANCOURT, 1957). Ainda recentemente, os métodos de controle da doença incluíam medidas de erradicação e exclusão de talhões com o objetivo de eliminar ou limitar a disseminação da doença (FEICHTENBERGER *et al,*, 2005). No entanto, devido ao aumento de incidência da doença em território nacional nos últimos anos a legislação federal para o controle do cancro cítrico foi alterada em 2016.

A Instrução Normativa nº 37, de 5 de Setembro de 2016, estabelece 4 categoriais para manutenção da situação fitossanitária do cancro cítrico: I – Área com Praga Ausente, II – Área Livre de Praga (ALP), III – Área sob Erradicação ou Supressão, e IV – Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR) (BRASIL, 2016). A nova legislação permite, de acordo com a incidência da doença, a implementação de medidas de manejo na área contaminada assim, plantas com sintomas não precisam ser eliminadas e medidas de controle são aplicadas para proteção dos frutos contra infecções, de maneira a reduzir o impacto da doença na produção.

De acordo com a legislação o controle do cancro cítrico depende da condição fitossanitária da doença na área. Dentre as medidas de controle estão o uso de mudas sadias, utilização de espécies ou variedades menos suscetíveis, o uso de quebra ventos, a aplicação de cobre, o controle do minador de citros, o uso de indutores de resistência e outras medidas complementares, como o controle do acesso de pessoas e veículos aos pomares, desinfestação de equipamentos e ferramentas e a inspeção dos pomares (BEHLAU, 2019; FEICHTENBERGER *et al.*, 2005).

O uso de plantas resistentes pode reduzir as medidas complementares, pois embora todas as espécies possam ser afetadas há uma diferença na suscetibilidade das mesmas. Já o uso de quebra-ventos é essencial para pomares para fruta para

mesa, principalmente em regiões com alta incidência de ventos. O objetivo dos quebra-ventos é formar um obstáculo, reduzindo a velocidade do vento e consequentemente a disseminação da bactéria. O uso de cobre nos pomares não previne a entrada do fitopatógenos, é uma medida que ajuda a reduzir a quantidade de sintomas nas plantas e a queda dos frutos. Os produtos utilizados são à base de cobre como o oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. Eles formam uma camada protetora quando aplicados e evitam novas infecções. O controle do minador dos citros é preventivo e realizado com inseticidas para diminuir a ocorrência de ferimentos nas plantas (BEHLAU, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

3.3.1.2. Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae*

O gênero *Passiflora* reúne mais de 450 espécies de maracujá, das quais cerca de 60 são comestíveis. O Brasil é o maior produtor de maracujá-amarelo ou maracujá azedo do mundo. A região Nordeste é responsável pela maior parte da produção de maracujá, com 64,90% da produção nacional.

A bacteriose, mancha-bacteriana ou mancha oleosa, causada pela bactéria X. axonopodis pv. passiflorae (X. *passiflorae*) é uma das doenças mais severas de ocorrência nos pomares de maracujá no Brasil (Figura 2) (MUNHOZ *et al.*, 2015). A primeira detecção da doença ocorreu na região de Araraquara em 1969 (FISCHER; KIMATI; REZENDE, 2005), no Brasil a doença causa prejuízos econômicos significativos no país, visto que o país é um dos principais produtores de maracujá do mundo.

Figura 2. Sintomas da mancha-bacteriana em maracujá.

Fotografia: Ishida e Halfeld-Vieira. Fonte: EMBRAPA

As regiões de maior produção do maracujá no país também são regiões que oferecem condições ótimas de temperatura (temperaturas maiores que 30 ºC e umidade elevada) e umidade para o desenvolvimento e multiplicação da bactéria, e a principal razão das perdas relacionadas à doença é a dificuldade do controle. Uma vez ocorre à infecção o controle químico do fitopatógeno torna-se ineficiente, devido à alta taxa de multiplicação da bactéria. A disseminação da doença se dá por fatores abióticos como chuvas, ventos, pela água de irrigação, por sementes e mudas contaminadas e também através da alimentação por insetos de folhas lesionadas e a contaminação e sintomas se dão dá mesma forma que o cancro cítrico (ISHIDA; HALFELD-VIEIRA, 2009).

As medidas de controle da bacteriose consistem na utilização de mudas e sementes sadias que passam por tratamento térmico para erradicação da bactéria como método preventivo. Na região do cerrado o manejo da bactéria é feito por manejo integrado de controles químicos, cultural e genético (ISHIDA; HALFELD-VIEIRA, 2009; LIMA *et al.*, 2006).

O uso de químicos a base de cobre, como o sulfato de cobre, em conjunto com bactericidas é indicado para manejo da doença após poda de limpeza até a ausência dos sintomas, embora tenha sido ineficaz em alguns casos relatados (FISCHER; KIMATI; REZENDE, 2005). No entanto o uso de compostos cúpricos pode levar à seleção de patógenos resistentes aos químicos. Uma opção simples no controle da doença é a utilização de variedades resistentes, enquanto o melhoramento genético das plantas ainda está em desenvolvimento no país.

3.3.1.3. Xanthomonas campestris pv. *campestris*

As crucíferas são parte da família Brassicaceae que consiste de 338 gêneros e aproximadamente 3700 espécies que incluem culturas como couve, repolho, brócolis, couve napa, nabo e rabanete (AL-SHEHBAZ; BEILSTEIN; KELLOGG, 2006). Um dos patógenos mais destrutivos para essas culturas é a bactéria causadora da podridão negra, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Figura 3). Esse fitopatógeno está distribuído mundialmente e no Brasil foi detectado e relatado em 1985 em amostras de couve-flor, couve e sementes de repolho (CABI, 2020; MARIANO *et al.*, 1985).

Figura 3. Sintomas da podridão negra em crucíferas.

Fonte: Agrolink

Os efeitos da infeção por essa bactéria Gram-negativa podem ser severos, especialmente quando essas culturas tem seu valor econômico nas folhas, como no caso do repolho e couve. Assim, é uma doença de grande importância para os produtores, uma vez que não existe um agente químico ou biológico disponível comercialmente (DA SILVA *et al.*, 2019). O método de controle da doença limita-se ao controle da própria cultura e uso de substâncias químicas em manejo de praga integrado, no entanto a eficiência desses métodos tem atingido níveis variáveis de eficácia. O uso de produtos alternativos foi proposto, mas ainda não amplamente estudado, o que torna essa bactéria um alvo potencial de pesquisas que visam o uso

de produtos naturais produzidos por microrganismos como controle de doenças (NUÑEZ *et al.*, 2018).

3.3.2. *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani é um fungo de ocorrência mundial que afeta diversas culturas, entre elas membros das famílias Poaceae (arroz, trigo, aveia), Fabaceae (soja, amendoim, feijão), Solanaceae (tabaco e batata), e Brassicaceae (canola), assim a espécie é considerada a mais importante dentro do gênero *Rhizoctonia* (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). Este fitopatógeno está presente no solo, causando o tombamento de plântulas e cancro nas regiões do caule e raiz dos hospedeiros (Figura 4) e, sendo um fungo necrotrófico, causa a morte gradual de seu hospedeiro, gerando perdas aos agricultores (ABBAS *et al.*, 2019; ABDOULAYE; FODA; KOTTA-LOIZOU, 2019).

Figura 4. Tombamento ou podridão negra causada por *Rhizoctonia solani*.

Fonte: Agrolink

Atualmente o controle de *R. solani* envolve rotação de culturas, uso de cultivares resistentes e fungicidas, nenhum dos quais tem sido eficaz. Os mecanismos de promoção de infecção e outros aspectos da interação planta-patógeno em diversas culturas afetadas por esse fungo ainda é limitado, o que dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes ao fitopatógeno (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). Além disso, mesmo com uma aplicação extensiva de compostos químicos, esse patógeno mostrou-se persistente principalmente

devido a formação de escleródios, que permitem a sobrevivência do patógeno em condições desfavoráveis (ABBAS *et al.*, 2019; LI *et al*, 2021).

3.3.3. *Macrophomina phaseolina*

Um fungo generalista de solo e presente mundialmente, *Macrophomina phaseolina* afeta pelo menos 500 espécies de plantas em mais de 100 famílias, causando doenças como podridão do caule e da raiz, podridão do carvão e ferrugem das plântulas (MARQUEZ *et al.*, 2021). Esse fitopatógeno está presente em regiões áridas e tropicais e é persistente devido às suas variações morfológicas, genéticas, fisiológicas e patogênicas, além da formação de escleródios que auxiliam na adaptação e sobrevivência em diversas as condições ambientais (Figura 5) (GHOSH *et al.*, 2018).

Figura 5. Sementes e caule de feijão-caupi infectadas por *Macrophomina phaseolina*.

Fotografia: Halfeld-Vieira. Fonte: EMBRAPA

A intensidade da doença no hospedeiro está relacionada com a população de escleródios viáveis no solo assim, técnicas que reduzem a densidade do inóculo no solo podem ser capazes de reduzir o impacto da doença. Ainda assim, não existe um único tipo de controle que possa ser considerado ideal, dessa maneira o uso de técnicas integradas se faz necessário e depende das condições sociais e econômicas das regiões afetadas (LODHA; MAWAR, 2020; MARQUEZ *et al.*, 2021).

3.3.4. *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo fitopatógeno que afeta 408 espécies de plantas, distribuídas em 278 gêneros e 75 famílias. Esse fitopatógeno apresenta diversos modos de infecção, amplo espectro de hospedeiros, e características biotróficas e necrotróficas (LIANG; ROLLINS, 2018; WANG *et al.*, 2019). O fungo infecta folhas, flores e as hastes de seu hospedeiro, induzindo doenças que podem se desenvolver até mesmo durante a pós-colheita (Figura 6). O controle da doença é difícil devido à persistência dos escleródios no solo por longos períodos de tempo e à produção de ascósporos no ar (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018).

Figura 6. Sintomas de mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fonte: Agrolink

O controle de *S. sclerotiorum* ocorre em diversas etapas do plantio de seu hospedeiro e é fortemente dependente da aplicação de fungicidas, visto que existe uma severa falta de resistência ao patógenos nas culturas afetadas. Assim, o controle biológico e uso de produtos naturais de baixa toxicidade são fundamentais para o controle do fitopatógeno (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018; WANG *et al.*, 2019).

3.4. Controle de fitopatógenos

Os mecanismos principais de defesa das plantas contra patógenos são a resistência, definida como a capacidade do hospedeiro de limitar a multiplicação do patógeno, e a tolerância, que é a capacidade de reduzir o efeito da infeção independendo do nível de multiplicação do agente infeccioso. Os dois mecanismos coexistem e determinam a dinâmica da interação planta-hospedeiro (PAGÁN; GARCÍA-ARENAL, 2018).

Os fitopatógenos, porém, são persistentes em evitar as defesas de seus hospedeiros, causando perdas que podem chegar a bilhões de dólares americanos anualmente (SHUPING; ELOFF, 2017). O controle das doenças em plantas é essencial para que a qualidade e abundância da produção seja mantida. As estratégias de manejo ou erradicação dessas doenças variam, porém, grande parte dos agricultores dependem de pesticidas e fertilizantes químicos para manter a produtividade (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

O uso do cobre em larga escala na agricultura teve início em 1885, com a descoberta da Calda bordalesa ou mistura de *Bordeaux* por Pierre-Marie Alexis Millardet. Desde então o cobre assim como compostos antimicrobianos à base de cobre tem sido extensivamente utilizado na agricultura como fungicida e bactericida (LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

A razão do amplo uso desse metal na agricultura reside no espectro de atividade dos compostos cúpricos, que abrange muitos dos microrganismos fitopatógenos. O composto ainda tem função-chave no manejo integrado de pragas e se tornou essencial para a agricultura orgânica, que depende quase que exclusivamente de seu uso. A alta toxicidade em fitopatógenos, o baixo custo, a baixa toxicidade em mamíferos, a estabilidade química e o efeito residual prolongado são alguns dos benefícios do uso de compostos cúpricos. Dentre as desvantagens atreladas ao seu uso encontramos a fitotoxicidade, o desenvolvimento de linhagens resistentes ao cobre, acumulação no solo, os efeitos negativos na biota terrestre e parâmetros de qualidade nos alimentos (LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018; LAMICHHANE *et al.*, 2018).

De acordo com os relatórios do Comitê de Resistência a Ação Fungicida (“*Fungicide Resistance Action Committee*”, FRAC) fungos fitopatógenos não

apresentaram até 2021 nenhuma resistência aos compostos cúpricos sendo empregados enquanto diversos patógenos bacterianos desenvolveram resistência ao metal (FRAC, 2021). Linhagens bacterianas com tolerância ou resistência à cobre foram isoladas de diversas culturas agrícolas desde o início dos anos 80, e seu aparecimento é relatado com maior frequência a partir dos anos 90 (COOKSEY; AZAD, 1992).

Outras preocupações em relação a esses compostos estão na sustentabilidade a longo termo para proteção de culturas e o impacto na saúde humana e na biodiversidade que seu uso intensivo por mais de um século tem causado. A presença de altos níveis de Cu em solo cultivado pode produzir estresse nas plantas e reduzir a fertilidade do solo, resultando em efeitos adversos no rendimento e qualidade da produção. Além disso, o cobre quando em alta concentração é tóxico para as raízes das plantas, pois interfere na captação de ferro (Fe) e outros nutrientes, pode reduzir a germinação de sementes e emergência de mudas (LAMICHHANE *et al.*, 2018).

A aplicação de cobre se dá pela pulverização em folhas, onde o composto tem ação protetiva, permanecendo na superfície foliar sem ser absorvido pelo tecido vegetal. Com a ação de ventos, chuvas e do processo de irrigação, o metal chega até o solo, onde permanece como contaminante, causando bioacumulação e toxicidade, já que não pode ser degradado e sua remoção via lixiviação, escoamento ou absorção é desprezível (LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

As formulações químicas desempenharam um importante papel no aumento da qualidade e quantidade das colheitas. Entretanto, perigos como a poluição ambiental e as discussões sobre efeitos residuais de pesticidas na saúde humana e no ecossistema terrestre são tópicos que tem alterado a percepção e posição de muitas pessoas em relação ao uso dessas substâncias, abrindo um caminho para o controle biológico ou por produtos naturais (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

Extratos de plantas ou compostos derivados desses organismos já foram utilizados comercialmente contra fungos em larga escala nas áreas de agricultura e horticultura. Uma das vantagens desse tipo de abordagem é a presença de mais de um constituinte antifúngico na composição do extrato, o que consequentemente reduz o desenvolvimento de resistência pelos patógenos se diferentes rotas metabólicas são atacadas pelos diferentes compostos. Além disso, o uso de

produtos naturais permite a rotulagem do cultivo como “orgânico” (SHUPING; ELOFF, 2017).

Com base nas evidencias acumuladas do potencial de fungos da Antártica e considerando a necessidade de alternativas ao controle de fitopatógenos, entre eles membros do gênero *Xanthomonas* e fungos, está pesquisa busca contribuir com o estudo de metabólitos secundários produzidos por fungos da Antártica com potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; KHAN, S. U.; KHAN, W. U.; SALEH, T. A. *et al.* Antagonist effects of strains of Bacillus spp. against Rhizoctonia solani for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. **Comptes Rendus Biologies**, 342, n. 5, p. 124-135, 2019/06/01/ 2019.

ABDOULAYE, A. H.; FODA, M. F.; KOTTA-LOIZOU, I. Viruses Infecting the Plant Pathogenic Fungus Rhizoctonia solani. **Viruses**, 11, n. 12, p. 1113, 2019.

AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; SILVEIRA, D. *et al.* Secondary Metabolites. *In*: **Chromatography and Its Applications**: InTech, 2012.

AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. Rhizoctonia solani: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, 67, n. 1, p. 3-17, 2018.

AL-SHEHBAZ, I. A.; BEILSTEIN, M. A.; KELLOGG, E. A. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. **Plant Systematics and Evolution**, 259, n. 2-4, p. 89-120, 2006-07-01 2006.

ALAM, K.; ABBASI, M. N.; HAO, J.; ZHANG, Y. *et al.* Strategies for Natural Products Discovery from Uncultured Microorganisms. **Molecules**, 26, n. 10, p. 2977, 2021.

AN, S.-Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHÖLTER, F.-J. *et al.* Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. **FEMS Microbiology Reviews**, 44, n. 1, p. 1-32, 2020.

BARZKAR; JAHROMI, T.; POORSAHELI; VIANELLO. Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology. **Marine Drugs**, 17, n. 8, p. 464, 2019-08-08 2019.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J. Cancro cítrico – A doença e seu controle. Araraquara: Fundecitrus 2014.

BEHLAU, F. **Manual de Cancro Cítrico: Medidas Essenciais de Controle**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, 2019. 51 p.

BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of Xanthomonas affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, 45, n. 3, p. 200-212, 2020-06-01 2020.

BHARUDIN, I.; ABU BAKAR, M. F.; HASHIM, N. H. F.; MAT ISA, M. N. *et al.* Unravelling the adaptation strategies employed by Glaciozyma antarctica PI12 on Antarctic sea ice. **Marine Environmental Research**, 137, p. 169-176, 2018/06/01/ 2018.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, 23, n. 6, 1957.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 37 de 5 de setembro de 2016**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília**:** 1-17 p. 2016.

CABI. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International 2017.

CABI. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International 2020.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, 36, n. 1, p. 122-173, 2019-01-01 2019.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, 38, n. 2, p. 362-413, 2021-01-01 2021.

CHIN, Y.-W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, 8, n. 2, p. E239-E253, 2006-06-01 2006.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus [Xanthomonas campestris]. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 1984.

COOKSEY, D. A.; AZAD, H. R. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonads. **Applied and environmental microbiology**, 58, n. 1, p. 274-278, 1992.

DA SILVA, R. S.; DE OLIVEIRA, M. M. G.; DE MELO, J. O.; BLANK, A. F. *et al.* Antimicrobial activity of Lippia gracilis essential oils on the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. campestris and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 160, p. 40-48, 2019/10/01/ 2019.

DAS, A. K. Citrus canker-A review. **Journal of Applied Horticulture**, 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009-06-01 2009.

DE OLIVEIRA, R. P.; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C. *et al.* Cancro cítrico: epidemiologia e controle. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

DE SILVA, N. I.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D.; BULGAKOV, T. *et al.* Mycosphere essays 9: defining biotrophs and hemibiotrophs. 2016.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 41, n. 2, p. 185-201, 2014-02-01 2014.

DEMING, J. W. Psychrophiles and polar regions. **Current Opinion in Microbiology**, 5, n. 3, p. 301-309, 2002-06-01 2002.

DO AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupaçãoda citricultura no Brasil e no mundo. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.

DUARTE, A. W. F.; BARATO, M. B.; NOBRE, F. S.; POLEZEL, D. A. *et al.* Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, 41, n. 12, p. 2511-2521, 2018/12/01 2018.

DUARTE, A. W. F.; DE MENEZES, G. C. A.; E SILVA, T. R.; BICAS, J. L. *et al.* Antarctic Fungi as Producers of Pigments. *In*: ROSA, L. H. (Ed.). **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 305-318.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; STOYANOVA, M.; AVRAMOVA, H.; PAVLOVA, Y. *et al.* Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 28, n. 4, p. 721-727, 2014-07-04 2014.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; VANCHEVA, T.; BADZHINEROV, N.; KOLEVA, V. *et al.* Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. **Annuaire de l'Université de Sofia "St Kliment Ohridski" Faculte de Biologie**, 100, n. 4, p. 216-222, 2015.

EPPO. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. European and Mediterranean Plant Protection Organisation 2017.

EVANS, R. D.; JOHANSEN, J. R. Microbiotic Crusts and Ecosystem Processes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 18, n. 2, p. 183-225, 1999-03-01 1999.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE-JÚNIOR, J. Doenças dos citros (C*itrus s*pp.). *In*: KIMATI, H.;AMORIM, L.*, et al* (Ed.).

Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4th ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro. *In*: KIMATI, H.;AMORIM, L.*, et al* (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4th ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 467-474

FRAC. FRAC Code List©*2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and
mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). online: Fungicide Resistance Action Committee**:** 17 p. 2021.

FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M. *et al.* Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, 67, n. 4, p. 775-787, 2014-05-01 2014.

FURBINO, L. E.; PELLIZZARI, F. M.; NETO, P. C.; ROSA, C. A. *et al.* Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biology**, 41, n. 3, p. 527-535, Mar 2018.

GAL-HEMED, I.; ATANASOVA, L.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. *et al.* Marine isolates of Trichoderma spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, n. 15, p. 5100-5109, 2011.

GAMLIEL, A. High Consequence Plant Pathogens. *In*: **Crop Biosecurity**: Springer Netherlands, 2008. p. 25-36.

GARO, E.; STARKS, C. M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. *et al.* Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus Trichoderma virens. **Journal of natural products**, 66, n. 3, p. 423-426, 2003.

GHOSH, T.; BISWAS, M. K.; GUIN, C.; ROY, P. A review on characterization, therapeutic approaches and pathogenesis of Macrophomina phaseolina. **Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol**, 19, p. 72-84, 2018.

GOHEL, V.; CHAUDHARY, T.; VYAS, P.; CHHATPAR, H. S. Isolation and identification of marine chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. 2004.

GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in

different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015-08-01 2015.

GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; DE JESUS ASCENCIO-VALLE, F.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A.; SANTOYO, M. C. Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen Penicillium citrinum on Persian lime. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 114-122, 2017.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 3, n. 1, p. 15, 2002/01/01 2002.

HA, T. M.; KIM, D.-C.; SOHN, J. H.; YIM, J. H. *et al.* Anti-inflammatory and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory metabolites from the Antarctic marine-derived fungal strain Penicillium glabrum SF-7123. **Marine drugs**, 18, n. 5, p. 247, 2020.

HASHIM, N. H. F.; MAHADI, N. M.; ILLIAS, R. M.; FEROZ, S. R. *et al.* Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic yeast Glaciozyma antarctica. **Extremophiles**, 22, n. 4, p. 607-616, 2018/07/01 2018.

HENRIQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A. *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 30, n. 1, p. 65-76, Jan 2014.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; OCHOA, J. L.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; LARRALDE-CORONA, C. P. Biocontrol of postharvest blue mold (Penicillium italicum Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus Debaryomyces hansenii isolates. **Postharvest Biology and Technology**, 56, n. 2, p. 181-187, 2010.

HORIKOSHI, K. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. **Current Opinion in Microbiology**, 1, n. 3, p. 291-295, 1998/06/01/ 1998.

HUANG, J.-N.; ZOU, Q.; CHEN, J.; XU, S.-H. *et al.* Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, Penicillium citreonigrum SP-6. **Phytochemistry Letters**, 27, p. 114-118, 2018.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera Coniothyrium and Microsphaeropsis. **Journal of Natural Products**, 62, n. 1, p. 114-118, 1999.

ISHIDA, A. K. N.; HALFELD-VIEIRA, B. D. A. Mancha-bacteriana do maracujazeiro (Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae): etiologia e estratégias de controle. **Embrapa Roraima-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

KONG, Q. Marine microorganisms as biocontrol agents against fungal phytopathogens and mycotoxins. **Biocontrol Science and Technology**, 28, n. 1, p. 77-93, 2018-01-02 2018.

LA TORRE, A.; IOVINO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection: current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**, 57, n. 2, p. 201-236, 2018.

LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. Multi-Targeted Natural Products Evaluation Based on Biological Activity Prediction with PASS. **Current Pharmaceutical Design**, 16, n. 15, p. 1703-1717, 2010.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J. *et al.* Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 38, n. 3, 2018-06-01 2018.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.-G.; DE LEY, J. The host range of the genusXanthomonas. **The Botanical Review**, 50, n. 3, p. 308-356, 1984-07-01 1984.

LI, D.; LI, S.; WEI, S.; SUN, W. Strategies to Manage Rice Sheath Blight: Lessons from Interactions between Rice and Rhizoctonia solani. **Rice**, 14, n. 1, p. 21, 2021/02/25 2021.

LIANG, X.; ROLLINS, J. A. Mechanisms of Broad Host Range Necrotrophic Pathogenesis in Sclerotinia sclerotiorum. **Phytopathology®**, 108, n. 10, p. 1128-1140, 2018.

LIMA, A. D. A.; NORONHA, A. C. D. S.; BORGES, A. L.; CARDOSO, C. E. L. *et al.* A cultura do maracujá. **Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E)**, 2006.

LIU, C.-C.; ZHANG, Z.-Z.; FENG, Y.-Y.; GU, Q.-Q. *et al.* Secondary metabolites from Antarctic marine-derived fungus Penicillium crustosum HDN153086. **Natural product research**, 33, n. 3, p. 414-419, 2019.

LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of Macrophomina phaseolina in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, 168, n. 1, p. 1-17, 2020.

LÖSGEN, S.; SCHLÖRKE, O.; MEINDL, K.; HERBST-IRMER, R. *et al.* Structure and biosynthesis of chaetocyclinones, new polyketides produced by an endosymbiotic fungus. Wiley Online Library 2007.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; YAMASHIRO, T.; NOGUEIRA, E. M. C.; FEICHTENBERGER, E. Distribuição do tipo C de Xanthomonas campestris pv. citri no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 10, n. 11, 1984.

MARIANO, R. L. B.; BARROS, S. T.; MENEZES, M.; PIO-RIBEIRO, G. Detection of X*anthomonas campestris p*v. c*ampestris i*n batches of commercial Brassica seeds. (Detecção de X*anthomonas campestris p*v. c*ampestris e*m lotes de sementes comerciais de brassicas.). Fitopatologia Brasileira 10**:** 423-326 p. 1985.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. Macrophomina phaseolina : General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Frontiers in plant science**, 12, p. 634397-634397, 2021.

MATSUMURA, E.; NAKAGAWA, A.; TOMABECHI, Y.; IKUSHIRO, S. *et al.* Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. **Scientific Reports**, 8, n. 1, 2018-12-01 2018.

MEDINA-CÓRDOVA, N.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ASCENCIO, F.; CASTELLANOS, T. *et al.* Biocontrol activity of the marine yeast Debaryomyces hansenii against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (Zea mays L.). **Biological Control**, 97, p. 70-79, 2016.

MOHAMMED, A. E.; SONBOL, H.; ALWAKEEL, S. S.; ALOTAIBI, M. O. *et al.* Investigation of biological activity of soil fungal extracts and LC/MS-QTOF based metabolite profiling. **Scientific Reports**, 11, n. 1, 2021-12-01 2021.

MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V. *et al.* Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. 2002.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A. *et al.* Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii. **BMC Genomics**, 11, n. 1, p. 238, 2010-12-01 2010.

MUNHOZ, C. F.; SANTOS, A. A.; ARENHART, R. A.; SANTINI, L. *et al.* Analysis of plant gene expression during passion fruit–Xanthomonas axonopodis interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Annals of Applied Biology**, 167, n. 1, p. 135-155, 2015/07/01 2015. https://doi.org/10.1111/aab.12215.

MURATE, L. S.; OLIVEIRA, A. G. D.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R. *et al.* Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. **Agricultural Sciences**, 06, n. 03, p. 295-303, 2015-01-01 2015.

NAMEKATA, T. **Estudos comparativos entre Xanthomonas citri (Hasse) Dow., agente causal do" Cancro cítrico" e Xanthomonas citri (Hasse) Dow., NF SP. Aurantifolia, agente causal da" Cancrose do Limoeiro Galego"**. ESALQ, 1971.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, n. 3, p. 629-661, 2016-03-25 2016.

NUÑEZ, A. M. P.; RODRÍGUEZ, G. A. A.; MONTEIRO, F. P.; FARIA, A. F. *et al.* Bio-based products control black rot (Xanthomonas campestris pv. campestris) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale. **Scientific Reports**, 8, n. 1, 2018-12-01 2018.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, 22, n. 4, p. 552-558, 2011/08/01/ 2011.

PAGÁN, I.; GARCÍA-ARENAL, F. Tolerance to Plant Pathogens: Theory and Experimental Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, n. 3, p. 810, 2018-03-11 2018.

PARK, S. Y.; YANG, D.; HA, S. H.; LEE, S. Y. Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Natural Compounds. **Advanced Biosystems**, 2, n. 1, p. 1700190, 2018.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, 21, n. 2, p. 204-207, 2016/02/01/ 2016.

PEIXOTO NETO, P.; AZEVEDO, J.; ARAÚJO, W. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento , Brasília. v. 29**:** 62-77 p. 2002.

PENG, T. C.; PENG, K. S.; LING, C. M. W. V. Characterisation of an Antarctic Yeast, Glaciozyma antarctica PI12. **Borneo International Journal of Biotechnology (BIJB)**, p. 89-102, 2020.

PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T. *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, 10, Jun 2019.

PURIĆ, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L. B.; SETTE, L. D. *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, 66, n. 6, p. 530-536, 2018-06-01 2018.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C. *et al.* Genomes-based phylogeny of the genus Xanthomonas. **BMC Microbiology**, 12, n. 1, p. 43, 2012-12-01 2012.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001-02-01 2001.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B. *et al.* Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 5, p. 344-355, 2011-05-01 2011.

SANCHES, A. L. R.; MIRANDA, S. H. G. D.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 52, n. 3, p. 549-566, 2014-09-01 2014.

SANCHEZ, S.; GUZMAN-TRAMPE, S.; ÁVALOS, M.; RUIZ, B. *et al.* **Microbial natural products**. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2012.

SANG; DAT; VINH; CUONG *et al.* Coral and Coral-Associated Microorganisms: A Prolific Source of Potential Bioactive Natural Products. **Marine Drugs**, 17, n. 8, p. 468, 2019.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R. *et al.* Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida—Again. **Plant Disease**, 85, n. 4, p. 340-356, 2001-04-01 2001.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 31, n. 3, p. 446-459, 2017-05-04 2017.

SHIN, H. J. Natural Products from Marine Fungi. **Marine Drugs**, 18, n. 5, p. 230, 2020-04-27 2020.

SHUPING, D. S. S.; ELOFF, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 14, n. 4, p. 120-127, 2017.

SILBER, J.; OHLENDORF, B.; LABES, A.; ERHARD, A. *et al.* Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a Calcarisporium Strain. **Marine Drugs**, 11, n. 9, p. 3309-3323, 2013-08-29 2013.

SKROPETA, D. Deep-sea natural products. **Natural Product Reports**, 25, n. 6, p. 1131, 2008-01-01 2008.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen Sclerotinia sclerotiorum — a review. **Journal of Plant Pathology**, 100, n. 1, p. 1-12, 2018-04-01 2018.

SONG, M. C.; KIM, E. J.; KIM, E.; RATHWELL, K. *et al.* Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, 31, n. 11, p. 1497-1509, 2014-07-29 2014.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W.; SAITO, M. L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew/Bioprospektion von pflanzlichen und pilzlichen Extrakten mit systemischem Effekt zur Bekämpfung des Echten Mehltaupilzes an Gurken. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 383-393, 2003.

SUN, X.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J. *et al.* Detection and Characterization of a New Strain of Citrus Canker Bacteria from Key/Mexican Lime and Alemow in South Florida. **Plant Disease**, 88, n. 11, p. 1179-1188, 2004-11-01 2004.

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. Why Natural Products. http://www.scripps.edu/shen/NPLI/whynaturalproducts.html: The Scripps Research Institute. 2015. 2015.

TIAN, Y.; LI, Y.-L.; ZHAO, F.-C. Secondary Metabolites from Polar Organisms. **Marine Drugs**, 15, n. 3, p. 28, 2017-02-23 2017.

TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E. A.; LIYANAPATHIRANAGE, P. *et al.* Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, 18, n. 8, p. 415-427, 2020.

TWAIJ, B. M.; HASAN, M. N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. International Journal of Plant Biology, 13, n. 1, p. 4-14, 2022.

VARRELLA, S.; BARONE, G.; TANGHERLINI, M.; RASTELLI, E. *et al.* Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **Journal of Fungi**, 7, n. 5, p. 391, 2021.

VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L. *et al.* **European Journal of Plant Pathology**, 104, n. 5, p. 477-487, 1998-01-01, 1998.

VIEIRA, G.; PURIĆ, J.; MORÃO, L. G.; DOS SANTOS, J. A. *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against Xanthomonas citri subsp. citri. **Letters in Applied Microbiology**, 67, n. 1, p. 64-71, 2018.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, 12, n. 3, p. 374-385, 2000-09-01 2000.

WANG, K.-L.; DOU, Z.-R.; GONG, G.-F.; LI, H.-F. *et al.* Anti-Larval and Anti-Algal Natural Products from Marine Microorganisms as Sources of Anti-Biofilm Agents. **Marine Drugs**, 20, n. 2, p. 90, 2022.

WANG, Y.; HE, S.; XIA, J.; YU, T. *et al.* Acid adaptation and biocontrol efficacy of antagonistic marine yeast Rhodosporidium paludigenum. **Annals of Microbiology**, 64, n. 2, p. 503-508, 2014.

WANG, Z.; MA, L.-Y.; CAO, J.; LI, Y.-L. *et al.* Recent advances in mechanisms of plant defense to Sclerotinia sclerotiorum. **Frontiers in Plant Science**, 10, p. 1314, 2019.

WILSON, Z. E.; BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. **Nat. Prod. Rep.**, 26, n. 1, p. 44-71, 2009-01-01 2009.

YANDIGERI, M. S.; MALVIYA, N.; SOLANKI, M. K.; SHRIVASTAVA, P. *et al.* Chitinolytic Streptomyces vinaceusdrappus S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against Rhizoctonia solani. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31, n. 8, p. 1217-1225, 2015.

YARZÁBAL, L. A. Antarctic Psychrophilic Microorganisms and Biotechnology: History, Current Trends, Applications, and Challenges. *In*: CASTRO-SOWINSKI, S. (Ed.). **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability**. Singapore: Springer Singapore, 2016. p. 83-118.

ZHANG, X.; LI, S.-J.; LI, J.-J.; LIANG, Z.-Z. *et al.* Novel Natural Products from Extremophilic Fungi. **Marine Drugs**, 16, n. 6, p. 194, 2018-06-04 2018.

ZHAO, J.; LI, J.; KONG, F. Biocontrol activity against Botrytis cinerea by Bacillus subtilis 728 isolated from marine environment. **Annals of microbiology**, 53, n. 1, p. 29-36, 2003.

CAPÍTULO 1

BIOPROSPECÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA

RESUMO

Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular não essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos organismos vivos. Essas moléculas tem sua aplicação na indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia, têxtil, e na área clínica como antibióticos, agentes antitumorais, promotores de crescimento vegetal, inibidores enzimáticos entre outras. Os fungos são responsáveis por grande parte dos produtos naturais conhecidos, e produzem esses compostos como estratégia de competição contra outros organismos e sobrevivência em ambientes extremos. O ambiente mais explorado quanto à produção de moléculas ativas é o solo, mas desde 2017 o número de compostos relacionados ao ambiente marinhos tem aumentado e 47% do total de produtos relatados oriundos desse ambiente tem origem em fungos. Nesse contexto, o potencial de quatro fungos de sedimentos marinhos da Antártica e seus extratos foram explorados. Para tal, a atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada *in vitro* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem 306, agente causador do cancro cítrico, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* isolado LM4a, responsável pela mancha-bacteriana do maracujazeiro, e *X. campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão negra; e os extratos foram submetidos à análise por cromatografia líquida para comparação do perfil químico. *X. citri* foi mais sensível aos extratos e *X. campestris* a mais resistente. O isolado *Penicillium* sp. CRM 1540 apresentou resultados promissores em dois meios de cultivo, inibindo o crescimento *in vitro* das três *Xanthomonas*. Uma diferenciação inter-específica dentro do gênero das bactérias-alvo foi revelada, visto que resultados divergentes foram observados quanto à atividade antibacteriana de um mesmo extrato em espécies diferentes, sendo *X. campestris* o fitopatógeno com maior resistência aos extratos avaliados. Dessa maneira, o uso de formulações contendo mais de um composto bioativo parece ser preferível para o combate das bactérias do gênero *Xanthomonas*.

Palavras-chave: *Penicillium* sp.; Cancro cítrico; Mancha-bacteriana; Podridão negra; *Xanthomonas*.

CHAPTER 1

BIOPROSPECTION AND FRACTIONATION OF CRUDE EXTRACTS PRODUCED BY FUNGI FROM MARINE SEDIMENTS FROM ANTARCTICA

ABSTRACT

Secondary metabolites are compounds of small molecular weight non essentials for development and reproduction of organisms. These molecules are employed in the pharmaceutical, agricultural, food, textile and clinical industries as antibiotics, antitumoral agents, promoters of plant growth, enzymatic inhibitors and more. Fungi are responsible for great part of natural compounds known, producing these compounds as a strategy against other organisms and for survival in extreme habitats. The most explored environment for the production of active molecules is the soil, but since 2017 the number of compounds related to the marine environment has grown, and 47% of the total of products described from this area are from fungi. In this context, the potential of four fungi from Antarctica marine sediments e its extracts were explored. For this, the antibacterial activity of the extracts was assayed *in vitro* against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain 306, causal agent of citrus canker, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* isolate LM4a, responsible for bacterial spot in passionfruit, and *X. campestris* pv. *campestris*, agent for black rot; and the extracts were submitted to chromatography analysis for comparison of chemical profile. *X. citri* showed more sensitivity to the extracts and *X. campestris* the most resistance. Isolate *Penicillium* sp. CRM 1540 showed promising results in two culture media, inhibiting the growth of the three *Xanthomonas in vitro.* An inter-species differentiation among targeted bacteria was revealed as diverging results of antibacterial activity were observed for the same crude extract in different species, with *X. campestris* being the phytopathogen more resistant to the evaluated extracts. Therefore, it is possible thay the use of formulations with more than one active compound may favor the control of bacterias from the *Xanthomonas* group.

Keywords: *Penicillium* sp.; Citrus canker; Leaf spot; Black rot; *Xanthomonas*.

1 INTRODUÇÃO

As condições severas da Antártica fazem com que os microrganismos deste ambiente desenvolvam adaptações bioquímicas e fisiológicas para sua adaptação e sobrevivência (ENCHEVA-MALINOVA *et al.*, 2014; FURBINO *et al.*, 2014; VINCENT, 2000). Devido à essas adaptações, estes microrganismos são uma fonte rica de produtos naturais baseados em estruturas químicas únicas (FURBINO *et al.*, 2014; TIAN; LI; ZHAO, 2017).

Devido ao isolamento geográfico e às condições inóspitas, no entanto, uma diversidade abrangente de fungos da região, com potencial aplicação biotecnológica, permanecem sub representados quando comparados com outras regiões polares, temperadas e tropicais, especialmente em relação ao seu arsenal de moléculas bioativas que são de extrema relevância para o entendimento da dinâmica dos ecossistemas antárticos e para a obtenção de produtos naturais de valor agregado (GONÇALVES *et al.*, 2015; PIKUTA; HOOVER; TANG, 2007).

Pesquisas tem evidenciado o potencial de fungos do ambiente antártico, tanto marinhos quanto terrestres, em produzir produtos naturais para aplicações farmacêuticas, agrícolas e industriais (FURBINO *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2015; HENRIQUEZ *et al.*, 2014; SVAHN *et al.*, 2015).

Na área agrícola estes microrganismos têm apresentado potencial para produção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana contra *Xanthomonas*, bactérias fitopatogênicas responsáveis por doenças em diversas espécies vegetais economicamente importantes (ENCHEVA-MALINOVA *et al.*, 2015; HENRIQUEZ *et al.*, 2014; NEDIALKOVA; NAIDENOVA, 2005; SILBER *et al.*, 2013).

No Brasil, por exemplo, muitas doenças causadas por *Xanthomonas* afetam culturas de grande importância econômica e social tais como: citros, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar (RODRIGUEZ-R *et al.*, 2012; RYAN *et al.*, 2011).

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram 32 fungos isolados da Antártica (gêneros: *Penicillium, Pseudogymnoascus, Cadophora, Paraconiothyrium* e *Toxicocladosporium)*, produtores de extratos com atividade antibacteriana *contra X. citri subsp. citri, X. axonopodis pv. passiflorae e X.*

euvesicatoria (PURIĆ *et al.*, 2018; VIEIRA; PURIC *et al*., 2018). Demonstrando assim a capacidade destes microrganismos em produzir compostos com potencial ação contra *Xanthomonas.* Entretanto há a necessidade de realizar a purificação e identificação dos compostos bioativos responsáveis pela atividade antibacteriana destes extratos.

1.1. Objetivos

a. Extrair os metabólitos secundários produzidos em três meios de cultivo distintos e avaliar sua atividade antibacteriana *in vitro* contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. campestris* pv. *campestris*;
b. Selecionar os meios de cultivo com metabólitos ativos para extração em maior volume;
c. Fracionar os extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – "*High Pressure Liquid Chromatography*").

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Recursos microbianos

Os isolados selecionados para produção de metabólitos de interesse na etapa de reavaliação foram reativados da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), onde se encontram preservados por meio de ultracongelamento à -80 ºC.

Os fungos filamentosos foram isolados de sedimentos marinhos coletados na Antártica durante e fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015) pela Prof.ª Dr.ª Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) no âmbito do Projeto PROANTAR/CNPq intitulado “A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção – MICROSFERA”, sob a coordenação da Prof.ª Vivian Pellizari (IO/USP). Os isolados estão sob investigação quanto a sua identificação completa, porém resultados preliminares de gênero e similaridade com outros isolados do gênero *Penicillium* são relatados por Wentzel *et al*. (2019).

Os fitopatógenos bacterianos utilizados na etapa de bioprospecção da atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram cedidos por parceiros de pesquisa.

A bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem 306 (*X. citri*) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira, do Laboratório de Genética Microbiana da UNESP de Rio Claro; *X. axonopodis* pv. *passiflorae* linhagem LM4a (*X. passiflorae*), isolada de maracujá azedo em Limeira – SP, foi gentilmente cedida pela Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Carneiro Vieira da ESALQ/USP. Testes de atividade antibacteriana também foram conduzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ACM 477 (*X. campestris*), em parceria com o Capon Group, grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Robert J. Capon do Institute for Molecular Bioscience da Universidade de Queensland, em Brisbane, Austrália. Com exceção de *X. campestris*, os patógenos são mantidos em ultrafreezer a -80 ºC no Departamento de Biologia Geral e Aplicada (IB/UNESP – Rio Claro) para preservação.

2.2. Seleção de isolados de interesse

Quatro isolados, *Penicillium* sp. CRM 1545A, *Penicillium* sp. CRM 1540, *Penicillium* sp. CRM 1527 e *Penicillium* sp. CRM 1545B, com atividade antibacteriana previamente relatada por nosso grupo de pesquisa (PURIĆ *et al.*, 2018) foram selecionados e reavaliados quanto à atividade em *X. citri*, *X. passiflorae* e *X. campestris*.

2.2.1. Condições de cultivo e extração de metabólitos

Os fungos foram reativados em placas de Petri com meio de cultivo Malte 2% (M; 20 g/L da composição comercial: 80,0% de Maltose, 6,0% de susbtâncias protéicas, 5,0% de cinzas. KASVI) e incubados à 15 ºC por 7 dias em incubadora do tipo B.O.D. (SOLAB SL – 200/300).

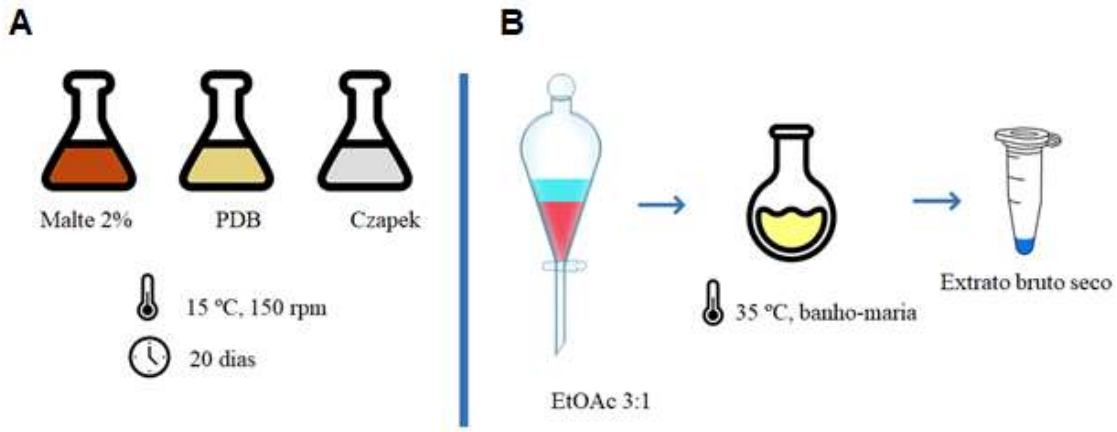
Em seguida um disco de aproximadamente 5 mm da borda da cultura reativada foi transferido para novas placas para adaptação nos seguintes meios de cultivo: Malte 2%, "*Potato Dextrose Broth"* (PDB; 39 g/L da composição comercial: 200 g/L de infusão de batata, 20 g/L de glicose. KASVI) e Czapek Dox Broth (Cz; 34 g/L da composição comercial: 2,0 g/L de nitrato de sódio, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 0,5 g/L de cloreto de potássio, 0,01 g/L de sulfato ferroso, 1,0 g/L de difosfato de potássio, 30 g/L de sacarose. KASVI). Os meios foram preparados conforme recomendação do fabricante e para cultivo em meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico KASVI à formulação.

Após 7 dias de incubação à 15 ºC, discos contendo ágar + micélio foram transferidos para frascos erlenmeyers (250 mL) contendo 150 mL dos respectivos meios de cultivo (3 discos/frasco). Os isolados foram incubados à 15 ºC com agitação de 150 rpm por 20 dias para produção de metabólitos secundários em incubadora tipo "*shaker*" (SOLAB SL 221).

A biomassa foi removida da fase líquida por filtração à vácuo e descartada após esterilização em autoclave (121 ºC e 1 atm). O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt, grau de pureza PA) por 5 vezes para 1 parte de sobrenadante e 3 partes de solvente (v/v). Após a extração o

solvente foi removido em evaporador rotativo com banho-maria à 35 º acoplado à resfriador (Evaporador FISATOM 802, Banho de aquecimento FISATOM ANALÓGICO 550, Banho ultratermostático SOLAB SL 152) e concentrador de amostras com pressão de ar e aquecimento à 40 ºC (SOLAB SL – 23). Um esquema simples da produção de metabólitos secundários nos três meios de cultivo e da etapa de extração orgânica e secagem é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Produção de metabólitos secundários e obtenção dos extratos orgânicos secos.



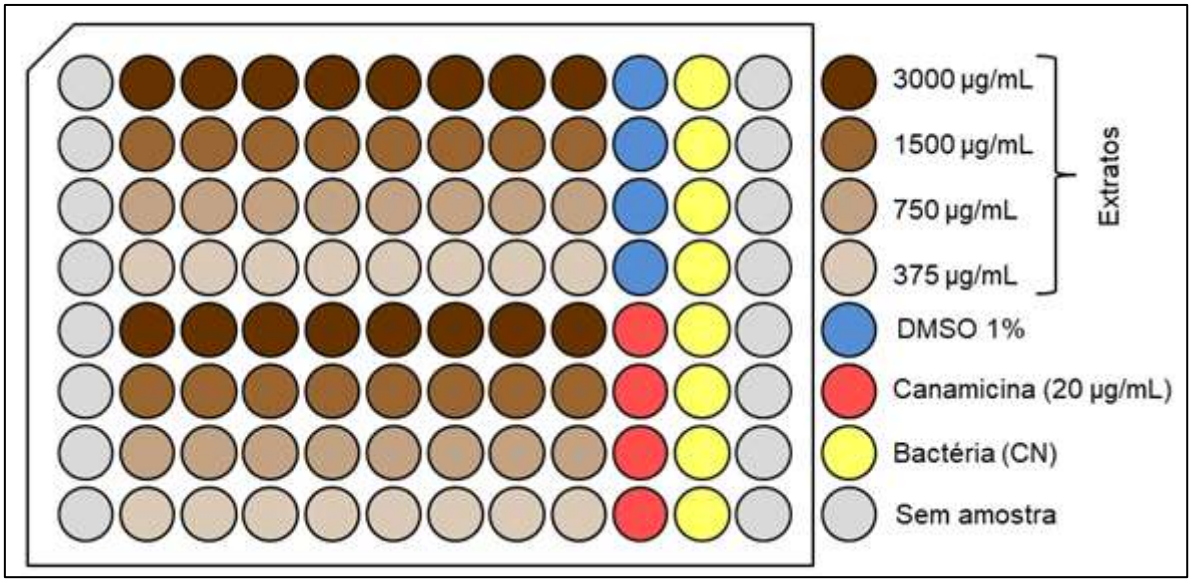
Fonte: A Autora. (**A**): Produção de metabólitos secundários em meio Malte 2%, "*Potato Dextrose* Broth" e Czapek à 15 ºC e 150 rpm por 20 dias. (**B**): Extração liquido-líquido com acetato de etila (EtOAc) na proporção de 3:1 seguida de remoção do solvente em rotaevaporador rotativo com banho-maria à 35 ºC.

O solvente recuperado na rotaevaporação foi reutilizado em processos de extração de amostras semelhantes e então devidamente descartado. Os extratos orgânicos obtidos foram armazenados em geladeira após a remoção do solvente de extração.

2.2.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Os extratos orgânicos secos, mantidos a 10 ºC, foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5 SIGMA-ALDRICH) a 10% em água destilada (v/v) para uma concentração estoque de 30000 µg/mL. O estoque foi em seguida diluído em meio NYG (0,3% de extrato de levedura KASVI, 0,5% de peptona bacteriológica KASVI e 2% de glicerol SYNTH) para 3000 µg/mL (concentração de DMSO = 1%). Os extratos foram avaliados quanto à sua atividade em *X. citri* e *X. passiflorae* pelo método REMA ("*Resazurin Microtiter Assay*") em placa de 96 poços (SILVA *et al.*, 2013), e por determinação densidade óptica em 600 nm quanto a atividade em *X. campestris*. Foram adicionados 200 µL do extrato na placa e em seguida o mesmo foi submetido à micro diluição para que o efeito antimicrobiano fosse observado nas concentrações subsequentes: 1500 µg/mL, 750 µg/mL e 375 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata (Figura 8).

Figura 8. Disposição das amostras em microplaca de 96 poços para teste de atividade antimicrobiana *in vitro*



Fonte: A Autora..DMSO 1% (Dimetilsulfóxido): Controle de Veículo; Canamicina (20 µg/mL): Controle Positivo; Fitopatógeno (CN): Controle Negativo.

Os fitopatógenos *X. citri* e *X. passiflorae* foram reativados em meio NYG ágar (2% ágar bacteriológico) e incubados por 48h à 29 ºC em estufa do tipo B.O.D

(SOLAB SL – 200/300). Após a incubação uma alçada contendo células bacterianas foi transferida para 20 mL de meio NYG líquido. Esse pré-incóculo foi incubado overnight à 29 ºC e 200 rpm (Incubadora “shaker” SOLAB SL 221) até atingir densidade óptica de 0,8 em 600 nm (DO_{600}). O pré-inóculo foi diluído 1:10 em meio NYG e 10 µL foram adicionados por poço. *X. campestris* foi reativada em meio NYG e pré-inóculo foi preparado transferindo uma alçada de bactéria em 10 mL de NYG líquido, incubado à 30 °C e 190 rpm overnight. O pré-inóculo com DO_{600} de 0,4 foi diluído em NYG 1:5 e 10 µL foram adicionados em cada poço da placa. O volume final de células na placa para os três fitopatógenos foi de 10^5 células/poço.

Para os testes em *X. citri* e *X. passiflorae* foi utilizada uma solução de 20 µg/mL de canamicina (CAS 70560-51-9, SIGMA ALDRICH) em água (v/v) como Controle Positivo (CP), para *X. campestris* rifampicina a 50 µg/mL (CAS 13292-46-1, SIGMA ADRICH) foi usado como CP. O Controle Negativo (CN) consistiu de meio NYG e células bacterianas e DMSO 1% diluído em água (v/v) foi usado como controle de veículo (CV) em todos os testes de atividade antibacteriana.

A placa de 96 poços foi incubada em estufa à 29 ºC entre 16 e 18h, após esse período foram adicionados 15 µL de solução de resazurina 0,01% (m/v) em cada poço da placa. Em seguida a placa foi incubada à 29 ºC por 1h 30 min e analisada em espectrômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD (Figura 9). A partir dos dados de unidade de fluorescência (UF) coletados, a atividade antibacteriana dos extratos contra *X. citri* e *X. passiflorae* foi determinada pela fórmula de abaixo em relação ao Controle Negativo (CN):

$$Inibição\ do\ Crescimento\ (\%) = \frac{(Média\ UF\ de\ CN - UF\ extrato)}{Média\ UF\ de\ CN} * 100$$

Onde:

UF: Unidades de Fluorescência; CN: Controle Negativo

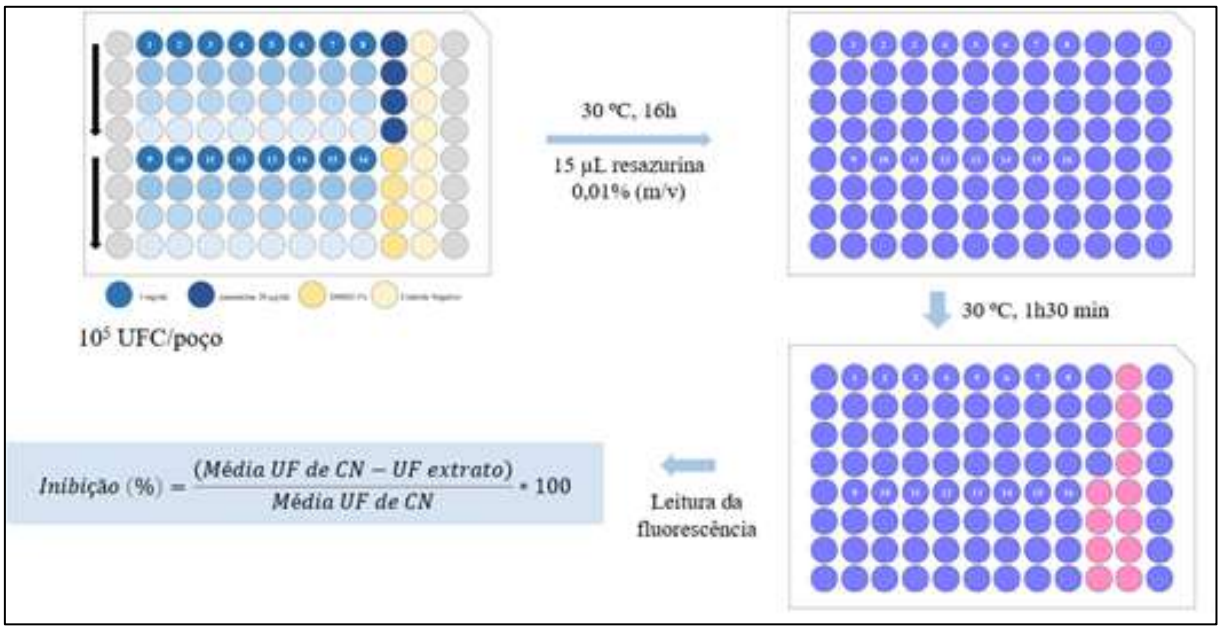
Nos testes de atividade em *X. campestris* após o período de incubação a leitura dos resultados foi feita em leitor de placas POLARStar Omega com absorbância em 600 nm e a inibição do crescimento calculada pela fórmula:

$$Inibição\ do\ Crescimento\ (\%) = \frac{(Média\ DO600\ de\ CN - DO600\ extrato)}{Média\ DO600\ de\ CN} * 100$$

Onde:

DO_{600}: Medida da Densidade Óptica; CN: Controle Negativo

Figura 9. Ensaio de atividade antimicrobiana com resazurina



Fonte: A Autora. A microplaca foi incubada por 16h sem agitação à 30 ºC, em seguida o corante resazurina foi adicionado e a placa foi novamente incubada à 30 ºC por 1h30min. Um leitor de fluorescência foi utilizado para cálculo da inibição do crescimento bacteriano.

2.3. Produção de metabólitos para fracionamento

Com base nos resultados de atividade inibitória, os isolados *Penicillium* sp. CRM 1545A, *Penicillium* sp. CRM 1540, *Penicillium* sp. CRM 1527 e *Penicillium* sp. CRM 1545B foram novamente cultivados em meio Malte 2% e Czapek para obtenção de massa para purificação dos extratos. A produção de metabólitos ocorreu em erlenmeyers (250 mL) contendo 150 mL dos meios de cultivo incubados à 15 ºC e 150 rpm por 20 dias. Foram incubados 15 erlenmeyers por isolado, e a extração dos metabólitos seguiu o método descrito no item 2.2.1.

2.4. Análise do perfil cromatográfico dos extratos brutos

Os extratos brutos foram analisados em sistema UPLC (“*Ultra-Performance Liquid Chromatography*”, Agilent) em coluna micro-analítica C8 (150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), temperatura de 44,97 – 44,99 ºC. Cada extrato foi dissolvido em metanol (grau HPLC) para 3 mg/mL, filtrado em filtro de seringa hidrofílico do tipo PTFE com

membrana de 0,45 µm e 1 µL foi injetado no sistema. Os solventes acetonitrila (MECN) e água ultrapura foram filtrados e o ácido trifluoroacético (TFA) foi adicionado para uma melhor resolução da cromatografia. A análise ocorreu em modo gradiente com 10 – 100% de acetonitrila (0,01% de TFA) em água ultrapura (0,01% TFA) por 4,17 min e com detector DAD-UV em 210, 254, 290, 360 e 400 nm.

2.5. Fracionamento dos extratos brutos

Os extratos secos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC) para 60 mg/mL e filtrados em filtro de membrana PTFE 0,45 µm. Alíquotas de 900 µL foram submetidas a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase-reversa C8 (Phenomenex Luna 21.2 mm x 25 cm x 7 µM) e eluição gradiente com MeCN/H_2O (10%-100%), ambos contendo 0,01% de TFA, por 30 min, dando origem à 40 frações. Detecção dos picos foi observada em 210, 254 e 290 nm. Os solventes do processo de purificação foram removidos em evaporador Genevac Solvent Evaporator por 8h e as frações foram armazenadas em freezer (-20 ºC).

2.5.1. Análise de pureza e similaridade das frações

As frações foram dissolvidas em metanol (grau HPLC) para 3 mg/mL e analisadas por cromatografia analítica em sistema UPLC e por espectrometria de massas em sistema QTOF-LCMS (Quadruple Time of Flight Mass Spectrometer Liquid Chromatography). Ambas as análises ocorreram em coluna C8 em gradiente de 10-100% de MeCN/H_2O com 0,01% de TFA como constante isocrática e fluxo de 0,417 mL/min por 4,17 min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção de isolados de interesse

Ao final dos 20 dias de produção de metabólitos foram obtidos 12 extratos brutos, sendo três de cada isolado. A identificação dos extratos seguindo o padrão “Isolado + Meio de cultivo” é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Extratos obtidos após cultivo em três diferentes meios de cultura.

Isolado	Meio de cultivo líquido	Identificação do Extrato
CRM 1540	Malte 2%	CRM 1540-M
	Potato Dextrose Broth	CRM 1540-PDB
	Czapek	CRM 1540-Cz
CRM 1527	Malte 2%	CRM 1527-M
	Potato Dextrose Broth	CRM 1527-PDB
	Czapek	CRM 1527-Cz
CRM 1545A	Malte 2%	CRM 1545A-M
	Potato Dextrose Broth	CRM 1545A-PDB
	Czapek	CRM 1545A-Cz
CRM 1545B	Malte 2%	CRM 1545B-M
	Potato Dextrose Broth	CRM 1545B-PDB
	Czapek	CRM 1545B-Cz

3.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Os testes de atividade em X. *citri* e em X. *passiflorae* revelaram que nenhum dos extratos produzidos em meio PDB tiveram algum tipo de atividade inibitória assim, esse meio de cultivo não foi utilizado no prosseguimento do estudo desses isolados. Durante os testes, canamicina inibiu o crescimento de *X. citri* em 90% e o

de *X. passiflorae* em 97%, rifampicina inibiu em 88,2% o crescimento de *X. campestris*.

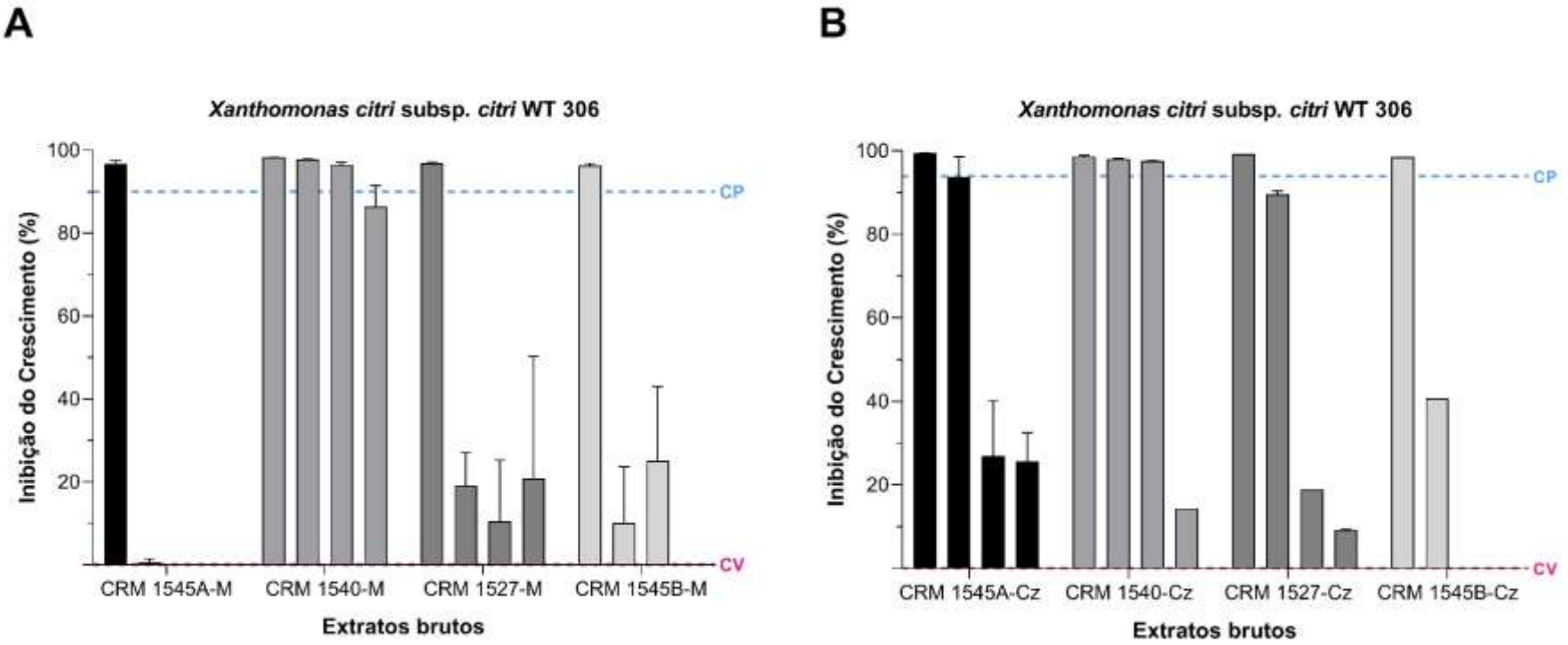
Em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o isolado *Penicillium* sp. CRM 1540 apresentou atividade inibitória quando cultivado em Malte 2% e Czapek (Figura 10). O extrato CRM 1540-M (Figura 10A) apresentou inibição em 3000 µg/mL (98,32%), 1500 µg/mL (96,43%), 750 µg/mL (96,43%) e em 375 µg/mL (86,50%). O extrato CRM 1540-Cz, por sua vez, inibiu o crescimento de *X. citri* em mais de 90% nas concentrações de 3000 µg/mL (98,65%), 1500 µg/mL (98,07%) e 750 µg/mL (97,67%); em 375 µg/mL a inibição de *X. citri* foi de 14,31% (Figura 10B).

A Figura 10 também mostra que a atividade inibitória dos demais extratos em Czapek (Figura 10B) foi acompanhada de queda gradual da porcentagem de inibição conforme a concentração de extrato avaliada diminuiu e que para os extratos em meio Malte 2% (Figura 10A) esse fenômeno não foi observado para o ensaio com *X. citri*.

O extrato CRM 1545A-Cz inibiu o crescimento de *X. citri* em 3000 e 1500 µg/mL, com 99,47% e 93,76% de inibição, respectivamente. Além de ter apresentado mais de 20% de inibição nas duas diluições subsequentes (26,87% em 750 µg/mL e 25,64% em 375 µg/mL).

O extrato CRM 1527-Cz inibiu em 99,24% o crescimento bacteriano em 3000 µg/mL e 89,56% em 1500 µg/mL, seguido de 18,80% em 750 µg/mL e 9,15% em 375 µg/mL. A atividade inibitória de CRM 1545B-Cz foi calculada em 98,5% em 3000 µg/mL e 40,6% em 1500 µg/mL, sem inibição nas demais concentrações (Figura 10B).

Figura 10. Potencial inibitório *in vitro* de extratos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem WT 306.



(**A**): Extratos produzidos em meio Malte 2%. (**B**): Extratos produzidos em meio Czapek. Concentrações avaliadas: 3000, 1500, 750 e 375 µg/mL. Controle positivo (CP): canamicina 20 µg/mL; Controle de veículo (CV): Dimetilsulfóxido 1% (v/v em água).

Em teste contra *X. passiflorae* (Figura 11) o extrato CRM 1540-M foi o único capaz de inibir o crescimento bacteriano em menores concentrações, com inibição entre 98,22% e 99,11% em todas as concentrações avaliadas (Figura 11A). Os demais extratos produzidos em meio Malte apresentaram cerca de 97% de inibição apenas na maior concentração avaliada (3000 µg/mL).

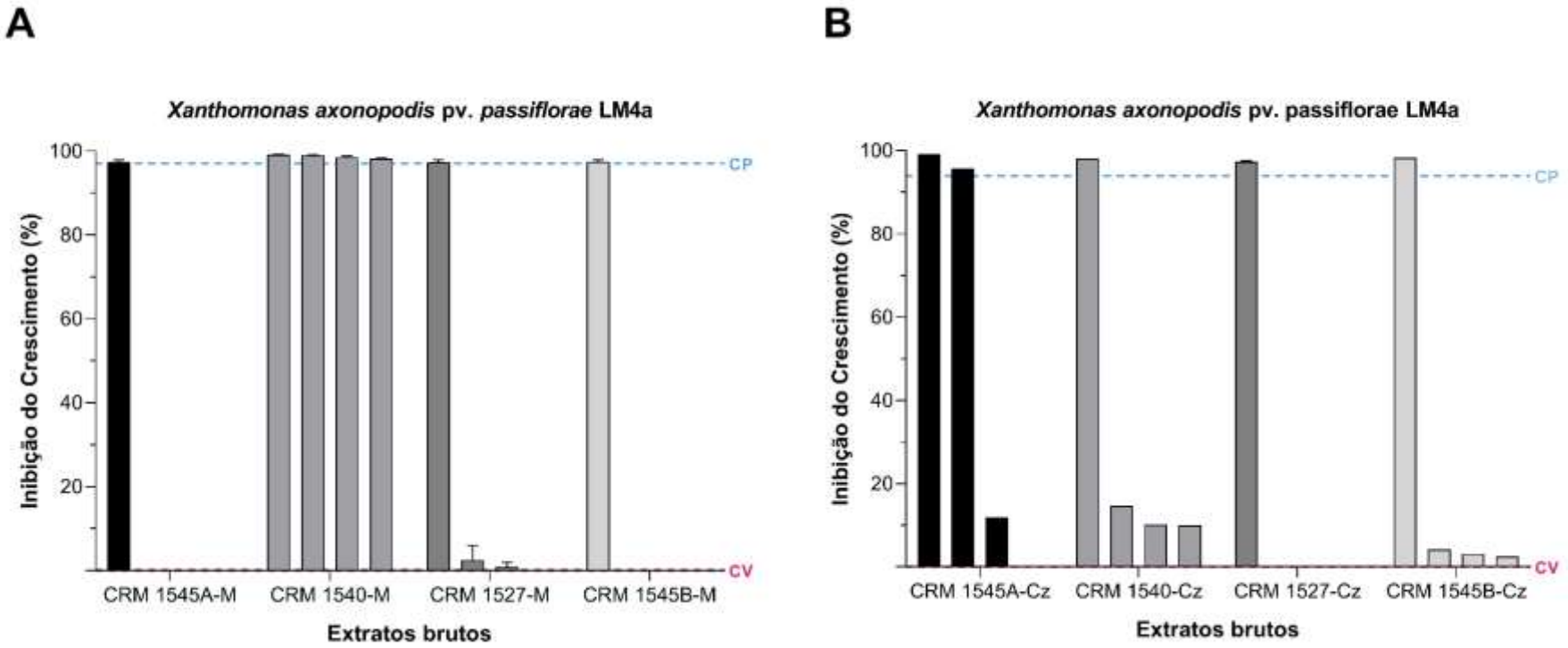
Em Czapek a ação inibitória em *X. passiflorae* do extrato de *Penicillium* sp. CRM 1540 foi reduzida em relação ao extrato de malte e ao observado para *X. citri* (Figura 11B). O extrato em Czapek continuou a inibir o crescimento da bactéria em 98% em 3000 µg/mL, porém nas demais concentrações a inibição foi menor que 14,62% (Figura 11B).

Em teste antibacteriano contra *X. passiflorae* os extratos CRM 1545A-M, CRM 1527-M e CRM 1545B-M apresentaram atividade inibitória apenas na concentração de 3000 µg/mL com 97,42%, 97,39% e 97,42%, respectivamente (Figura 11A). Em contraste, o extrato de *Penicillium* sp. CRM 1545A produzido em Czapek apresentou atividade contra *X. passiflorae* nas concentrações de 3000 µg/mL (99,19%), 1500 µg/mL (95,74%) e em 750 µg/mL (11,83%). Os extratos CRM 1527-Cz e CRM 1545B-Cz apresentaram resultados semelhantes aos detectados para seus respectivos extratos em Malte 2%, com inibição observada apenas em 3000 µg/mL (Figura 11B).

Os extratos também foram avaliados quanto à sua atividade contra *X. campestris* ACM 477 (Figura 12). Dentre os extratos produzidos em Malte 2%, apenas CRM 1545A-M e CRM 1527-M, ambos em 3000 µg/mL, inibiram o crescimento de *X. campestris* em 61,55% e 51,64%, respectivamente (Figura 12A).

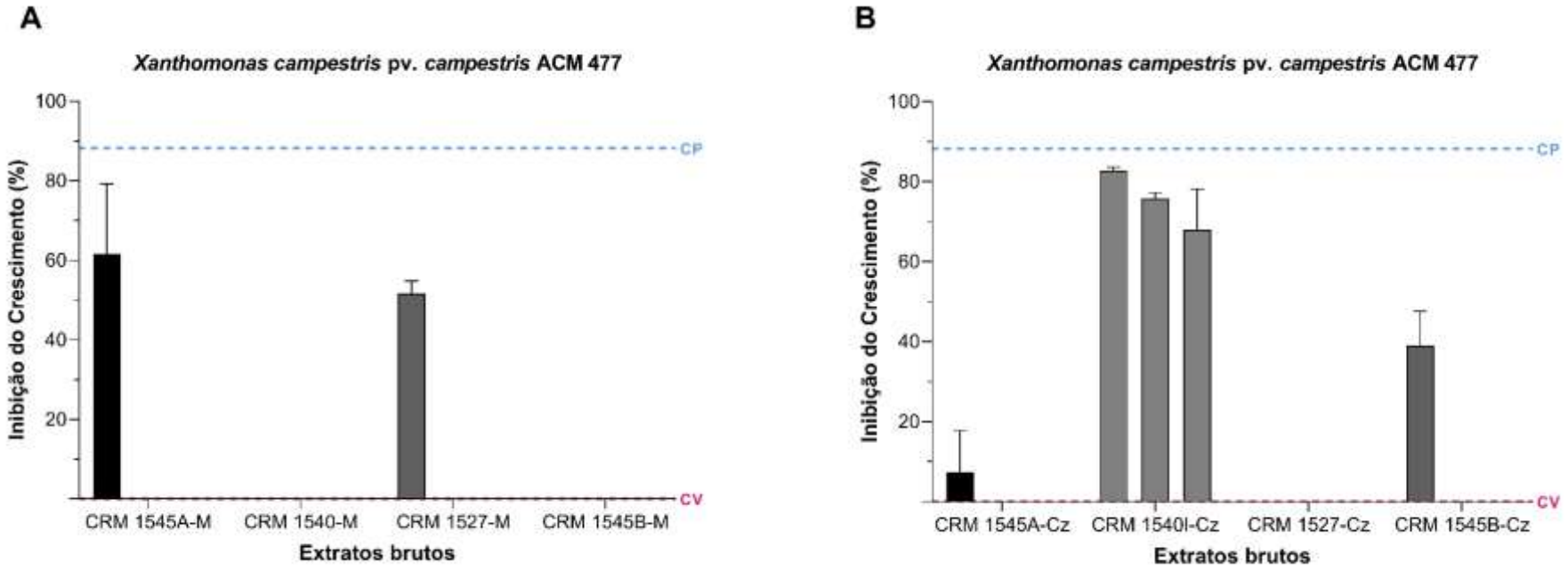
O extrato CRM 1540-Cz novamente se destacou, inibindo em 82,65% o crescimento bacteriano em 3000 µg/mL. Com a diminuição da concentração desse extrato, observou-se queda na inibição, que foi de 75,76 em 1500 µg/mL e 67,92 em 750 µg/mL. Uma inibição de 38,95% foi observada para o extrato CRM 1545B-Cz e de 7,32% para CRM 1545A-Cz em 3000 µg/mL (Figura 12B).

Figura 11. Potencial inibitório *in vitro* de extratos contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* linhagem LM4a.



(**A**): Extratos produzidos em meio Malte 2%. (**B**): Extratos produzidos em meio Czapek. Concentrações avaliadas: 3000, 1500, 750 e 375 µg/mL. Controle positivo (CP): canamicina 20 µg/mL; Controle de veículo (CV): Dimetilsulfóxido 1% (v/v em água).

Figura 12. Potencial inibitório *in vitro* de extratos contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* linhagem ACM477.



(**A**): Extratos produzidos em meio Malte 2%. (**B**): Extratos produzidos em meio Czapek. Concentrações avaliadas: 3000, 1500, 750 e 375 µg/mL. Controle positivo (CP): rifampicina 50 µg/mL; Controle de veículo (CV): Dimetilsulfóxido 1% (v/v em água).

A literatura aponta que a atividade biológica contra bactérias Gram-negativas registrada por fungos de regiões marinhas da Antártica é maior do que a observada em outros sistemas. A zona microbiana bentônica antártica é dominada por bactérias Gram-negativas e povoada também por leveduras psicrofílicas e psicrotolerantes (BRUNATI *et al.*, 2009). Assim, é possível uma vantagem competitiva para sobrevivência sob condições extremas esteja ligada a capacidade metabólica de inibir o crescimento desses competidores.

A produção de compostos fúngicos ativos ocorre durante a fase estacionária do desenvolvimento microbiano, e é influenciada pelas condições de cultivo. Por isso a manipulação de variáveis como nutrientes disponíveis, tempo de incubação, pH, temperatura e tipo de cultivo (submerso ou de superfície) é uma estratégia comum para otimização do rendimento de uma determinada molécula e para explorar a diversidade metabólica de um isolado (DEMAIN, 2000; ELIAS *et al.*, 2006; GADEN, 1959).

O meio de cultivo utilizado não apenas tem efeito no crescimento do microrganismo, mas também no metabolismo do mesmo, o que resulta na produção de metabólitos secundários variados (PAN *et al*., 2019; RUIZ *et al*., 2010) A fonte de carbono é a base para a construção da biomassa e é a fonte de energia para os heterotróficos, assim como a origem das unidades de carbono dos metabólitos secundários.

O nitrogênio disponibilizado, por sua vez, é necessário para a síntese de proteínas essenciais e dos ácidos nucleicos, e consiste na fonte das unidades de nitrogênio para os metabólitos secundários. Por isso, ambos desempenham um papel importante no metabolismo microbiano (RUIZ *et al.*, 2010; SINGH *et al*., 2017). Por isso, microrganismos cultivados em meios com diferentes constituintes podem exibir diferentes rotas metabólicas e expressarem conjuntos específicos de genes de biossíntese, levando a detecção de metabólitos especializados (MA *et al.*, 2009).

Uchoa *et al.* (2017) relaram a produção de um novo derivado de éster furano por uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada de sedimentos no Brasil quando cultivado em meio líquido de malte, peptona e dextrose. O novo composto apresentou citotoxicidade contra células HCT-116 e não foi detectado no cultivo com meio PDB ou PDBY (PDB suplementado com extrato de levedura). *Cladosporium*

sphaerospermum 2005-01-E3 cultivado em arroz produziu cinco novos policetídeos, e quando cultivado em farinha de soja, dois novos policetídeos híbridos foram detectados (WU *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2015).

Portanto, as atividades inibitórias variadas apresentadas pelos extratos provenientes de meios de cultivo com composição diferentes são reflexo das rotas metabólicas ativadas pelos isolados conforme os nutrientes disponíveis e as alterações que ocorrem no meio durante a etapa de desenvolvimento dos microrganismos, que precede a fase de produção de metabólitos secundários.

3.3. Análise do perfil cromatográfico dos extratos brutos

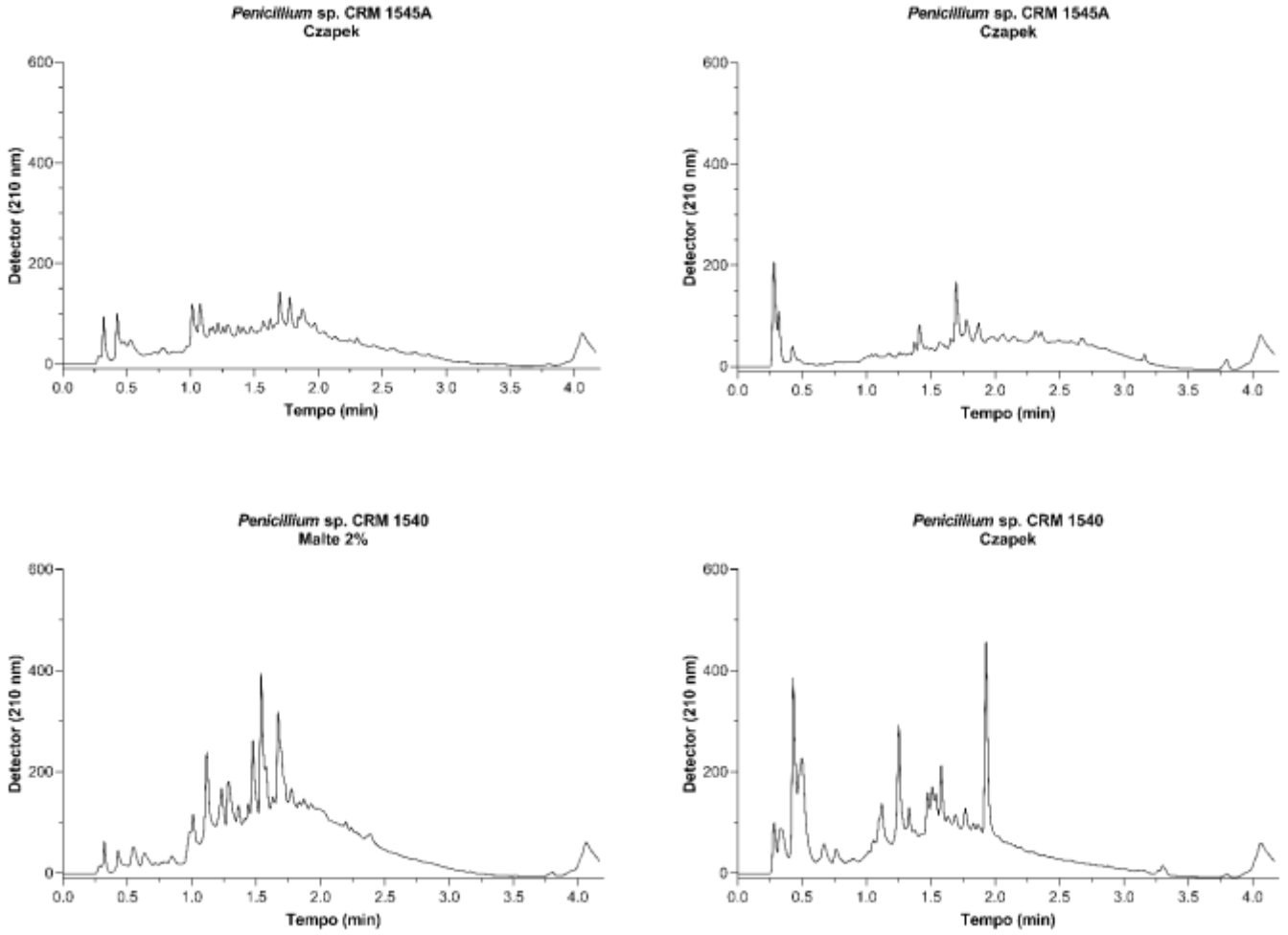
As espécies do gênero *Penicilliium* são conhecidas por sua habilidade em produzir compostos bioativos e por seu metabolismo ativo, porém um número pequeno de linhagens da região antártica foram profundamente estudados (OGAKI *et al.*, 2020).

Em estudo recente, Antipova *et al*. (2018) estudaram os metabólitos produzidos por 25 linhagens de *Penicillium*, dentre os quais se encontravam isolados de solos em alta latitude da Antártica. De acordo com os resultados, 80% dos metabólitos secundários produzidos pertenciam aos grupos dos alcalóides como anacina, ciclopenina, viridicatina, aurantiamina, comunesina B, fumigaclavinas e ácido ciclopiazônico, policetídeos como o ácido micofenólico e a citroviridina, terpenos como as andrastinas A e B e a femenona.

Em relação a membros desse grupo provenientes de amostras marinhas, Ogaki *et al*. (2020) detectaram *Penicillium allii-sativi* e *P. chrysogenum*, produtores de penicilina em amostras profundas de sedimentos marinhos. *P. allii-sativi* produz ainda, atlantinona A, crisogenamida, roquefortine C e D, meleagrina, verrucosidina e outros compostos, dos quais muitos ainda não foram caracterizados.

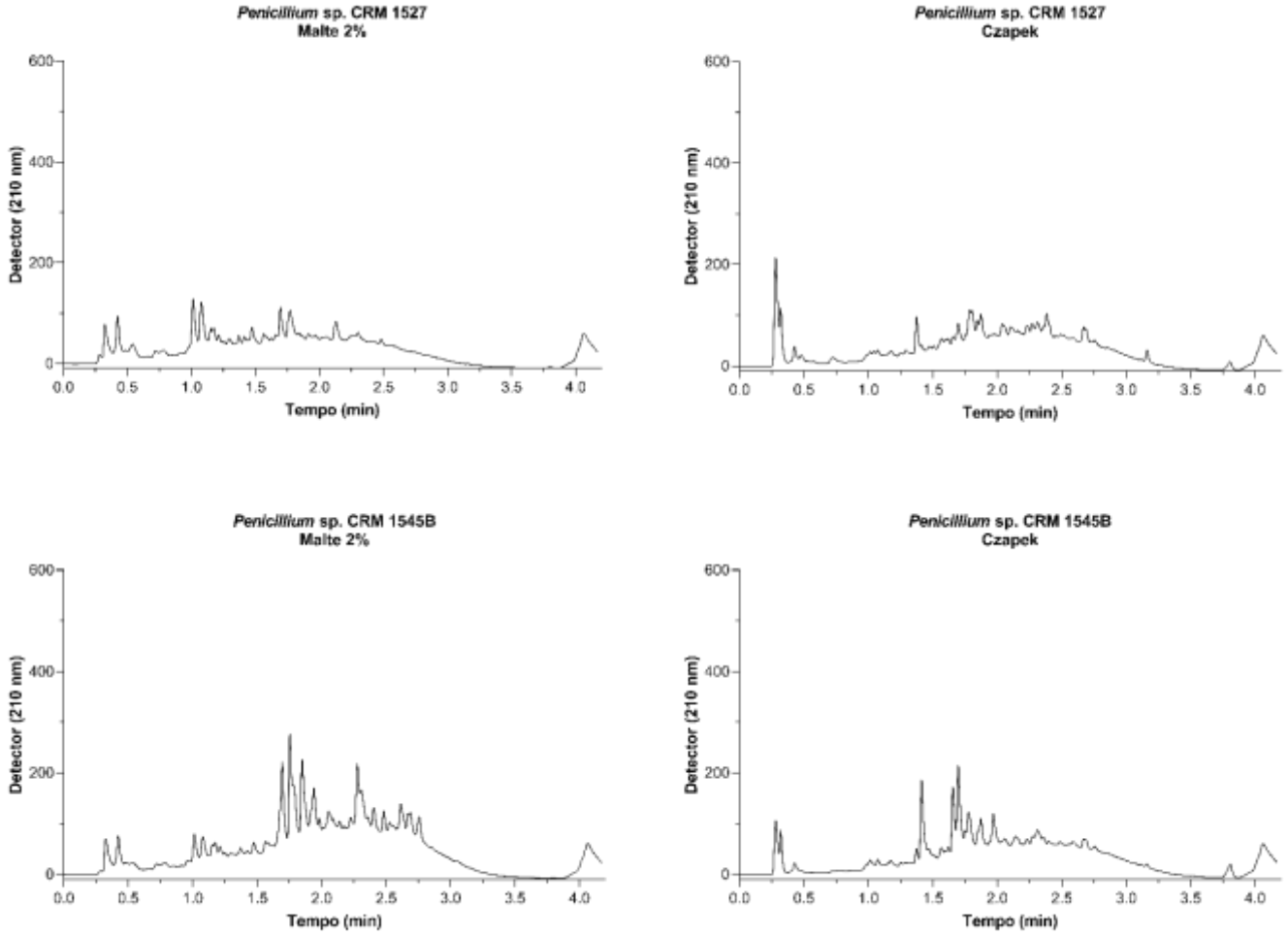
Os extratos avaliados em nosso estudo foram produzidos por membros do gênero *Penicillium*, e entre esses isolados foi possível observar qualitativamente a produção de diferentes compostos (Figuras 13 e 14).

Figura 13. Metabólitos secundários produzidos em meio Malte 2% e Czapek



Cromatogramas obtidos por análise de UPLC em comprimento de onda de 210 nm dos extratos de *Penicillium* sp. CRM 1545A e CRM 1540.

Figura 14. Metabólitos secundários produzidos em meio Malte 2% e Czapek.



Cromatogramas obtidos por análise de UPLC em comprimento de onda de 210 nm dos extratos de *Penicillium* sp. CRM 1527 e CRM 1545B.

A diferença entre as intensidades observadas e a presença ou ausência de determinados compostos produzidos pode ser interespecífica ou intraespecífica, no entanto, esse esclarecemimento depende da identificação das espécies dos fungos isolados.

Esse fenômeno foi observado em estudos anteriores com isolados distintos de *Penicillium allii-sativi*, *P. chrysogenum*, *P. palitans*, *P. solitum* e outras espécies por Godinho *et al.* (2013; 2015). Esses isolados apresentaram atividades biológicas diferentes, demonstrando variações genéticas e metabólicas intraespecíficas em sua capacidade de produção de compostos ativos

Linhagens de *P. chrysogenum* isolados da Antártica também foram descritos como produtores bis-antraquinonas bioativas com atividade antibacteriana seletiva em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* (BRUNATI *et al.*, 2009). De acordo com Godinho *et al.* (2013), o extrato de *P. chrysogenum* também apresentou atividade tripanocida e antifúngica seletiva.

Além disso, os extratos apresentaram perfis divergentes quando produzidos em diferentes meios. Em alguns casos, é possível observar uma mudança de intensidade dos sinais detectados durante a análise cromatográfica, em outros a ausência ou presença de sinais dentro do mesmo intervalo de tempo (Figuras 13 e 14). Esse resultado era esperado, uma vez ser comum a alteração de metabólitos produzidos por fungos quando ocorre mudança nos nutrientes disponíveis para seu desenvolvimento e considerando a variação na atividade antibacteriana detectada para cada extrato.

Os mecanismos regulatórios de formação dos metabólitos são afetados pelas mudanças do ambiente que envolvem os microrganismos (ANTIPOVA; ZHELIFONOVA; KOZLOVSKY, 2015). O efeito das condições de cultivo na produção de um composto são estudados a partir da seleção de linhagens de interesse, uma vez que metabólitos secundários são produzidos em pequenas quantidades pelos microrganismos (DEMAIN, 2000). A produção de alcalóides de ergot e quinocitrininas por *Penicillium citrinum*, por exemplo, é diretamente dependente da concentração da fonte de carbono no meio de cultivo entre outros fatores (ANTIPOVA; ZHELIFONOVA; KOZLOVSKY, 2015) pois a produção de metabólitos secundários está associada com a adaptação dos produtores ao ambiente, causando mudança no perfil dos metabólitos produzidos em resposta a variação da composição do meio.

Diferentes concentrações de sais também causam mudanças nos metabólitos secundários produzidos por *Penicillium* sp. Zain *et al.* (2011*)* relatam alterações nos compostos produzidos por *P. janthinellum* e *P. duclauxii* na presença de concentrações variadas de nitrato de cádmio, cloreto de sódio e sacarose. Penitrem, micotoxinas índole-diterpenóides são sintetizadas por indivíduos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. A suplementação de meio de cultivo com glicose (50 g/L) induziu a biossíntese dessas moléculas por *P. crustosum*,e o uso de glutamato como fonte de nitrogênio teve efeito no aumento da produção desse metabólito, enquanto concentrações elevadas de NaCl inibiram a biossíntese dos compostos dessa classe (KALININA *et al.*, 2017).

3.4. Fracionamento dos extratos brutos

As frações dos extratos secos CRM1545A-M (222,20 mg), CRM 1540-M (363,90 mg), CRM 1540-Cz (326,90 mg) e CRM 1545B-Cz (125,60 mg) foram coletadas entre 4 e 25 min em intervalos de aproximadamente 0,6 minutos como apresentado nas Figuras 15-18. Foram realizadas cerca de 5 corridas por extrato.

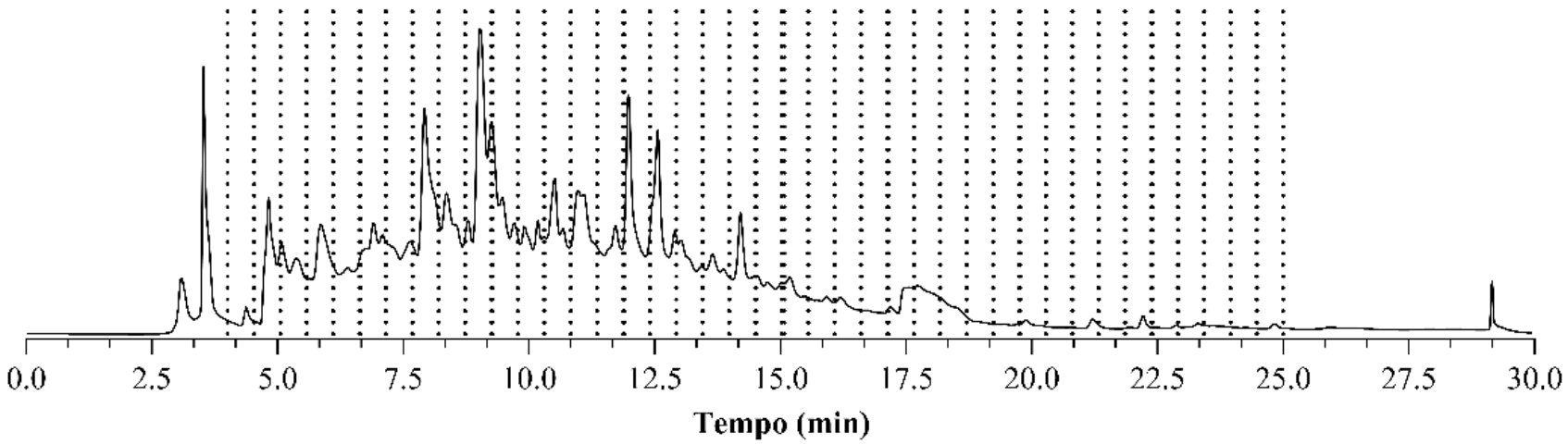
Frações com mesmo tempo de retenção e similaridade após análise em sistema UPLC foram agrupadas. Ao final, foram obtidas 40 frações para cada extrato fracionado, que foram então selecionadas para análises de elucidação estrutural e atividade antimicrobiana.

Um grande número de compostos pôde ser fracionado em um curto período de tempo devido ao método de separação por cromatografia utilizado. A coluna de fase reversa C8 em conjunto com o gradiente de acetonitrila com água (10-100%) utilizados permitiram a eluição de compostos mais polares no início da corrida, seguidos dos de menor polaridade. A presença de TFA 0,01% como constante isocrática durante todo o processo também auxiliou na resolução do fracionamento.

A análise de cromatografia de alta eficiência é uma das maiores ferramentas analíticas para a identificação dos componentes de misturas como é o caso de extratos de fungos filamentosos (AKPOTU *et al.*, 2017). A partir dessa técnica, muitas classes de compostos já foram isoladas, como glicopeptídeos, macrolídeos, penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, tetraciclinas e outros antibióticos, o que consolidou esse método na busca por compostos ativos.

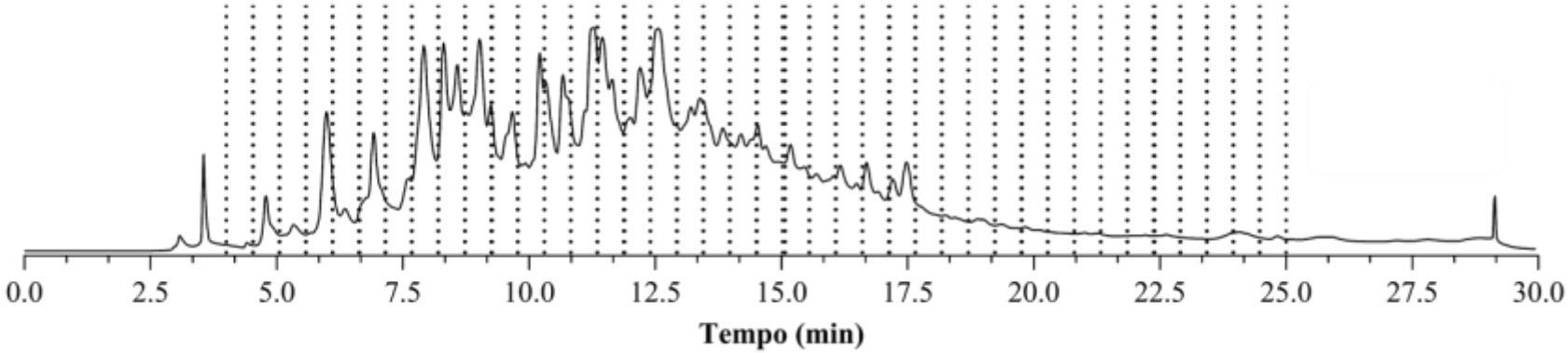
Ainda assim, o uso dessa técnica tem seus limites, uma vez que apenas compostos que absorvem nos comprimentos de onda dos detectores podem ser observados. Por isso, é possível outros compostos ativos também estejam presentes nos extratos analisados. A razão do emprego dessa técnica no fracionamento está ligada a sua alta especificidade, sensibilidade e ao tempo de análise requerido (ITOH; YAMADA, 2000).

Figura 15. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento do extrato produzido por *Penicillium* sp. CRM 1545A em meio Malte 2%.



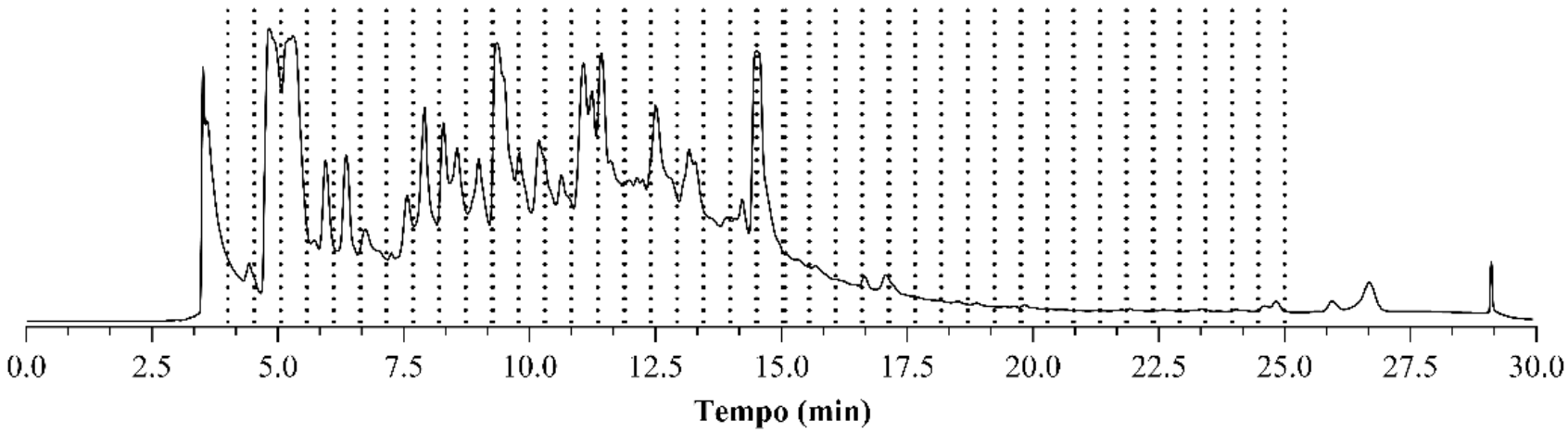
Cromatograma obtido do fracionamento em coluna preparativa de fase reversa C8 (Phenomenex Luna 21.2 mm x 25 cm x 7 µM) e eluição gradiente (10-100% MeCN/H_2O com 0,01% TFA). Frações coletadas automaticamente em intervalos de aproximadamente 0,6 min. A linha pontilhada separa as frações.

Figura 16. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Malte 2%.



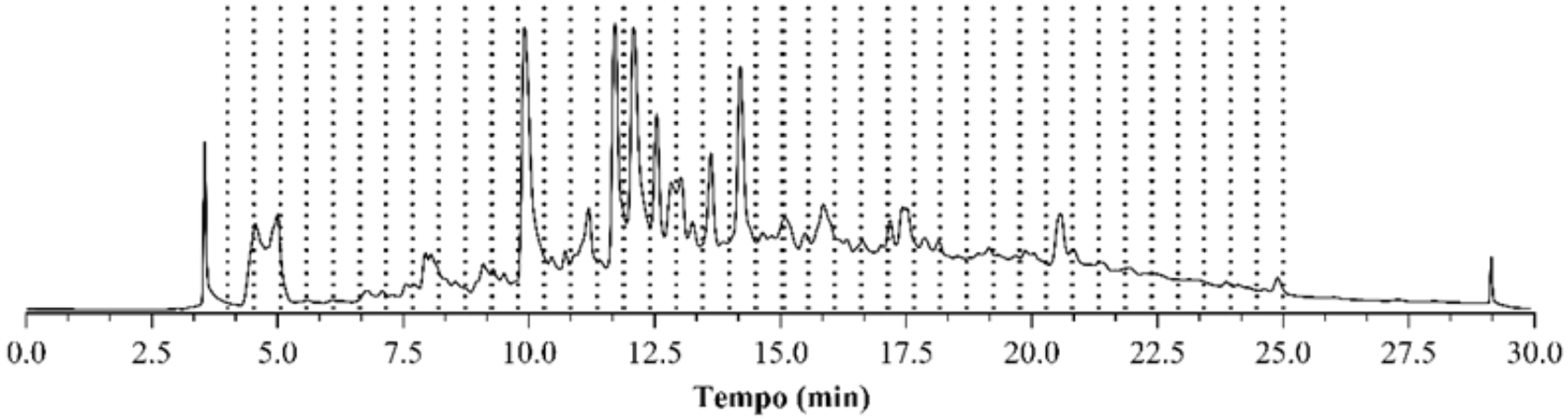
Cromatograma obtido do fracionamento em coluna preparativa de fase reversa C8 (Phenomenex Luna 21.2 mm x 25 cm x 7 µM) e eluição gradiente (10-100% MeCN/H_2O com 0,01% TFA). Frações coletadas automaticamente em intervalos de aproximadamente 0,6 min. A linha pontilhada separa as frações.

Figura 17. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Czapek.



Cromatograma obtido do fracionamento em coluna preparativa de fase reversa C8 (Phenomenex Luna 21.2 mm x 25 cm x 7 µM) e eluição gradiente (10-100% MeCN/H_2O com 0,01% TFA). Frações coletadas automaticamente em intervalos de aproximadamente 0,6 min. A linha pontilhada separa as frações.

Figura 18. Cromatograma DAD-UV em 210 nm do fracionamento dos extratos produzidos por *Penicillium* sp. CRM 1545B em meio Czapek



Cromatograma obtido do fracionamento em coluna preparativa de fase reversa C8 (Phenomenex Luna 21.2 mm x 25 cm x 7 µM) e eluição gradiente (10-100% MeCN/H_2O com 0,01% TFA). Frações coletadas automaticamente em intervalos de aproximadamente 0,6 min. A linha pontilhada separa as frações.

4 CONCLUSÃO

O ecossistema da Antártica oferece uma oportunidade única para a descoberta de fungos de interesse biotecnológico, o os sedimentos marinhos na região representam um ambiente ainda inexplorado até o momento em relação a outros habitats.

Em especial, as linhagens do gênero *Penicillium* tem constantemente mostrado seu potencial para sobreviver sob condições extremas de temperatura, pressão, disponibilidade de oxigênio e alterações de salinidade. Esses isolados apresentam um enorme potencial bioquímico, que pode ser explorado em diversas condições de cultivo para a produção de metabólitos secundários ativos e de interesse para uso na agricultura como compostos de baixa toxicidade, promotores do crescimento e com atividade antimicrobiana contra fitopatógenos.

A fonte de carbono e nitrogênio disponível durante a fase de desenvolvimentos dos fungos tem papel importante também em quais metabólitos secundários serão produzidos na fase estacionária.

O meio Czapek, de onde os extratos ativos foram mais abundantes é constituído de diversos sais, em contraste com os meios Malte 2% e PDB.O ambiente marinho da Antártica é rico em sais como o NaCl, assim, explorar meios de cultivo com diferentes concentrações de sais minerais e com diferentes constituições dos mesmos pode levar à produção de outros metabólitos secundários ativos e melhorar a atividade antimicrobiana dos isolados fúngicos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPOTU, M. O.; EZE, P. M.; ABBA, C. C.; UMEOKOLI, B. O. *et al.* Antimicrobial activities of secondary metabolites of endophytic fungi isolated from Catharanthus roseus. **Journal of Health Sciences**, 7, n. 1, p. 15-22, 2017-04-04 2017.

ANTIPOVA, T. V.; ZHELIFONOVA, V. P.; BASKUNOV, B. P.; KOCHKINA, G. A. *et al.* Exometabolites the Penicillium Fungi Isolated from Various High-Latitude Ecosystems. **Microbiology**, 87, n. 5, p. 642-651, 2018-09-01 2018.

ANTIPOVA, T. V.; ZHELIFONOVA, V. P.; KOZLOVSKY, A. G. Effect of cultivation conditions on production of secondary metabolites by Penicillium citrinum. **Microbiology**, 84, n. 3, p. 365-369, 2015-05-01 2015.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I. *et al.* Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine genomics**, 2, n. 1, p. 43-50, 2009.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 18, n. 1, p. 26-31, 2000/01/01/ 2000.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; DE ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by Penicillium verrucosum Dierck. **Microbiological Research**, 161, n. 3, p. 273-280, 2006/07/03/ 2006.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; STOYANOVA, M.; AVRAMOVA, H.; PAVLOVA, Y. *et al.* Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 28, n. 4, p. 721-727, 2014-07-04 2014.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; VANCHEVA, T.; BADZHINEROV, N.; KOLEVA, V. *et al.* Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. **Annuaire de l'Université de Sofia "St Kliment Ohridski" Faculte de Biologie**, 100, n. 4, p. 216-222, 2015.

FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M. *et al.* Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, 67, n. 4, p. 775-787, 2014-05-01 2014.

GADEN, E. L. Fermentation process kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, 1, n. 4, p. 413-429, 1959-12-01 1959.

GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M. *et al.* Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME Journal**, 7, n. 7, p. 1434-1451, 2013-07-01 2013.

GODINHO, V. M.; GONCALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M. *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, 19, n. 3, p. 585-596, May 2015.

GONCALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, 38, n. 8, p. 1143-1152, Aug 2015.

HENRIQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A. *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 30, n. 1, p. 65-76, Jan 2014.

ITOH, T.; YAMADA, H. ANTIBIOTICS | Liquid Chromatography. *In*: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. Oxford: Academic Press, 2000. p. 2067-2077.

KALININA, S. A.; JAGELS, A.; CRAMER, B.; GEISEN, R. *et al.* Influence of Environmental Factors on the Production of Penitrems A–F by Penicillium crustosum. **Toxins**, 9, n. 7, p. 210, 2017-07-01 2017.

MA, L.; XING, D.; WANG, H.; WANG, X. *et al.* Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganism. **Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology**, 25, n. 1, p. 55-59, 2009.

NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. 2005.

OGAKI, M. B.; TEIXEIRA, D. R.; VIEIRA, R.; LIRIO, J. M. *et al.* Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biology**, 124, n. 6, p. 601-611, Jun 2020.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H. *et al.* Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. **Frontiers in Microbiology**, 10, p. 294, 2019. 10.3389/fmicb.2019.00294.

PIKUTA, E. V.; HOOVER, R. B.; TANG, J. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. **Critical Reviews in Microbiology**, 33, n. 3, p. 183-209, 2007-01-01 2007.

PURIĆ, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L. B.; SETTE, L. D. *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, 66, n. 6, p. 530-536, 2018-06-01 2018.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C. *et al.* Genomes-based phylogeny of the genus Xanthomonas. **BMC Microbiology**, 12, n. 1, p. 43, 2012-12-01 2012.

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y. *et al.* Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, 36, n. 2, p. 146-167, 2010-05-01 2010.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B. *et al.* Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 5, p. 344-355, 2011-05-01 2011.

SILBER, J.; OHLENDORF, B.; LABES, A.; ERHARD, A. *et al.* Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a Calcarisporium Strain. **Marine Drugs**, 11, n. 9, p. 3309-3323, 2013-08-29 2013.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S. *et al.* Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against Xanthomonas citri subsp. citri. **Journal of Bacteriology**, 195, n. 1, p. 85-94, 2013/01/01 2013.

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A. *et al.* Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. **Frontiers in microbiology**, 7, p. 2087, 2017.

SVAHN, K. S.; CHRYSSANTHOU, E.; OLSEN, B.; BOHLIN, L. *et al.* Penicillium nalgiovense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. **Fungal Biology and Biotechnology**, 2, n. 1, 2015-12-01 2015.

TIAN, Y.; LI, Y.-L.; ZHAO, F.-C. Secondary Metabolites from Polar Organisms. **Marine Drugs**, 15, n. 3, p. 28, 2017-02-23 2017.

UCHOA, P. K. S.; PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; DE OLIVEIRA, M. D. C. F. *et al.* New cytotoxic furan from the marine sediment-derived fungi Aspergillus niger. **Natural Product Research**, 31, n. 22, p. 2599-2603, 2017-11-17 2017.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORAO, L. G.; DOS SANTOS, J. A. *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against Xanthomonas citri subsp citri. **Letters in Applied Microbiology**, 67, n. 1, p. 64-71, Jul 2018.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, 12, n. 3, p. 374-385, 2000-09-01 2000.

WENTZEL, L. C. P.; INFORSATO, F. J.; MONTOYA, Q. V.; ROSSIN, B. G. *et al.* Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial Ecology**, 77, n. 1, p. 12-24, 2019-01-01 2019.

WU, G.; SUN, X.; YU, G.; WANG, W. *et al.* Cladosins A–E, hybrid polyketides from a deep-sea-derived fungus, Cladosporium sphaerospermum. **Journal of natural products**, 77, n. 2, p. 270-275, 2014.

YU, G.-H.; WU, G.-W.; ZHU, T.-J.; GU, Q.-Q. *et al.* Cladosins F and G, two new hybrid polyketides from the deep-sea-derived Cladosporium sphaerospermum 2005-01-E3. **Journal of Asian natural products research**, 17, n. 2, p. 120-124, 2015.

ZAIN, M. E.; EL-SHEIKH, H. H.; SOLIMAN, H. G.; KHALIL, A. M. Effect of certain chemical compounds on secondary metabolites of Penicillium janthinellum and P. duclauxii. **Journal of Saudi Chemical Society**, 15, n. 3, p. 239-246, 2011/07/01/ 2011.

CAPÍTULO 2

ISOLATION AND AGRICULTURAL POTENTIAL OF PENICILLIC ACID AGAISNT CITRUS CANKER

ARTIGO PUBLICADO EM "*JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY"*,

DOI: 10.1111/jam.15413

RESUMO

O controle de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), agente causal do cancro cítrico, depende fortemente de práticas agrícolas integradas que envolvem o uso de produtos químicos à base de cobre. Considerando a necessidade de alternativas para o controle dessa doença e o potencial de fungos extremófilos como produtores de metabólitos bioativos, um composto bioativo produzido pelo isolado de sedimentos marinhos *Penicillium* sp. CRM 1540 foi isolado e identificado. O potencial do composto como agente antibacteriano contra *X. citri* foi avaliado *in vitro* e em experimentos em casa de vegetação. A taxonomia molecular do isolado indica que este fungo é uma possível nova espécie de *Penicillium*. Os resultados revelaram inibição de 90% do crescimento bacteriano à 25 μg mL^{-1} *in vitro* e diminuição da emergência de sintomas *in vivo* em folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. O número de lesões por cm^2 para o tratamento com o composto isolado foi 75,31% menor e significativamente diferente ($p < 0.05$) do controle não tratado. A estrutura do agente ativo foi identificada como ácido penicílico a partir de análise espectroscópica detalhada. Com base nos resultados o uso do ácido penicílico como alternativa contra o cancro cítrico deve ser explorado.

Palavras-chave: Extremófilos; Cancro cítrico; Biotecnologia microbiana; Fitopatógeno; Ácido penicílico.

1 ARTIGO PUBLICADO

O artigo publicado na revista “*Journal of Applied* Microbiology” encontra-se no Apêndice A, O Material Suplementar está disponível no Apêndice B.

1.1. Objetivos

Este artigo compreende os objetivos de *a* até *d* para o extrato obtido do meio metabólico de *Penicillium* sp. CRM 1540 cultivado em Czapek.

a. Fracionar os extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – “*High Pressure Liquid Chromatography*”);
b. Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* das frações;
c. Avaliar a atividade protetiva de frações ativas contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em ensaio em casa de vegetação;
d. Elucidar a estrutura dos compostos ativos por meio de técnicas espectroscópicas como Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS – “*Liquid Chromatography Mass Spectometry*”) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO PENICÍLICO: ENSAIOS COMPLEMENTARES

RESUMO

O ácido penicílico é uma micotoxina produzida por diferentes espécies de fungos, dentre os quais se destacam membros dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Esse composto é um inibidor de quorum sensing (QS), mecanismo de comunicação ligado a fatores de virulência e formação de biofilme em bactérias incluindo *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causador do cancro cítrico. Essa molécula apresenta tautomerismo e sua atividade biológica pode sofrer alterações dependendo do equilíbrio das cadeias carbônicas quando em solução. A atividade antibacteriana *in vitro* de ácido penicílico foi analisada em teste antimicrobiano com resazurina após tratamento do composto com acetonitrila/água contendo 0,01% de ácido trifluoroacético. Esse experimento foi conduzido para verificar se alterações na acidez da solução de PA causariam variação na atividade antibacteriana do composto. Os resultados mostraram um aumento na atividade em *X. citri* após tratamento da amostra com solução levemente acidificada. Considerando a supressão do desenvolvimento de cancro cítrico em 75,31% por AP, composto bioativo isolado do cultivo do isolado CRM 1540 (*Penicillium* sp.) em Czapek, o composto foi submetido a ensaios para estudo do seu efeito sobre as células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Os experimentos revelaram que o composto não age no mecanismo de divisão celular das células bacterianas, porém causa diminuição na produção de biofilme por *X. citri*. O uso de substancias anti-biofilme são de interesse no combate à *X. citri*, uma vez que o estabelecimento e propagação do cancro cítrico no hospedeiro são dependentes da adesão, motilidade, patogenicidade e formação de biofilme da bactéria e AP se mostra uma molécula interessante para este fim.

Palavras-chave: Ácido penicílico; Tautomeria; Biofilme; Atividade antibacteriana; Química.

CHAPTER 3

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PENICILLIC ACID: COMPLEMMENTARY ASSAYS

ABSTRACT

Penicillic acid (PA) is a mycotoxin produced by several fungal species, including members of *Penicillium* and *Aspergillus* genera. This compound is an inhibitor of quorum sensing (QS), a communication mechanism associated to virulence factors and biofilm formation in bacterias, including *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent for citrus canker. This molecule is also tautomeric and its biological activity can suffer modifications depending on the chemical equilibrium of the carbonic chain in solution. The *in vitro* antibacterial activity of penicillic acid was evaluated in antimicrobial assay with resazurin after compound treatment with acetonitrile/water containing 0.01% of trifluoroacetic acid. The experiment was run to verify if changes in acidity of PA solution would induce change in the antibacterial activity of the compound. The results showed an increase in the activity in *X. citri* after treatment of the sample with a lightly acidified solution. Considering the suppression of citrus canker development in 75,31% by PA, a bioactive compound isolated from the culture of strain CRM 1540 (*Penicillium* sp.) in Czapek, the compound was submitted to study assays of its effect in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* bacterial cells. The tests revealed that the compound does not act on the mechanism of cellular division however, it reduces the production of biofilm by *X. citri* The use of anti-biofilm substances are of interest in combating *X. citri*, since the establishment and propagation of citrus canker in the host are dependent on adhesion, motility, pathogenicity and biofilm formation of the bacteria and PA is an interesting molecule for this propose.

Keywords: Penicillic acid; Tautomery; Biofilm; Antibacterial activity; Chemistry.

1 INTRODUÇÃO

O ácido penicílico é uma micotoxina isolada por Alsberg e Black (1913) de *Penicillium puberulum* Bainier. Sua estrutura foi descrita por Birkinshaw *et al.* (1936) após ser isolada de *P. cyclopium* Westling e a atividade bacteriostática desse composto contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi relatada por Oxford (1942) alguns anos depois.

Micotoxinas são um grupo de substâncias químicas de ocorrência natural produzidas por uma grande variedade de fungos filamentosos e mofos. O termo deriva da palavra *mykes*, grego para fungo, e *toxicum*, latim para toxina, e significa "substancia tóxica produzida por um fungo", ao contrário do termo fitotoxina, cujo termo implica em uma substancia tóxica para plantas (BIANCHINI; BULLERMAN, 2014). Esse metabólito é uma micotoxina produzida por diversas linhagens de fungos, com destaque para indivíduos dos gêneros *Aspergillus*, com 23 espécies produtoras, e *Penicillium*, com cerca de 24 espécies relatadas (FRISVAD, 2018).

Quanto a suas características físico-químicas, o ácido penicílico ($C_8H_{10}O_4$) tem massa molecular de 170 g/mol, ponto de fusão de 84º - 87 ºC (desidratado) e é solúvel em água quente, álcool, éter, benzeno, clorofórmio e acetato de etila. O tautomerismo da molécula foi estudado usando espectroscopia de absorção UV e massas, mas em nenhum dos casos equilíbrio entre as formas cíclicas e abertas da cadeia foi adequadamente definido (WILSON, 1976).

O aumento de casos de resistência à antibióticos por bactérias direcionou a atenção de estudos à inibidores de virulência não antibióticos, isto é, a inibição da virulência sem morte da bactéria-alvo (GÖKALSIN; BERBER; SESAL, 2019). O "*quorum sensing*" (QS) é um mecanismo de comunicação celular bacteriano pelo qual a expressão de fatores de virulência, esporulação e formação de biofilmes são regulados. Essa regulação ocorre através da excreção, acúmulo e detecção de moléculas autoindutoras, e o bloqueio desse mecanismo é uma alternativa aos antibióticos que oferece baixo potencial para desenvolvimento de resistência (RIGUEIRAS, 2018).

A inibição do QS é chamada de "*quorum quenching*" (QQ) e tem se tornado foco de estudos em abordagens de antivirulencia. As aplicações de QQ se

concentram no uso de compostos naturais e sintéticos, enzimas e anticorpos para degradar moléculas autoindutoras, bloquear sua produção ou ainda bloquear sua recepção através da adição de compostos que podem mimetizar essas moléculas. (GÖKALSIN; BERBER; SESAL, 2019; TURAN; ENGIN, 2018).

Rasmussen *et al.* (2005) relatam o uso potencial de ácido penicílico, isolado de *P. radicícola,* como metabólitos secundários inibidores de "*quorum sensing*" (QSI) em *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com os dados publicados, 34% dos 300 genes atacados por ácido penicílico eram controlados por QS causando uma repressão de 60% dos genes reguladores de QS, dentre os quais muitos codificavam fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Liaqat *et al.* (2014) observaram efeito inibitório forte de AP em concentração de até 10 µM em uma molécula autoindutora em *Halomonas pacifica*, sem interferência no crescimento bacteriano.

Em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a formação e dispersão de biofilme é modulada pela molécula autoindutora de QS chamada DSF. O autoindutor DSF promove a formação de biofilme pela estimulação da produção de EPS (xantham) e agrupamento de pilus e a sinalização via QS tem papel essencial na etapa de sobrevivência epifítica, sendo fundamental na fase inicial do desenvolvimento da patogenicidade de *X. citri* (CAICEDO; VILLAMIZAR, 2021; GUO; ZHANG; LI; WANG, 2012; SENA-VÉLEZ; REDONDO; GELL; FERRAGUD *et al.*, 2015). Bactérias inibidoras de QS isoladas de folhas de citros susceptíveis ao fitopatógeno, como *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., reduziram a severidade de cancro cítrico em *Citrus sinensis* através da perturbação da rota de DSF em *X. citri*, com efeitos associados à formação de biofilme e adesão bacteriana (CAICEDO; VILLAMIZAR; FERRO; KUPPER *et al.*, 2016).

Recentemente, Picchi *et al.* (2016) relataram *N*-acetilcisteina (NAC) como um composto com propriedade antibacterianas em *X. citri* com interferência na formação de biofilme, na produção de polissacarídeos extracelulares e na adesão da bactéria à superfícies.

Considerando nossos estudos que revelaram a capacidade de ácido penicílico em diminuir a incidência de sintomas de cancro cítrico em mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (VIEIRA *et al.*, 2022) e a atividade de inibição de QS associada a formação de biofilmes por esse composto, bem como a associação da patogenicidade de *X. citri* com sua capacidade de produção de biofilme, um estudo aprofundado da atividade antibacteriana de ácido penicíclico e seu mecanismo de

ação em células bacterianos é essencial para compreensão do verdadeiro potencial do uso viável desse composto na agricultura.

1.1. Objetivos

a. Realizar ensaios complementares com ácido penicílico para comparação da ação antibacteriana em células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* quando em meio levemente acidificado;
b. Realizar ensaio de microscopia e de atividade anti-biofilme para determinar o modo de ação do composto quando em contato com células do fitopatógeno *in vitro*.

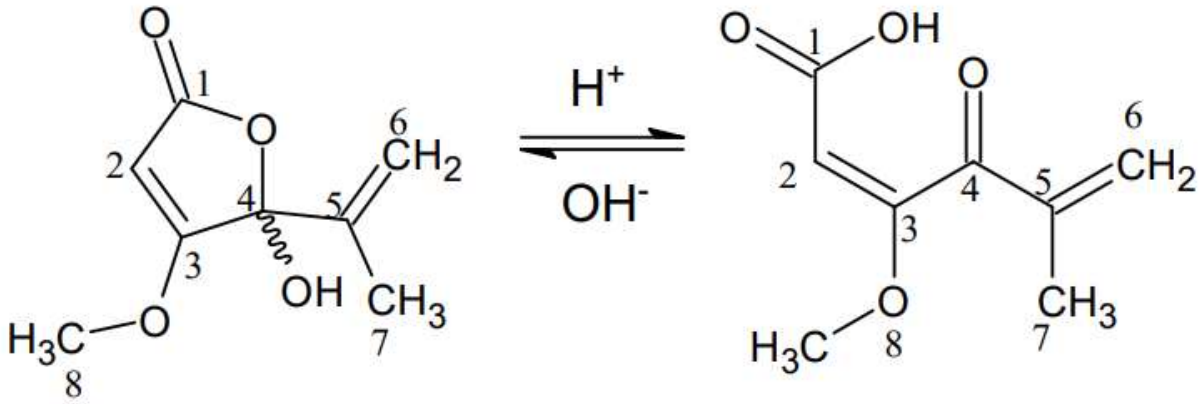
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ensaios de atividade antibacteriana do ácido penicílico

O ácido penicílico (AP) apresenta tautomeria, ou seja, apresenta-se como dois isômeros em equilíbrio químico conforme apresentado na Figura 19. Em meio ácido o equilíbrio é favorecido na formação do isômero de cadeia aberta, já em meio básico a formação do anel lactônico é favorecida.

Durante o processo de purificação do ácido penicílico, produzido do extrato do fungo *Penicillium* sp. CRM 1540, as duas etapas de purificação por cromatografia utilizaram solventes contendo 0,01% de TFA. O uso de um solvente ligeiramente ácido provavelmente promove o deslocamento do equilíbrio químico para a formação de uma maior quantidade do composto de cadeia aberta, por isso uma investigação da influência do equilíbrio químico de AP em sua ação antibacteriana foi conduzido.

Figura 19. Tautomeria do ácido penicílico.



Fonte: A Autora. ACD/Chemsketch

Para tal, a ação antibacteriana em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) de ácido penicílico produzido e isolado de extrato orgânico do fungo *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Czapek foi comparada com a atividade de ácido penicílico padrão comercialmente disponível e submetido a dois tratamentos.

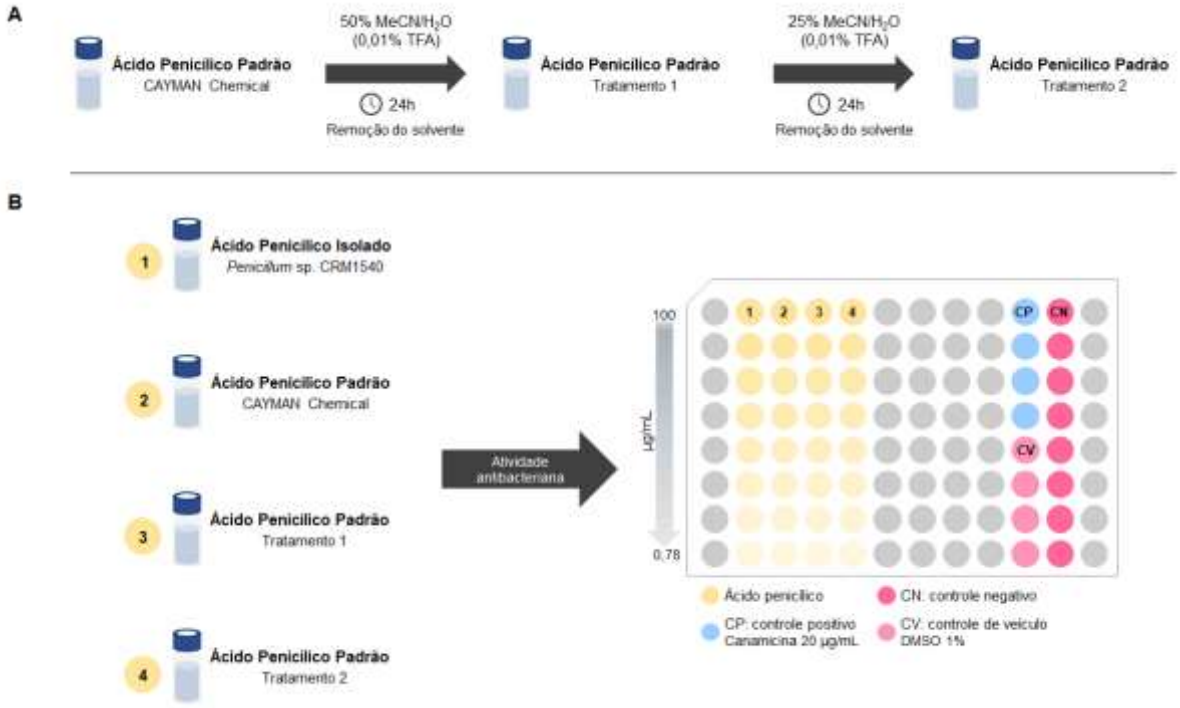
Uma solução estoque de AP padrão (CAS 90-65-3, CAYMAN Chemical, 98%) à 10 mg/mL em dimetilsulfóxido 100% (DMSO) foi preparada para testes de atividade antibacteriana contra *X. citri*. A solução foi diluída para 100 µg/mL em meio NYG e avaliada em teste REMA (Resazurin Microtiter Assay) conforme descrito em (VIEIRA *et al.*, 2018) com 8 diluições. A atividade de AP padrão não tratado foi comparado com a atividade encontrada pelo composto isolado de *Penicillium* sp. CRM 1540.

Em seguida AP padrão foi seco e submetido a tratamentos com os solventes de purificação empregados no fracionamento do ácido penicílico isolado por nosso grupo. O **Tratamento 1** foi realizado com 50% de acetonitrila (MeCN) em água (v/v) contendo 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA), que é a concentração do solvente no momento da eluição da fração impura contendo AP do extrato bruto CRM 1540-Cz. O composto permaneceu em contato com o solvente por 24h que foi então removido em concentrador de amostras. A amostra foi dissolvida em DMSO 100% para 10 mg/mL, diluída em meio NYG para 100 µg/mL e novamente avaliada.

Na terceira fase do experimento o ácido penicílico tratado com 50% MeCN foi seco e tratado com 25% de MeCN em água (v/v) contendo 0,01% de TFA (**Tratamento 2**), concentração do solvente em que AP foi eluído na corrida em coluna semi-preparativa Fenil (VIEIRA *et al.*, 2022). Após 24h de contato com a molécula, o solvente foi removido e a amostra dissolvida em DMSO 100% para 10 mg/mL e submetida ao teste de atividade na concentração de 100 µg/mL em meio NYG novamente.

A Figura 20 apresenta os tratamentos do ácido penicílico padrão e as amostras utilizadas no teste antibacteriano. Todos os resultados obtidos foram comparados com a inibição apresentada pelo ácido penicílico isolado do fungo de sedimentos marinhos *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Czapek.

Figura 20. Esquema de tratamento do ácido penicílico



(**A**): Tratamento de ácido penicílico padrão (CAYMAN Chemical) em meio levemente acidificado. MeCN: acetonitrila. H_2O: água ultrapura. TFA: ácido trifluoroacético. (**B**): Disposição das amostras de ácido penicílico em microplaca de 96 poços para ensaio *in vitro* de atividade antibacteriana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Amostras 1 a 4 – ácido penicílico. CP – Controle positivo canamicina (20 µg/mL). CN – Controle negativo bactéria. CV – Controle de veículo DMSO 1%.

2.2. Microscopia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de AP

As análises de microscopia foram realizadas com AP após Tratamento 2 descrito no item 2.1.. O efeito do ácido penicílico na sobrevivência de *X. citri* foi estudado através do teste de expressão de GFP ("*green fluorescente protein*") após 15 e 30 min de exposição das células bacterianas ao composto a 50 µg/mL. O experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Henrique Ferreira e demonstra a capacidade do composto em inibir ou afetar a divisão celular do fitopatógeno.

Células de *X. citri amy*::pGCD21-GFP-*zapA* foram incubadas com NYG por 16 horas a 30ºC (200 rpm) em seguida o inóculo foi ajustado para a OD_{600} de 0,1. Para a expressão da fusão GFP-*zapA* foi adicionado arabinose na concentração final de 0,01% quando o inóculo atingiu a OD_{600} 0,3 e em seguida o inóculo foi incubado por

uma hora. Após incubação o inóculo foi diluído 1:10 em tubo de 2 mL e o ácido penicílico (50 µg/mL) foi adicionado ao tubo.

A microscopia foi realizada após dois intervalos de tratamento: 15 min e 30 min. Após o período de tratamento 1 mL de salina (NaCl 0,85%) foi adicionado aos tubos para inibir a ação do composto e os tubos foram centrifugados por 2 min a 6000 x*g*. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com salina (NaCl 0,85%) utilizando os mesmos parâmetros de centrifugação. Em seguida 5 µL de células foram transferidos para lâminas contendo uma fina camada de agarose 1% em solução salina (NaCl 0,85%) (MARTINS *et al.*, 2010).

Para análise de microscopia foi utilizado um Microscópio BX-61 Olympus de fluorescência equipado com câmera monocromática OrcaFlash 2.8 (Hamamatsu). A captura e o processamentos das imagens foi realizada com o *software* CellSens Dimension (Olympus).

2.3. Atividade anti-biofilme de AP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O efeito do ácido penicílico em *X. citri* foi avaliado em placa de 24 poços usando método Cristal Violeta (CV) para quantificação de desenvolvimento de biofilme em superfície abiótica (MALAMUD *et al.*, 2011) na presença do composto em três concentrações: 100, 50 e 25 µg/mL. *X. citri* foi cultivada em meio NYG sólido à 29 ºC. Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio NYG líquido e as células incubadas à 29 ºC e 200 rpm overnight. A DO_{600} do inóculo foi ajustada para 0,08 (Espectrômetro UV/Vis UV-1650PC, Shimadzu) com meio mínimo Y (YMM) (PICCHI *et al.*, 2016).

O ácido penicílico foi diluído em meio YMM para as concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL e alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana diluída 1:1000 em YMM foram adicionadas a placa de 96 poços, com volume final de 200 µL. O controle negativo consistiu em poços contendo YMM sem inóculo. A placa foi incubada a 29 ºC por 72h e a DO_{600} determinada em leitor de placas. O teste foi realizado em triplicata com duplicatas internas para cada concentração.

A quantificação do biofilme ligado à superfície foi feita pela remoção do meio de cultivo e lavagem da placa com NaCl 0,85%, seguida de coloração com solução de CV a 0,1% e incubação por 30 min. Após incubação o CV não ligado foi removido

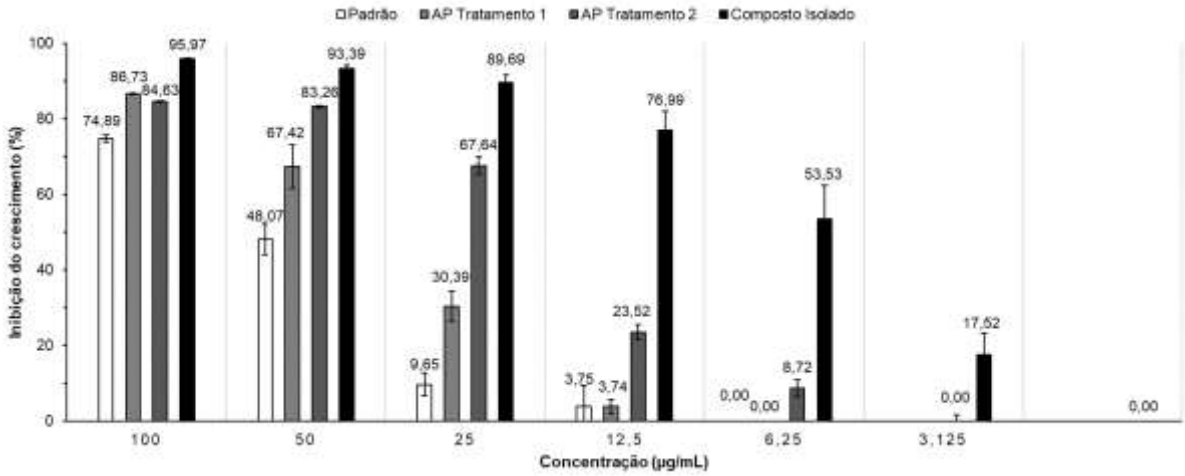
e os poços lavados duas vezes com água destilada. O CV ligado em cada poço foi solubilizado com 200 µL de etanol 70% e a absorbância (A) medida a 590 nm. Os dados foram normalizados seguindo a fórmula (A_{590}/OD_{600}) para comparação das médias no software JASP v. 0.14.1 (TEAM JASP, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaios de atividade antibacteriana do ácido penicílico

A Figura 21 mostra os resultados obtidos durantes os ensaios de atividade antibacteriana de ácido penicílico padrão (CAYMAN Chemical, Padrão), tratado com 50% de MeCN em água acidificados com 0,01% TFA (AP Tratamento 1), tratado com 25 % de MeCN em água acidificados com 0,01% TFA (AP Tratamento 2) e isolado do fungo *Penicillium* sp. CRM 1540 (Isolado).

Figura 21. Comparação da atividade antibacteriana de ácido penicílico (AP) em *Xanthomonas citri* subsp. *citri.*



Dados em porcentagem de inibição (%) e desvio padrão. Padrão: AP padrão não tratado; AP Tratamento 1: AP padrão tratado com 50% acetonitrila (0,01% TFA); AP Tratamento 2: AP Tratamento 1 tratado com 25% acetonitrila (0,01% TFA); Composto Isolado: AP produzido pelo fungo *Penicillium* sp. CRM 1540 em meio Czapek.

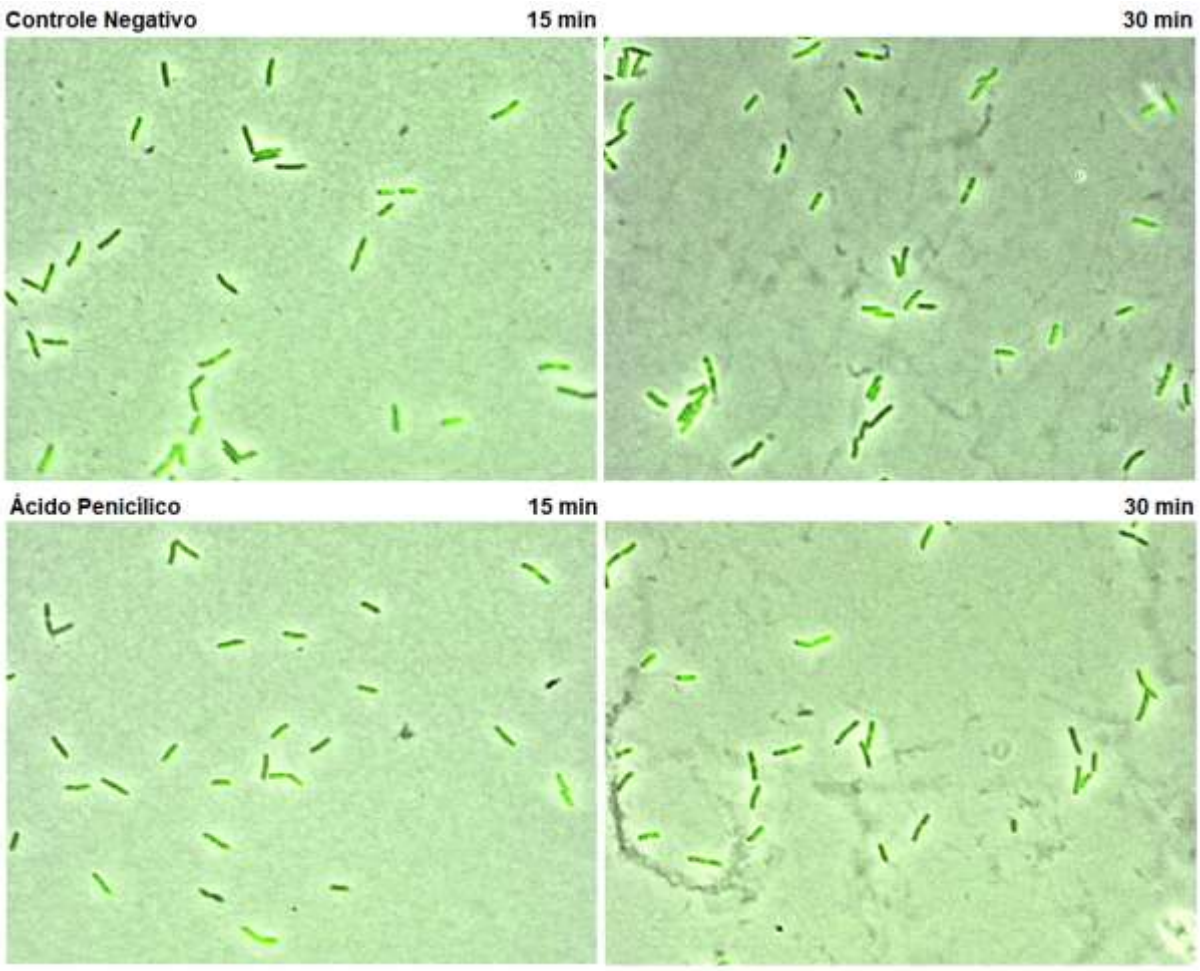
Na concentração de 25 µg/mL o composto padrão não tratado inibiu 9,65% do crescimento bacteriano, enquanto que ao ser tratado com 50% MeCN (0,01% TFA) a inibição aumentou para 30,39% e com novo tratamento com 25% MeCN (0,01% TFA) 67,64% do crescimento foi inibido. Aumento da capacidade de inibição de *X. citri* também foi observado nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, mas em nenhum tratamento a inibição em 12,5 µg/mL foi próxima a encontrada no composto isolado em nossos estudos, 76,99%.

O estudo da atividade de ácido penicílico baseou-se na possível variação de atividade antimicrobiana de um composto tautomérico presente em solução não tratada e levemente acidificada. A partir dos resultados observamos um aumento da inibição do crescimento de *X. citri* pelo ácido penicílico quando este tratado em solvente acidificado, o que indica possível alteração no equilíbrio do ácido penicílico, e que o isômero de cadeia aberta contribuí fortemente para a atividade antibacteriana em *X. citri*, já que sua formação é favorecida em meio ácido.

3.2. Microscopia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de AP

Nenhuma alteração na morfologia celular ou formação de septo foi observada nas células bacterianas após 15 e 30 min de contato com o composto à 50 µg/mL, onde observou-se 83,26% de inibição do crescimento (Figura 22). De maneira similar, o controle negativo apresentou células bacterianas normais.

Figura 22. Microscopia de fluorescência em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para observação de ação na divisão celular bacteriano pelo composto teste ácido penicílico.



3.3. Atividade anti-biofilme de AP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A formação de biofilme em superfície abiótica por *X. citri* apresentou redução em relação ao controle utilizado no experimento. O composto foi aplicado em concentrações com menos de 90% de inibição do crescimento, para que a produção do biofilme não fosse inviabilizada (100, 50 e 25 µg/mL).

O controle teve formação média de 2,163 ± 0,253 enquanto que na presença de AP quantidade de biofilme produzida foi muito pequena, uma redução significativa confirmada pelo teste ANOVA. As médias para formação de biofilme acompanhadas do desvio padrão observado e calculado pelo software JASP são

apresentadas na Tabela 2, resultados negativos de formação foram normalizados para 0,00.

Tabela 2. Formação de biofilme por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

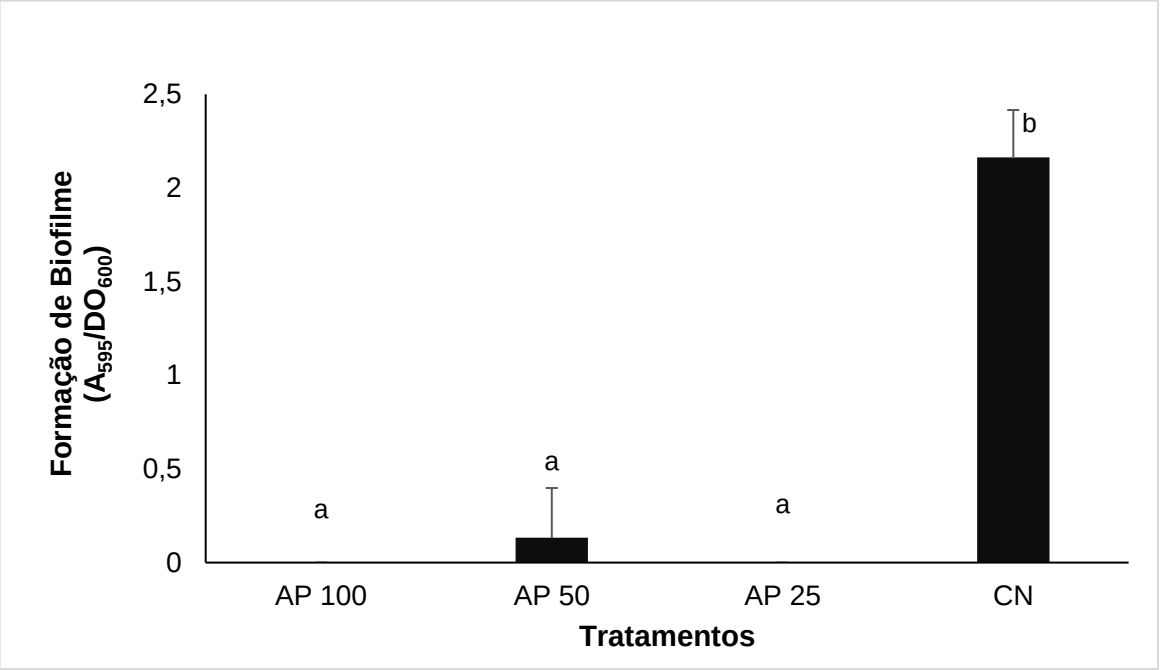
Tratamentos	**Concentração (μg mL^{-1})**	**Formação de Biofilme***
Ácido Penicílico	100	0,000 ± 0,000
	50	0,132 ± 0,266
	25	0,000 ± 0,000
Controle Negativo	-	2,163 ± 0,253

Um estudo realizado Picchi *et al* (2016) mostrou que o composto *N*-acetilcisteína quando em contato com *X. citri* reduz em 71,4% a formação de biofilme, mas em concentrações bem maiores (4 e 5 mg/mL). Dessa maneira, o resultado obtido com o ácido penicílico apresenta ser bem promissor visto que ele consegue reduzir em praticamente 100% a formação de biofilme em X. citri em concentrações baixíssimas (25, 50 e 100 μg/mL).

Os dados foram submetidos a análise estatística ANOVA (α: 0,05), o qual revelou que não houve diferença significativa entre as três concentrações de AP aplicadas, com inibição total da formação de biofilme nos três tratamentos. Ainda de acordo com a análise ANOVA, todos os tratamentos com AP apresentaram diferença significativa pelo teste Post Hoc de Tukey em relação ao controle com $p<0,001$ (Figura 23).

A ação inibitória de QS por ácido penicílico já foi relatada em *Pseudonomas aeruginosa* e *Halomonas pacifica*, em ambos os casos, os efeitos de inibição foram relacionados com a formação de biofilme das bactérias (GÖKALSIN *et al.*, 2014). Assim, os resultados estão de acordo com a literatura, onde AP é considerado uma molécula com potencial ação antibiofilme.

Figura 23. Formação de biofilme por *Xanthomonas citri* subps. *citri* após tratamento com ácido penicílico



Diferença entre as médias dos tratamentos observados na formação de biofilme por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* considerando os desvios. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey (α:0,05).

4 CONCLUSÃO

Os resultados corroboram com a literatura, onde o ácido penicílico é conhecido por ser um inibidor de Quorum Sensing (QS), isto é, um composto que altera a comunicação bacteriana, reduzindo a expressão de virulência e a formação de biofilmes em outras bactérias (LIAQAT; BACHMANN; EDYVEAN, 2014; RASMUSSEN *et al.*, 2005) e cuja atividade pode variar por se tratar de um composto de equilíbrio químico dinâmico devido a sua tautomeria (WILSON, 1976).

A descoberta da alteração da atividade antibacteriana do ácido penicílico em meio acidificado é de extrema importância para o uso correto e otimizado do composto, entretanto testes ainda são necessários para confirmar a relação entre equilíbrio dinâmico e atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/ChemSketch version 14. 00 (2019) Advanced Chemistry Development, Inc.

ALSBERG, C.; BLACK, O. F.; INDUSTRY, U. S. B. O. P. Contributions to the study of maize deterioration. Washington : G.P.O.: *Washington Govt Print Off* 1-47 p. 1913.

BIANCHINI, A.; BULLERMAN, L. B. MYCOTOXINS | Classification. *In*: BATT, C. A. e TORTORELLO, M. L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 854-861.

BIRKINSHAW, J. H.; OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms. **Biochemical Journal**, 30, n. 3, p. 394-411, 1936-03-01 1936.

CAICEDO, J. C.; VILLAMIZAR, S. Xanthomonas citri ssp. citri Pathogenicity, a Review. 2021.

CAICEDO, J. C.; VILLAMIZAR, S.; FERRO, M. I. T.; KUPPER, K. C. *et al.* Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell-cell signalling inXanthomonas citriand reduce citrus canker disease severity. **Plant Pathology**, 65, n. 5, p. 782-791, 2016-06-01 2016.

FRISVAD, J. C. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. **World Mycotoxin Journal**, 11, n. 1, p. 73-100, 2018-02-23 2018.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.-L.; WANG, N. Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of Xanthomonas citri subsp. citri. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, 25, n. 2, p. 165-179, 2012-02-01 2012.

GÖKALSIN, B.; BERBER, D.; SESAL, N. C. Chapter 9 - Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing and Biofilm Inhibition. *In*: TOMMONARO, G. (Ed.). **Quorum Sensing**: Academic Press, 2019. p. 227-256.

LIAQAT, I.; BACHMANN, R. T.; EDYVEAN, R. G. J. Type 2 Quorum Sensing Monitoring, Inhibition and Biofilm Formation in Marine Microrganisms. **Current Microbiology**, 68, n. 3, p. 342-351, 2014-03-01 2014.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A. *et al.* The Xanthomonas axonopodis pv. citri flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, 157, n. 3, p. 819-829, 2011-03-01 2011.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J. *et al.* Subcellular localization of proteins labeled with GFP in Xanthomonas citri ssp. citri: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, 310, n. 1, p. 76-83, 2010-07-12 2010.

OXFORD, A. E. Antibacterial substances from moulds. III. Some observations on the bacteriostatic powers of the mould products citrinin and penicillic acid. **Chem Ind**, 61, p. 48-51, 1942.

PICCHI, S. C.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. *et al.* N-acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour ofXanthomonas citrisubsp.citri. **Plant Pathology**, 65, n. 4, p. 561-569, 2016-05-01 2016.

RASMUSSEN, T. B.; SKINDERSOE, M. E.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R. K. *et al.* Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by Penicillium species. **Microbiology**, 151, n. 5, p. 1325-1340, 2005-05-01 2005.

RIGUEIRAS, P. O. Inibidores do quorum sensing: estratégia de combate à virulência e resistência bacterianas. 2018.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E. *et al.* Biofilm formation and motility ofXanthomonasstrains with different citrus host range. **Plant Pathology**, 64, n. 4, p. 767-775, 2015-08-01 2015.

TEAM JASP. **JASP (Version 0.14.1)[Computer software].** Versão 0.14.1. 2020.

TURAN, N. B.; ENGIN, G. Ö. Chapter Four - Quorum Quenching. *In*: CHORMEY, D. S.;BAKIRDERE, S.*, et al* (Ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**: Elsevier, 2018. v. 81, p. 117-149.

VIEIRA, G.; KHALIL, Z. G.; CAPON, R. J.; SETTE, L. D. *et al.* Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker. **Journal of Applied Microbiology**, 2022-01-05 2022.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORAO, L. G.; DOS SANTOS, J. A. *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against Xanthomonas citri subsp citri. **Letters in Applied Microbiology**, 67, n. 1, p. 64-71, Jul 2018.

WILSON, D. M. Patulin and Penicillic Acid. *In*: **Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems**: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1976. v. 149, cap. 6, p. 90-109. (Advances in Chemistry).

CAPÍTULO 4

CYCLOPALDIC ACID PRODUCED BY AN ANTARCTIC MARINE *PENICILLIUM*: ISOLATION AND *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

ARTIGO SUBMETIDO EM SETEMBRO DE 2022

RESUMO

Fitopatógenos causam grandes perdas econômicas na agricultura e afetam diversas culturas socialmente importantes globalmente. Para reduzir os danos, pesticidas tem sido frequentemente utilizados em estratégias de manejo integrado, porém muitos fungos fitopatógenos podem desenvolver resistência, ameaçando a eficiência dos métodos de controle. Além do próprio patógeno, existe uma crescente preocupação com a poluição ambiental e os riscos emergentes. à saúde. Uma alternativa ao problema é o uso de produtos naturais com elevada atividade antifúngica e baixa toxicidade. Fungos de ambientes marinhos e extremos são fontes em potencial de compostos biologicamente ativos. Descrevemos aqui a produção, o isolamento e a identificação de ácido ciclopáldico, um composto bioativo produzido por *Penicillium* sp. CRM 1540, uma linhagem isolada de sedimentos marinhos da Antártica. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia líquida em fase reversa e originou 40 frações, de onde fração F17 foi selecionada. Análises de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D em DMSO-*d6* e $CDCl_3$ e espectrometria de massas foram aplicadas para identificar o composto como ácido ciclopáldico, $C_{11}H_{10}O_6$ (238 Da). A atividade antimicrobiana do composto puro foi avaliada contra os fungos fitopatogênicos de importância agrícola: *Macrophomina phaseolina* MMBF12/18, *Rhizoctonia solani* MMBF30/11, e *Sclerotinia sclerotiorum* MMBF04/19. O ensaio revelou o potencial do ácido ciclopáldico, produzido por *Penicillium* sp. CRM 1540 como molécula-chave contra *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, com mais de 90% de inibição do crescimento após 96h de contato com as células fúngicas à 100 µg mL^{-1} e mais de 70% à 50 µg mL^{-1}.

Palavras-chave: Extremófilos; Cromatografia; Atividade antifúngica; Fitotoxina; Fitopatógenos.

1 ARTIGO SUBMETIDO

Artigo apresentado conforme submetido para publicação em Set/2022 na revista "*Extremophiles*".

Cyclopaldic acid produced by an Antarctic marine *Penicillium*: isolation and *in vitro* activity against phytopathogenic fungi

Gabrielle Vieira[1], Lara Durães Sette[1], Derlene Atilli de Angelis[2], Daiane Cristina Sass[1]*,

[1]Department of General and Applied Biology, São Paulo State University, Rio Claro, Brazil

[2] Division of Microbial Resources, CPQBA, University of Campinas, Campinas, Brazil

*Corresponding author: daiane.sass@unesp.br

Acknowledgements

We thank Prof Robert J Capon and Zeinab Khalil from the of the University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia for valued help on the purification process of the crude extract at the Institute for Molecular Bioscience.

Funding

This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant #141988/2018-5], Brazil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – PrInt [grant #88887.467270/2019-00] and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant numbers #2018/11747-3 and #2016/07957-7].

ABSTRACT

Phytopathogens cause losses in agriculture and affect socially important crops worldwide. To reduce damage, pesticides have been frequently used in integrated management strategies, but many fungal phytopathogens may become resistant, threatening the efficiency of control methods. In addition to the pathogen itself, environmental pollution and its risks to people's health have generated great concern. One alternative for such a problem is the use of natural products with antifungal activity and low toxicity. Fungi from extreme environments are sources of biologically active compounds. Here, we present the production, isolation, and identification of a bioactive compound produced by *Penicillium* sp. CRM 1540, a fungal strain isolated from Antarctic marine sediment. The crude extract was fractionated by reversed-phase chromatography and F17 was selected from 40 fractions it yielded. We used Nuclear Magnetic Resonance analysis, and mass spectrometry, to identify the compound as cyclopaldic acid $C_{11}H_{10}O_6$ (238 Da). The compound was evaluated against phytopathogenic fungi, namely: *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani,* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The assay revealed the potential of cyclopaldic acid as a leading molecule against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, with more than 90% of growth inhibition after 96h using 100 µg mL^{-1}, and more than 70% using 50 µg mL^{-1} *in vitro*.

Keywords: extremophiles, chromatography, antifungal activity, phytotoxin, plant pathogens.

Introduction

Phytopathogenic fungi cause huge losses in agricultural production by decreasing crop yield and quality (Thambugala et al. 2020). *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Gold [*Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butler] is a soil-borne fungus with worldwide distribution, wide host range, and high persistence in soil (Marquez et al., 2021). At least 500 plant species are affected by this plant pathogen, which is responsible for diseases such as root rot, charcoal rot, stem rot, seedling blight, and damping-off (Ghosh et al. 2018; Lodha and Mawar 2020). Another fungus that causes significant damage to crops is *Rhizoctonia solani* Kühn [*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk]. This microorganism causes brown patches, damping-off, root rot, black scurf, and stem canker on its hosts, which include rice, wheat, soybeans, potato, and corn (Erlacher et al. 2014; Hussain and Khan 2020; Nguyen et al. 2021).

To circumvent production losses and prevent diseases, producers have made use of many synthetic chemicals, whose prolonged use has resulted in environmental and ecological impacts, besides the emergence of resistant pathogenic strains (Keswani et al. 2019; Cheng et al. 2021). Given these concerns, strict regulation has been proposed for the use of fungicides to ensure toxicological food safety, in addition to the development of new antifungals for use in a more environmental-friendly way (Brauer et al. 2019; Keswani et al. 2019).

Natural products are secondary metabolites produced by living organisms that aid in survival and adaptation (O'Brien and Wright 2011). These compounds have varied biological activities and can be used as antibiotics, pigments, hormones, antitumors, antimicrobials, and antivirals (Newman and Cragg 2016; Singh et al. 2019). Microorganisms are known producers of bioactive molecules, and a relevant source for bioprospection of compounds for clinical, industrial, and agricultural applications (Dayan et al. 2009; Furbino et al. 2014). Furthermore, antifungal products are considered effective alternatives to fungicides (Silber et al. 2013; Henríquez et al. 2014; Encheva-Malinova et al. 2015; Lee 2016; Ngo et al. 2019).

Among the most promising sources of active natural products are metabolites from marine-derived fungi, and fungi from extreme habitats. A significant number of compounds with a wide variety of biological activity produced by these fungi have been reported (Melo et al. 2014; Gonçalves et al. 2015; Svahn et al. 2015; Deshmukh et al. 2018).

In recent years, we have performed the bioprospection of filamentous fungi isolated from terrestrial and marine samples collected in the Antarctica region for antimicrobial activity against phytopathogens (Purić et al. 2018; Vieira et al. 2018; Ferrarezi et al. 2019). The crude extracts produced inhibited the growth of bacterial plant pathogens, and penicillic acid was isolated and identified as an interesting compound with protective action in greenhouse experiments (Vieira et al. 2022). Our promising results led us now to determine the potential of secondary metabolites from the same fungi as antifungal agents and identify active compounds in the crude extracts.

Materials and Methods

Fungal Strain

The fungus *Penicillium* sp. strain CRM 1540 was isolated from marine sediment collected at Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) as reported by Wentzel et al. (Wentzel et al. 2019). Molecular taxonomy analyses (beta-tubulin sequencing and phylogeny) suggested that this fungus is a new species from the genus *Penicillium* close related to *P. commune* and *P. caseifulvum* (Vieira et al. 2022). This strain has been maintained by cryopreservation (-80ºC) at the UNESP Central of Microbial Resources (CRM-UNESP). For the present study, *Penicillium* sp. CRM 1540 was grown under conditions described in Supplementary Information.

Extraction and Fractionation of Crude Extract

After growth, culture media were subjected to liquid-liquid extraction with analytical grade ethyl acetate followed by solvent removal to deliver crude extract of *Penicillium* sp. CRM 1540. The organic extract was dissolved in methanol to 60 mg mL^{-1}, and then aliquots (900 µL) were subjected to reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C8 21.2 mm x 25 cm x 7µm) with automated collection (~0.6 min interval), as described in Supplementary Information. Scheme 1 shows the extraction and fractionation processes. The fractions obtained were dried using a centrifugal evaporator and combined based on UPLC-DAD-QTOF analysis (Figure S1).

Cyclopaldic Acid Identification

Sample F17 was subjected to several NMR experiments, involving ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C APT NMR, HSQC, HMBC, and COSY. The solvents used for analysis were dimethyl sulfoxide (DMSO-*d6*) and chloroform ($CDCl_3$). NMR data were recorded on a Bruker Avance DRX400. For the LC-HRMS analysis, 1 µL of F17 was diluted in MeOH/H_2O (1:9 v/v) to 1 µg mL^{-1} and injected in a C8 column (Betasil-C8 10 x 0.2 mm) with gradient elution of water and acetonitrile with 0.1% formic acid

(Supplementary Information). NMR data were analysed by Bruker TopSpin 4.0.9 software (academic license) ; the compound structure was drawn with ChemSketch Freeware v 14.00 (ACD/ChemSketch 2019).

Plant pathogenic fungi

Antifungal activity *in vitro* was measured against three known fungal phytopathogens. The targeted fungi were cultivated in PDA plates (potato dextrose agar, 27 g PDB, and 20 g agar per litre) for 4 days for *Rhizoctonia solani* MMBF30/11*,* 7 days for *Macrophomina phaseolina* MMBF12/18, and 15 days for *Sclerotinia sclerotiorum* MMBF04/19 at 28 ºC. The fungi belong and are preserved at the Biological Institute of São Paulo (Instituto Biológico de São Paulo – IB).

Antifungal Activity Assay

The assay was carried out in 96-well plates with a 2-fold dilution of the compound, allowing the evaluation of cyclopaldic acid from 100 µg mL^{-1} to 0.78 µg mL^{-1}. From the agar plate, a standardized inoculum of 10^4 cells for each culture was prepared in saline solution (0.85% NaCl) for each plant pathogen, followed by a dilution at 1:10 in PDB. To each well were added 50 µL of cyclopaldic acid and 50 µL of fungal phytopathogen. PDB medium with the respective inoculum was used as Negative Control (NC). The plates were incubated at 28 ºC for 96h, and OD_{600} was measured at 24h intervals. The assay was performed in triplicate. Aliquots of 10 µL from each well were transferred to PDA plates after the test and then incubated at 28 ºC to identify whether the compound had fungistatic or fungicide action. Growth inhibition (%) was calculated for each concentration according to the formula below:

$$Inhibition\ (\%) = \frac{(average\ OD600\ of\ NC) - (OD600\ of\ compound)}{(average\ OD600\ of\ NC)} * 100$$

Wherein: OD600 = optical density measured at 600 nm, NC: negative control.

Statistical analysis

The data were analysed by descriptive analysis and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, using GraphPad Prism 8 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). The same software was used to plot inhibition graphics.

Results

Cyclopaldic acid Isolation and Identification

The EtOAc crude extract (363.90 mg) yielded 40 fractions after UPLC analysis and grouping by similarity. From these, fraction F17 (44.6 mg) was isolated (Figure 1) as a white compound with the molecular formula $C_{11}H_{10}O_6$ (238 Da), based on high-resolution ESIMS *m/z* 239.2365 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{11}H_{11}O_6$, 239.2365) (Figure S2). Analysis of the 1D and 2D NMR (400 MHz, *DMSO-d*$_6$, *CDCl*$_3$) data for F17 (Figures 1, S3-S9, and Table S1) and comparison with available literature data (Achenbach et al. 1982) confirmed the structure of cyclopaldic acid.

Antifungal Activity Assay

No fungal activity was detected against *S. sclerotiorum*, but the growths of *R. solani* and *M. phaseolina* were affected by cyclopaldic acid at 100, 50, and 25 µg mL^{-1}. Means and standard deviation for each treatment can be seen in Supplementary Information (Table S2).

For *R. solani,* the 24h interval measures of fungal growth showed that, at 100 µg mL^{-1}, it took 48h of contact for the compound to have its inhibitory effect (31.02%), reaching more than 90% inhibition after 72h and 96h (Figure 2A). At 50 µg mL^{-1}, inhibition started after 72h and severely decreased in the subsequent interval (Figure 2B). And at 25 µg mL^{-1}, cyclopaldic acid affected growth only after 72h, with a 32.85% inhibition (Figure 2C). For 12.5 µg mL^{-1} and the subsequent concentrations evaluated, no activity was observed (Figure 2D).

Statistical analysis revealed no significant difference between 72 and 96h of incubation for the compound at 100 µg mL^{-1}, which promoted inhibitions of 92.83% and 97.18%, respectively (Figure 2A). There was also a significant difference between 72 and 96h of contact at 50 µg mL^{-1} (Figure 2B).

Additionally, at a 72h interval, the inhibitory effect of cyclopaldic acid showed a slight difference between 100 and 50 µg mL^{-1} ($p = 0.0122$), which grew after 96h (Figure 3). These results contribute to our conclusion that the inhibition activity of cyclopaldic acid on *R. solani* reaches its optimal effectiveness at 100 µg mL^{-1} after 72h of contact with the fungal cells in *in vitro* conditions. We may also infer that similar results can be achieved by applying a lower concentration of the compound, e.g., 50 µg mL^{-1}.

Akin to what was observed with *R. solani*, the highest inhibition of *M. phaseolina* growth (96.13%) was detected at 100 µg mL^{-1} after 96h of incubation, and no activity was found at 12.5 µg mL^{-1} and lower concentrations (Figure 4A, 4D). Cyclopaldic acid showed activity within the first 24h of contact with *M. phaseolina*. Its growth was inhibited by 21.68% at 100 µg mL^{-1}, which increased to 34.42% after 48h.

Afterwards, inhibition increased to 89.94% and 96.13% after 72h and 96h of incubation, respectively (Figure 4A).

The antifungal activity of the compound at 50 and 25 µg mL^{-1} against *M. phaseolina* differs from the negative control only after 72h of incubation (Figure 4B, 4C). Within this time interval, more than 60% inhibition was observed at the three concentrations, in which cyclopaldic acid was active against *M. phaseolina*. The activity decreased in the next 24h to 75.95% at 50 µg mL^{-1} and to less than 10% at 25 µg mL^{-1}, which was statically similar to NC.

Against *M. phaseolina*, the inhibitory activity of cyclopaldic acid differs significantly among concentrations after 72h of contact with the phytopathogen, and this difference increased after 96h (Figure 5). However, at 100 µg mL^{-1}, inhibition means showed a small difference between the exposure times of 72h and 96h ($p = 0.0123$). Given those results, we conclude that the most effective treatment *in vitro* for *M. phaseolina* is applying 100 µg mL^{-1} for 96h, which can be shortened to 72h.

Discussion

Traditionally regarded as a necrotrophic fungus, *S. sclerotiorum* acquires nutrients by progressively killing the host cells through cell-wall degrading enzymes and toxins secretion (Kabbage et al. 2015; Mbengue et al. 2016; Mccaghey et al. 2019). These molecules, known as effectors, include fungal secondary metabolites that range from small peptides to complex chemical structures and are important virulence components found in plant pathogens (O'Sullivan et al. 2021; Shao et al. 2021).

Among these molecules are oxalic and fumaric acids, which contribute to host defence suppression and pathogenesis by acidifying the environment and creating conditions for the expression of lytic and hydrolytic enzymes related to disease development (Frisvad 1989a, b; Boysen et al. 1996; Nicoletti and Trincone 2016; O'Sullivan et al. 2021). Furthermore, the growth of *S. sclerotiorum* is slowed down under neutral and alkaline pH but favoured under acidic conditions (Frisvad et al. 2004; Shah et al. 2020). The pathogen is also known to secret other organic acids such as glycolic, citric, glyoxylic, malic, and succinic acid when in neutral or alkaline environments although these substances have not been the object of many studies on S. *sclerotiorum* (Graniti et al. 1992; Nicoletti and Trincone 2016; Roscetto et al. 2020; Masi et al. 2021).

The link between *S. sclerotiorum* growth and increased virulence at lower pH, combined with slow development in neutral or alkaline environments, led us to

hypothesize that cyclopaldic acid does not affect fungal growth as it may contribute to pathogen growth, acidifying *in vitro* culture media.

The growth inhibition patterns observed for *R. solani* and *M. phaseolina* suggest a slow fungistatic activity for cyclopaldic acid on the microbial cells studied. This type of activity was confirmed by the growth of treated fungi in PDA plates, showing that cyclopaldic acid delays fungal growth but does not kill the phytopathogens, regardless of the concentration at which the inhibitory activity was detected (Figure S10).

Cyclopaldic acid is a known compound produced by species of *Penicillium*, *Aspergillus,* and *Pestalotiopsis*. Among the documented producers from the genus *Penicillium* are *P. commune*, *P. carneum*, *P. mononematosum*, *P. viridicatum*, and *P. polonicum* (Frisvad 1989a, b; Boysen et al. 1996; Frisvad et al. 2004). While novel antimicrobial compounds may be found in habitats geographically isolated such as Antarctica, known molecules can also be produced by fungal strains that inhabited this kind of extreme environment and, as a consequence, novel uses for previously known natural compounds might be found (Nicoletti and Trincone 2016; Shah et al. 2020).

The literature is scarce regarding biological activity, with limited reports on antifungal activity, larvicidal activity, and phytotoxicity for this molecule. More recent studies on the antimicrobial activity of cyclopaldic acid have shown a diverse pattern of inhibition. According to Roscetto et al. (Roscetto et al. 2020), some strains of *Staphylococcus aureus* were inhibited by 90% using cyclopaldic acid at 100 µg mL^{-1}, while other Gram-positive and Gram-negative bacteria of clinical interest showed no minimum inhibition of 50%.

For antifungal activities, Masi et al. (Masi et al. 2021) showed that cyclopaldic acid had no effect against *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, or *Fusarium oxysporum* isolated from lithic substrata. However, other authors have reported that, at 100 µg mL^{-1}, cyclopaldic acid can inhibit from 40 to 65% of the growth of *Geotrichum candidum, Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, while at 50 µg mL^{-1} it can reduce spore germination for these plant pathogenic fungi (Graniti et al. 1992). At 100 mM or lower concentrations, cyclopaldic acid inhibited the germination of *Puccinia* spp. and *Uromyces* spp. strains, which are causal agents of rust in plants (Barilli et al. 2016, 2017). Aside from that, cyclopaldic acid at 100 µg

mL^{-1} also has shown activity against *Penicillium roqueforti*, a food contaminant, with 29.34% inhibition after 72h and 59.48% after 96h (Valerio et al. 2018).

As previously mentioned, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* are phytopathogens that can cause significant yield losses in several important crops, as they have a wide host range and high persistence in the soil (Sturrock et al. 2015; Feng et al. 2017; Marquez et al. 2021). Current control strategies have aimed to lower the incidence in plantations, but management methods remain a challenge despite research efforts (Almeida et al. 2014; AGROLINK 2021; Marquez et al. 2021). In this aspect, cyclopaldic acid can be a leading molecule for formulations against fungal plant pathogens as an alternative to other ineffective chemicals. Additionally, the search for secondary metabolites from extremophiles has proven that these microorganisms can be considered essential sources of compounds for agricultural use.

References

ACD/ChemSketch version 14. 00 (2019) Advanced Chemistry Development, Inc.

Achenbach H, Mühlenfeld A, Weber B, et al (1982) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, XXVII[1] Cyclopaldsäure und 3-O-Methyl-cyclopolsäure, zwei antibiotisch wirksame Substanzen aus Aspergillus duricaulis/Investigations on Metabolites of Microorganisms, XXVII [1] Cyelopaldic Acid and 3-O-Methyl Cyc. Zeitschrift für Naturforschung B 37:1091–1097. https://doi.org/10.1515/znb-1982-0823

AGROLINK (2021) Podridão Radicular. 2021

Almeida ÁMR, Seixas CDS, Farias JRB, et al (2014) Macrophomina phaseolina em soja

Barilli E, Cimmino A, Masi M, et al (2016) Inhibition of Spore Germination and Appressorium Formation of Rust Species by Plant and Fungal Metabolites. Nat Prod Commun 11:1934578X1601100. https://doi.org/10.1177/1934578x1601100940

Barilli E, Cimmino A, Masi M, et al (2017) Inhibition of early development stages of rust fungi by the two fungal metabolites cyclopaldic acid and epi-epoformin. Pest Manag Sci 73:1161–1168. https://doi.org/10.1002/ps.4438

Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L (1996) Reclassification of the Penicillium Roqueforti Group into Three Species on the Basis of Molecular Genetic and Biochemical Profiles. Microbiology (N Y) 142:541–549. https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-541

Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, et al (2019) Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. Biomolecules 9:521. https://doi.org/10.3390/biom9100521

Cheng J, Peng Y, Yan J, et al (2021) Research Progress in Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. Front Microbiol 12:1209

Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009) Natural products in crop protection. Bioorg Med Chem 17:4022–4034. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046

Deshmukh SK, Prakash V, Ranjan N (2018) Marine Fungi: A Source of Potential Anticancer Compounds. Front Microbiol 8:

Encheva-Malinova M, Vancheva T, Badzhinerov N, et al (2015) Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. Annuaire de l'Université de Sofia "St Kliment Ohridski" Faculte de Biologie 100:216–222

Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, et al (2014) The impact of the pathogen Rhizoctonia solani and its beneficial counterpart Bacillus amyloliquefaciens on the indigenous lettuce microbiome. Front Microbiol 5:175. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00175

Feng S, Shu C, Wang C, et al (2017) Survival ofRhizoctonia solaniAG-1 IA, the Causal Agent of Rice Sheath Blight, under Different Environmental Conditions. Journal of Phytopathology 165:44–52. https://doi.org/10.1111/jph.12535

Ferrarezi JH, dos Santos Aparecida J, Sette LD, et al (2019) Anti-Xanthomonas activity of Antarctic fungi crude extracts. Afr J Biotechnol 18:713–718. https://doi.org/10.5897/ajb2019.16886

Frisvad JC (1989a) The connection between the Penicillia and Aspergilli and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. Arch Environ Contam Toxicol 18:452–467. https://doi.org/10.1007/bf01062373

Frisvad JC (1989b) The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. Botanical Journal of the Linnean Society 99:81–95. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1989.tb00393.x

Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in Penicillium subgenus Penicillium. Stud Mycol 49:201–241

Furbino LE, Godinho VM, Santiago IF, et al (2014) Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. Microb Ecol 67:775–787. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0374-9

Ghosh T, Biswas MK, Guin C, Roy P (2018) A review on characterization, therapeutic approaches and pathogenesis of Macrophomina phaseolina. Plant Cell Biotechnol Mol Biol 19:72–84

Gonçalves VN, Carvalho CR, Johann S, et al (2015) Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. Polar Biol 38:1143–1152. https://doi.org/10.1007/s00300-015-1672-5

Graniti A, Sparapano L, Evidente A (1992) Cyclopaldic acid, a major phytotoxic metabolite of Seiridium cupressi, the pathogen of a canker disease of cypress. Plant Pathol 41:563–568. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02454.x

Henríquez M, Vergara K, Norambuena J, et al (2014) Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. World J Microbiol Biotechnol 30:65–76. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x

Hussain T, Khan AA (2020) Bacillus subtilis HussainT-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by Rhizoctonia solani on seed tubers. Biocatal Agric Biotechnol 23:101443. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101443

Kabbage M, Yarden O, Dickman MB (2015) Pathogenic attributes of Sclerotinia sclerotiorum: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. Plant Science 233:53–60. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.018

Keswani C, Singh HB, Hermosa R, et al (2019) Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. Appl Microbiol Biotechnol 103:9287–9303. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2

Lee Y (2016) Lysimachia foenum-graecum Herba Extract, a Novel Biopesticide, Inhibits ABC Transporter Genes and Mycelial Growth of Magnaporthe oryzae. Plant Pathol J 32:8–15. https://doi.org/10.5423/ppj.oa.08.2015.0157

Lodha S, Mawar R (2020) Population dynamics of Macrophomina phaseolina in relation to disease management: A review. Journal of Phytopathology 168:1–17. https://doi.org/10.1111/jph.12854

Marquez N, Giachero ML, Declerck S, Ducasse DA (2021) Macrophomina phaseolina: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. Front Plant Sci 12:666

Masi M, Petraretti M, de Natale A, et al (2021) Fungal Metabolites with Antagonistic Activity against Fungi of Lithic Substrata. Biomolecules 11:295. https://doi.org/10.3390/biom11020295

Mbengue M, Navaud O, Peyraud R, et al (2016) Emerging Trends in Molecular Interactions between Plants and the Broad Host Range Fungal Pathogens Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum. Front Plant Sci 7:

Mccaghey M, Willbur J, Smith DL, Kabbage M (2019) The complexity of the Sclerotinia sclerotiorum pathosystem in soybean: virulence factors, resistance mechanisms, and their exploitation to control Sclerotinia stem rot. Trop Plant Pathol 44:12–22. https://doi.org/10.1007/s40858-018-0259-4

Melo IS, Santos SN, Rosa LH, et al (2014) Isolation and biological activities of an endophytic Mortierella alpina strain from the Antarctic moss Schistidium antarctici. Extremophiles 18:15–23. https://doi.org/10.1007/s00792-013-0588-7

Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod 79:629–661. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055

Ngo MT, Han JW, Yoon S, et al (2019) Discovery of New Triterpenoid Saponins Isolated from Maesa japonica with Antifungal Activity against Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae. J Agric Food Chem 67:7706–7715. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02236

Nguyen CC, Nguyen TQC, Kanaori K, et al (2021) Antifungal Activities of Ageratum conyzoides L. Extract against Rice Pathogens Pyricularia oryzae Cavara and Rhizoctonia solani Kühn. Agriculture 11:1169. https://doi.org/10.3390/agriculture11111169

Nicoletti R, Trincone A (2016) Bioactive Compounds Produced by Strains of Penicillium and Talaromyces of Marine Origin. Mar Drugs 14:37. https://doi.org/10.3390/md14020037

O’Brien J, Wright GD (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. Curr Opin Biotechnol 22:552–558. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.010

O’Sullivan CA, Belt K, Thatcher LF (2021) Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: Sclerotinia. Front Plant Sci 12:

Purić J, Vieira G, Cavalca LB, et al (2018) Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. Lett Appl Microbiol 66:530–536. https://doi.org/10.1111/lam.12875

Roscetto E, Masi M, Esposito M, et al (2020) Anti-Biofilm Activity of the Fungal Phytotoxin Sphaeropsidin A against Clinical Isolates of Antibiotic-Resistant Bacteria. Toxins (Basel) 12:444. https://doi.org/10.3390/toxins12070444

Shah M, Sun C, Sun Z, et al (2020) Antibacterial Polyketides from Antarctica Sponge-Derived Fungus Penicillium sp. HDN151272. Mar Drugs 18:. https://doi.org/10.3390/md18020071

Shao D, Smith DL, Kabbage M, Roth MG (2021) Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. Front Plant Sci 12:

Silber J, Ohlendorf B, Labes A, et al (2013) Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a Calcarisporium Strain. Mar Drugs 11:3309–3323. https://doi.org/10.3390/md11093309

Singh BP, Rateb ME, Rodriguez-Couto S, et al (2019) Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges. Front Microbiol 10:

Sturrock CJ, Woodhall J, Brown M, et al (2015) Effects of damping-off caused by Rhizoctonia solani anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray Computed Tomography and real-time PCR. Front Plant Sci 6:461

Svahn KS, Chryssanthou E, Olsen B, et al (2015) Penicillium nalgiovense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. Fungal Biol Biotechnol 2:. https://doi.org/10.1186/s40694-014-0011-x

Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, et al (2020) Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. Front Cell Infect Microbiol 10:

Valerio F, Masi M, Cimmino A, et al (2018) Antimould microbial and plant metabolites with potential use in intelligent food packaging. Nat Prod Res 32:1605–1610. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1385018

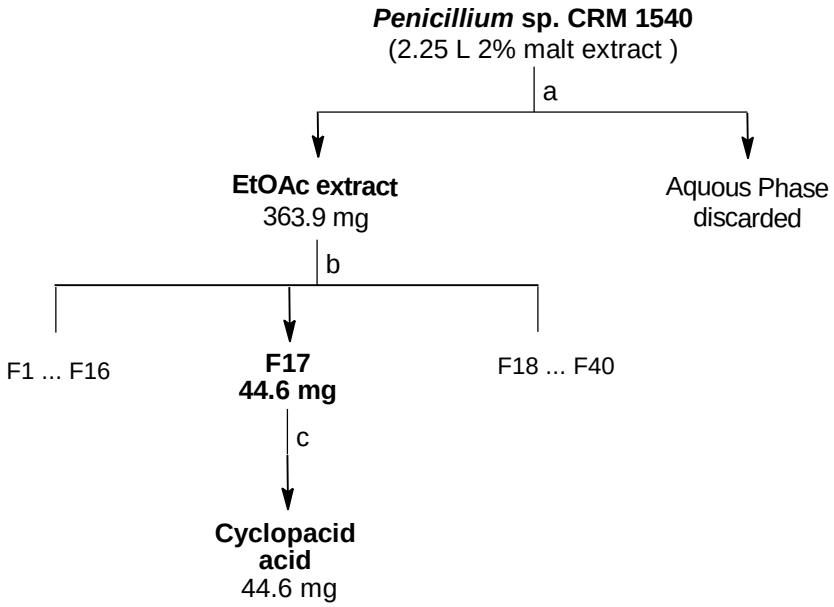
Vieira G, Khalil ZG, Capon RJ, et al (2022) Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker. J Appl Microbiol. https://doi.org/10.1111/jam.15413

Vieira G, Purić J, Morão LG, et al (2018) Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against Xanthomonas citri subsp. citri. Lett Appl Microbiol 67:64–71. https://doi.org/10.1111/lam.12890

Wentzel LCP, Inforsato FJ, Montoya QV, et al (2019) Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. Microb Ecol 77:12–24. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1217-x

Figures

Scheme 1 Isolation scheme of cyclopaldic acid: **a**) liquid-liquid extraction of the microbial broth using ethyl acetate; **b**) reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm × 25 cm × 7 µm column, 20 mL min^{-1} gradient elution over 30 min from 90%–0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) for 363.90 mg of crude extract; **c**) Fractions from the same peak (F17) were grouped as one



(a) Liquid-liquid partitioning of filtered broth (1:3)
(b) Preparative reversed-phase HPLC chromatography
(c) NMR and LC/MS analysis

Fig. 1 DAD Chromatogram (290 nm) of the cyclopaldic acid fraction.

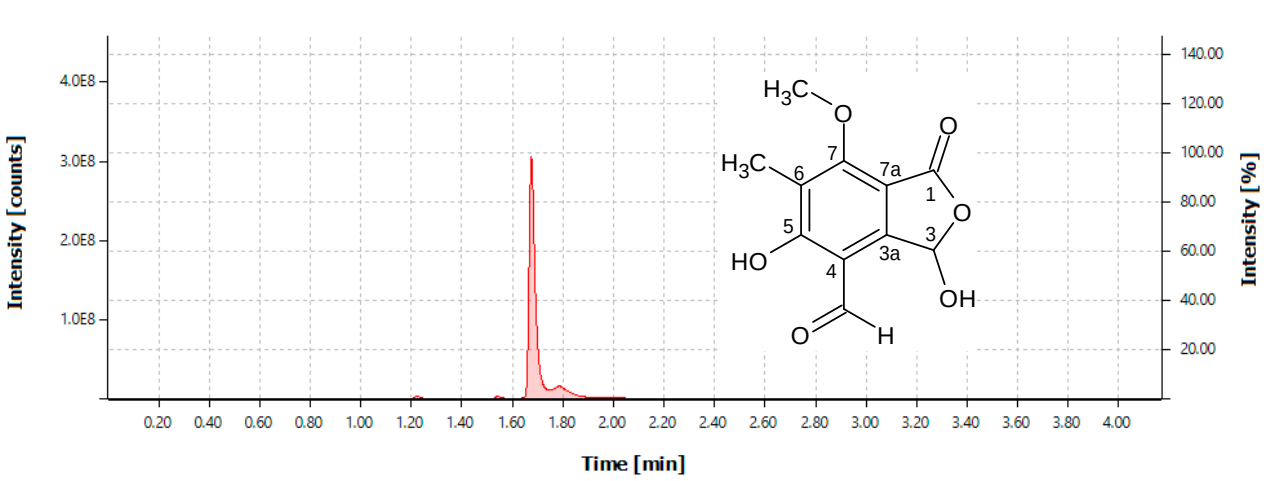


Fig. 2 Growth Inhibition (%) of *Rhizoctonia solani* by different concentrations of cyclopaldic acid *in vitro* over time. Data shown as means and standard deviation. NC: negative control of *Rhizoctonia solani*, **a**) 100 *µg mL-1* of cyclopaldic acid, **b**) 50 µ*g mL-1* of cyclopaldic acid, **c**) 25 *µg mL-1* of cyclopaldic acid, **d**) 12.5 *µg mL-1* of cyclopaldic acid. Differing signals (*) denote significant differences among group means according to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison between treatments with a confidence interval of 95% (α = 0.05).

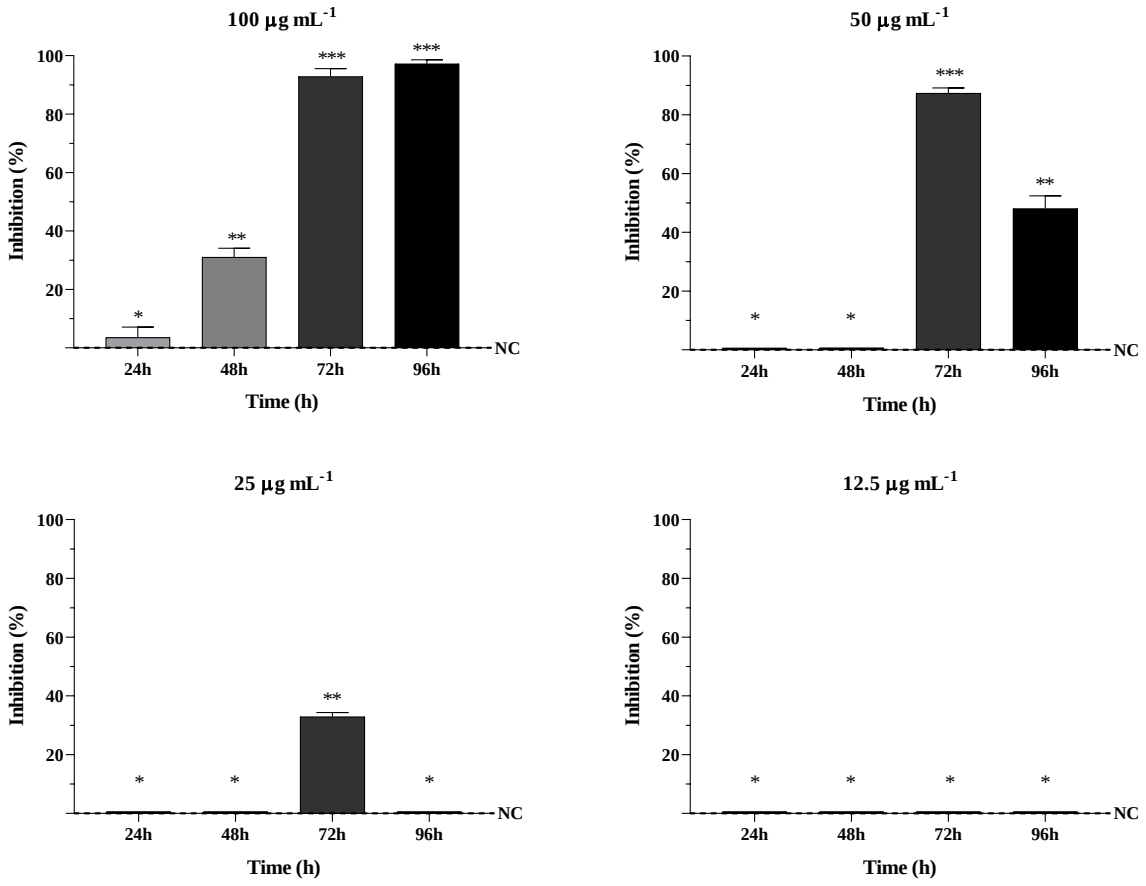


Fig. 3 Inhibitory effect of cyclopaldic acid after 72h (**a**) and 96h (**b**) of contact with *Rhizoctonia solani*. NC: negative control of *Rhizoctonia solani*. Different letters denote significant differences between group means according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison between treatments with a confidence interval of 95% (α = 0.05).

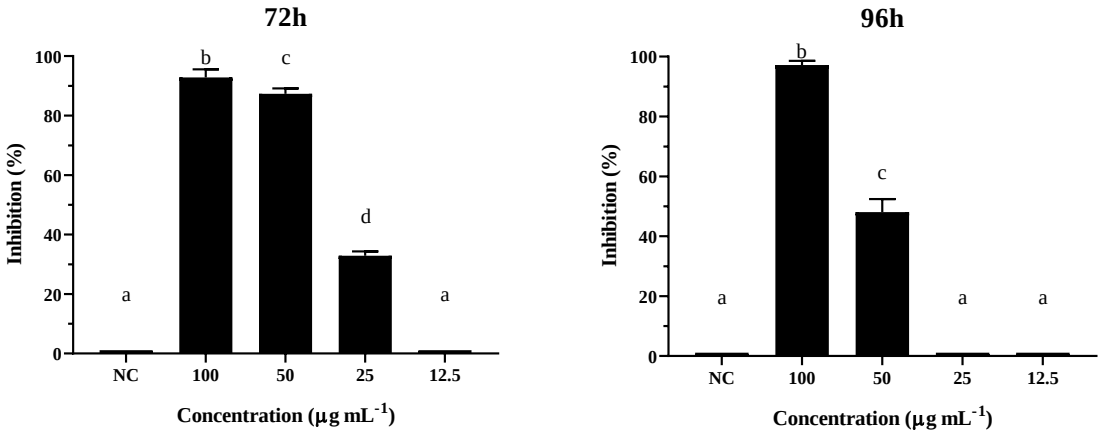


Fig. 4 Growth Inhibition (%) of *Macrophomina phaseolina* by different concentrations of cyclopaldic acid *in vitro* over time. Data shown as means and standard deviation. NC: negative control of *Macrophomina phaseolina*, **a**) 100 *µg mL-1* of cyclopaldic acid, **b**) 50 µ*g mL-1* of cyclopaldic acid, **c**) 25 *µg mL-1* of cyclopaldic acid, **d**) 12.5 *µg mL-1* of cyclopaldic acid. Differing signals (*) denote significant differences between group means according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison between treatments with a confidence interval of 95% (α = 0.05).

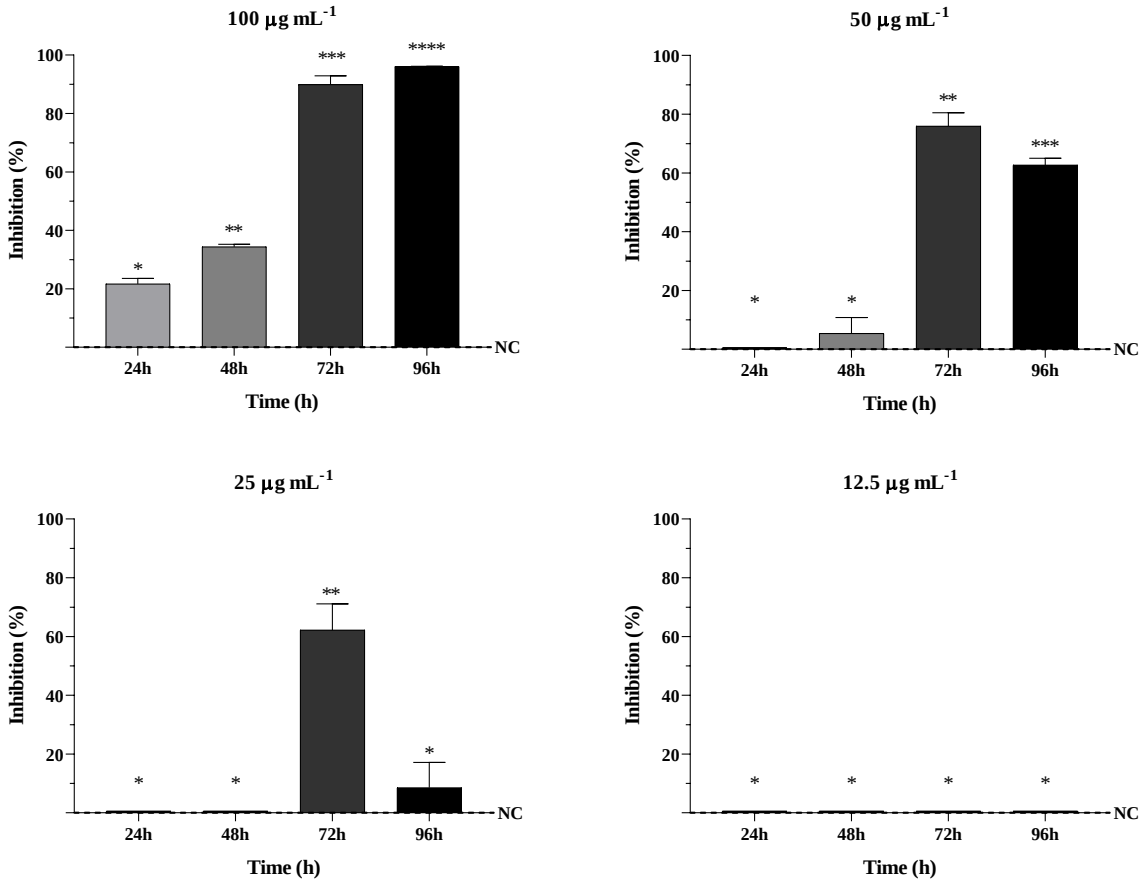
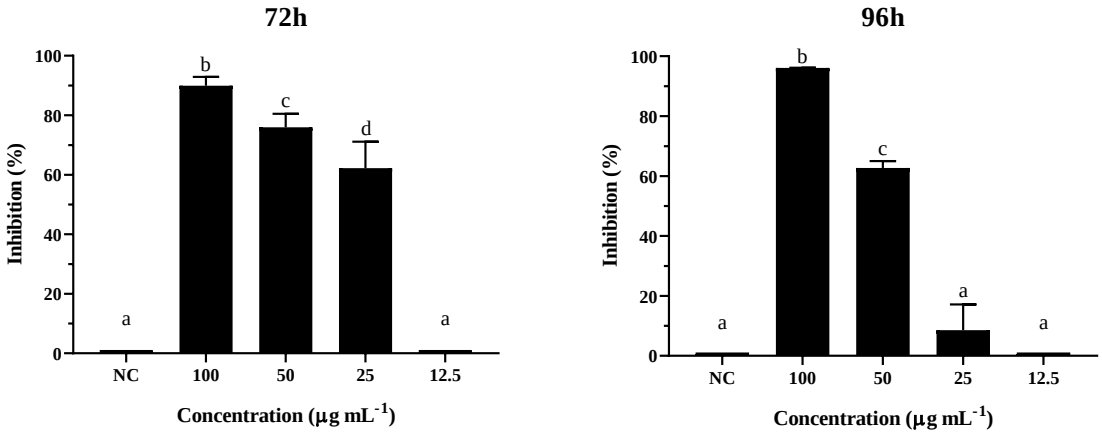


Fig. 5 Inhibitory effect of cyclopaldic acid after 72h (**a**) and 96h (**b**) of contact with *Macrophomina phaseolina*. NC: negative control of *Macrophomina phaseolina*. Different letters denote significant differences between group means according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison between treatments with a confidence interval of 95% (α = 0.05).



2 MATERIAL SUPLEMENTAR

Supplementary Material

Cyclopaldic acid produced by an Antarctic marine *Penicillium*: isolation and *in vitro* activity against phytopathogenic fungi

Gabrielle Vieira[1], Lara Durães Sette[1], Derlene Atilli de Angelis[2], Daiane Cristina Sass[1]*,

[1]Department of General and Applied Biology, São Paulo State University, Rio Claro, Brazil

*Corresponding author: daiane.sass@unesp.br

1. Culture conditions for secondary metabolites production by the fungal strain

Penicillium sp. CRM 1540 was reactivated in 2% malt extract agar plates (60 x 15 mm) and incubated at 15 ºC for 7 days (x3). Following reactivation, three plugs of mycelium + agar (5 mm x 5 mm) were transferred from the culture borders to 250 mL Erlenmeyer containing 150 mL of liquid 2% malt extract medium (x15) and incubated at 15 ºC and 150 rev min^{-1} for 20 days for secondary metabolite production.

2. Extraction and fractionation of *Penicillium* CRM 1540 crude extract

Fungal biomass was transferred to a vacuum filtration system and the culture media extracted by liquid/liquid partition with thrice the volume of EtOAc. The extraction process was repeated five times. The solvent was removed by reduced pressure evaporation to yield 363.90 mg of crude extract.

An aliquot (900 µL) of the crude extract was dissolved in MeOH (60 mg mL^{-1}) and subjected to reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm × 25 cm × 7 µm column, 20 mL min^{-1} gradient elution over 30 min from 90%–0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) and DAD detection at 210, 254 and 290 nm to yield fractions which were combined based on UPLC-DAD-QTOF analysis.

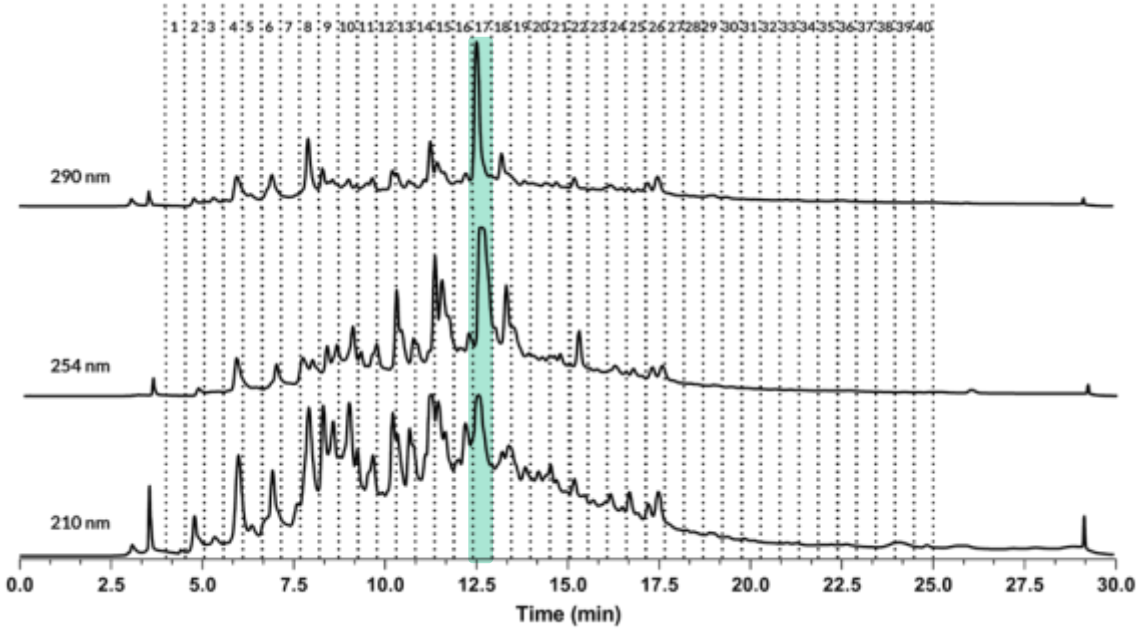


Figure S1 Fractionation process of the crude extract of *Penicillium* sp. CRM 1540. C_8 preparative column and mobile phase: 90%-0% H_2O/MeCN with a constant isocratic

0.01% TFA, 20 mL min^{-1}, 30 min. Highlighted fraction corresponds to cyclopaldic acid.

3. Spectroscopic characterization of Cyclopaldic acid

White powder; 239.2365 $[M+H]^+$ (calcd. for $C_{11}H_{11}O_6$, 239.236) (Figure S2); NMR (400 MHz, DMSO-*d6*, $CDCl_3$) see Table S1 and Figures S3 – S9;

a. Mass Spectrometry

Chromatography analysis was carried out in a UHPLC system (Agilent 1290 Infinity II, Agilent Technologies) composed of a binary pump (G7120A – *High speed Pump*), autoinjector and column chamber (G7129B – 1290 *Vialsampler*) and ultraviolet detector (G7114B – 1260 *Infinity* II – VWD model). The UHPLC system was coupled with a high-resolution QqTOF mass spectrometer (Bruker Daltonics - Impact, Rheinstetten, Germany) with an electrospray ionization source (LC-HRMS). Data was acquired and processed with the Data Analysis® software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). The experiment was carried out in positive and negative ionization mode for a mass setup from 100 to 1000. Ion source conditions were as follows: nebulizer gas: 3 bar; drying gas flow: 8 L min^{-1}; drying gas temperature: 180 ºC; endplate and capillary voltage: 500 V and 4500 V, respectively. Sodium formate 1 mM was used for the calibration of the MS with mass references of 100-1500. The data were recalibrated with the same conditions post-run.

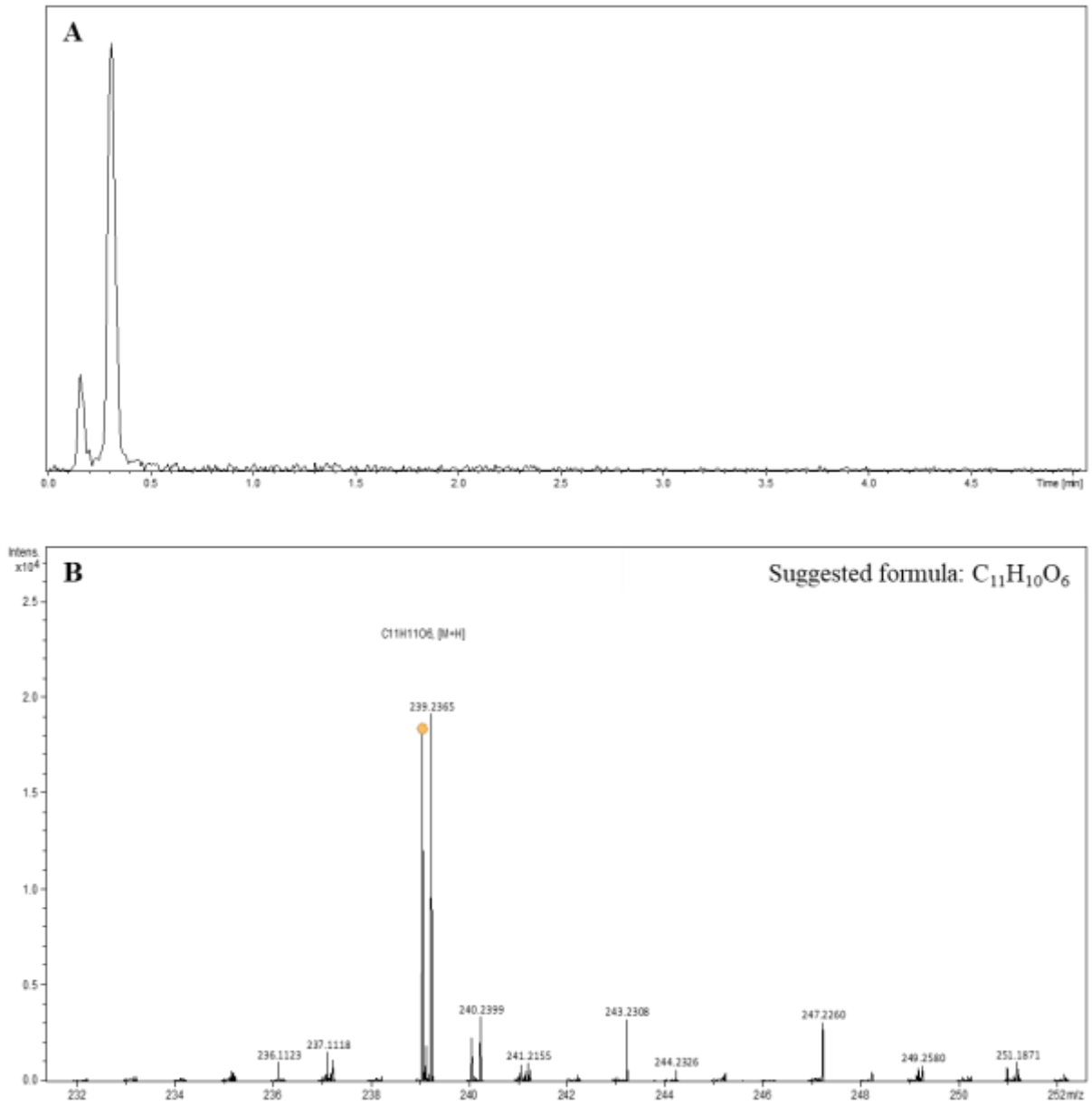


Figure S2 LCMS chromatogram and HRESI spectra of F17. Suggested molecular formula of $C_{11}H_{10}O_6$. HRMS m/z 239.2365 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{11}H_{11}O_6$, 239.236).

b. Nuclear Magnetic Resonance

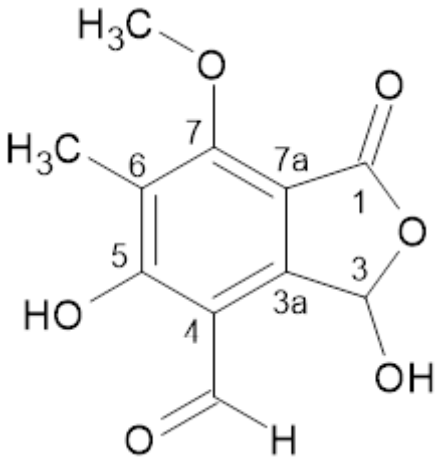


Table S1 1D and 2D NMR (400 MHz) data for cyclopaldic acid.

#C	Experimental Data						Literature Data[1]	
	DMSO-*d6*					$CDCl_3$	$CDCl_3$	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	∫	COSY	^1H-^{13}C HMBC	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	165.1						167.5	
2								
3	95.4	6.8	1	8,36	1	6.79	96.0	6.8
3A	152.4						153.7	
4	111.5						112.3	
5	165.46						166.0	
6	120.2						121.5	
7	161.45						163.4	
7A	109.60						111.0	
CHO	192.9	10.13	1		4,5,6	10.20	194.7	10.21
CH_3	8.05	2.09	3		4,5,6,7	2.19	8.1	2.16
OCH_3	62.3	4.06	3		7	4.12	63.1	4.2
OH-3		8.36	1	6,8	3, 3a	2.04/H_2O	-	H_2O
OH-5		12.06	1			12.28	-	12.29

1(ACHENBACH *et al.*, 1982)

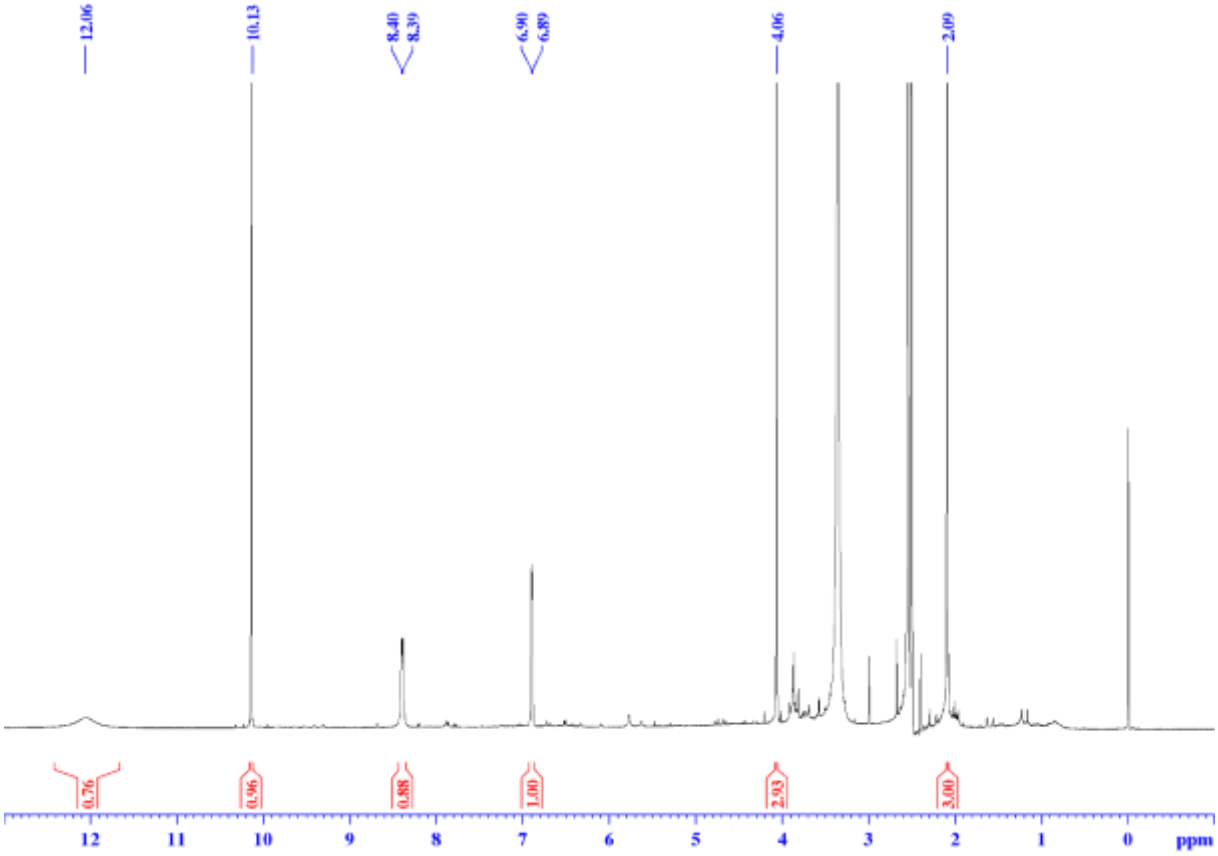


Figure S3 ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid

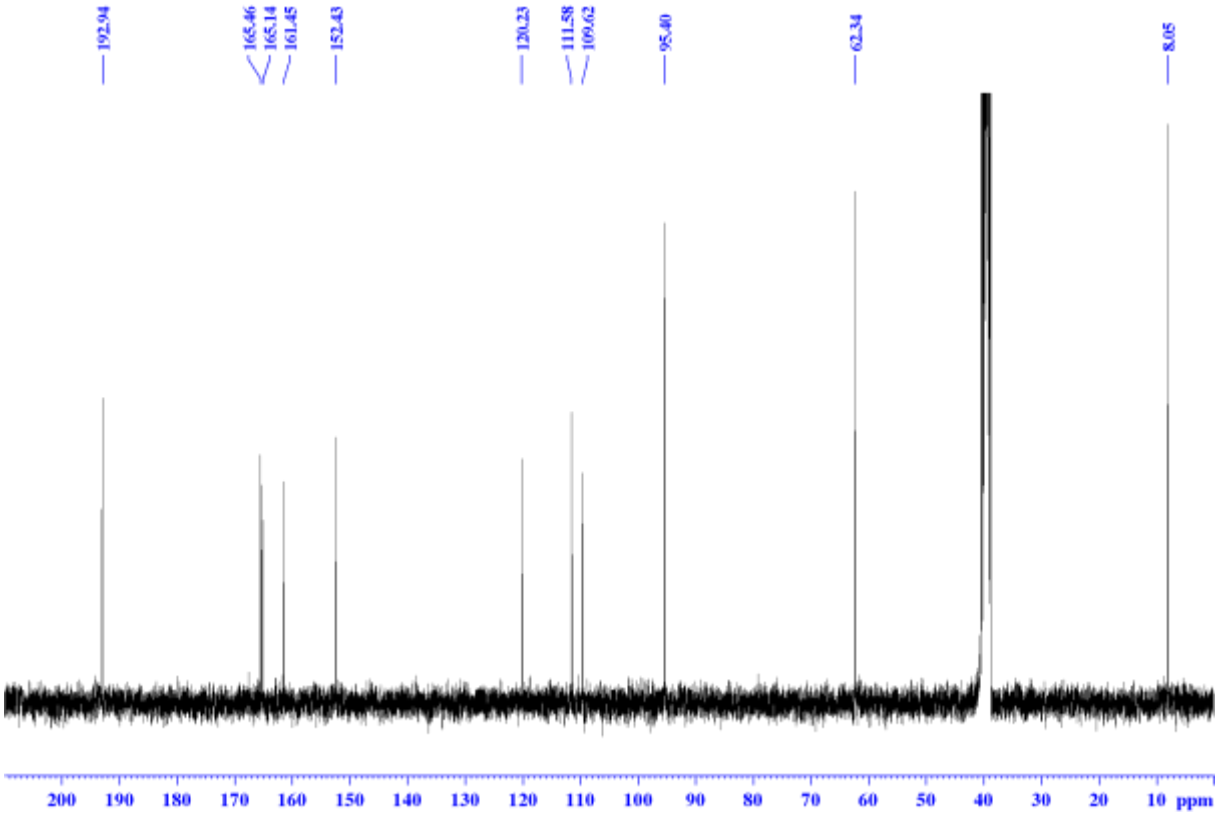


Figure S4 ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid

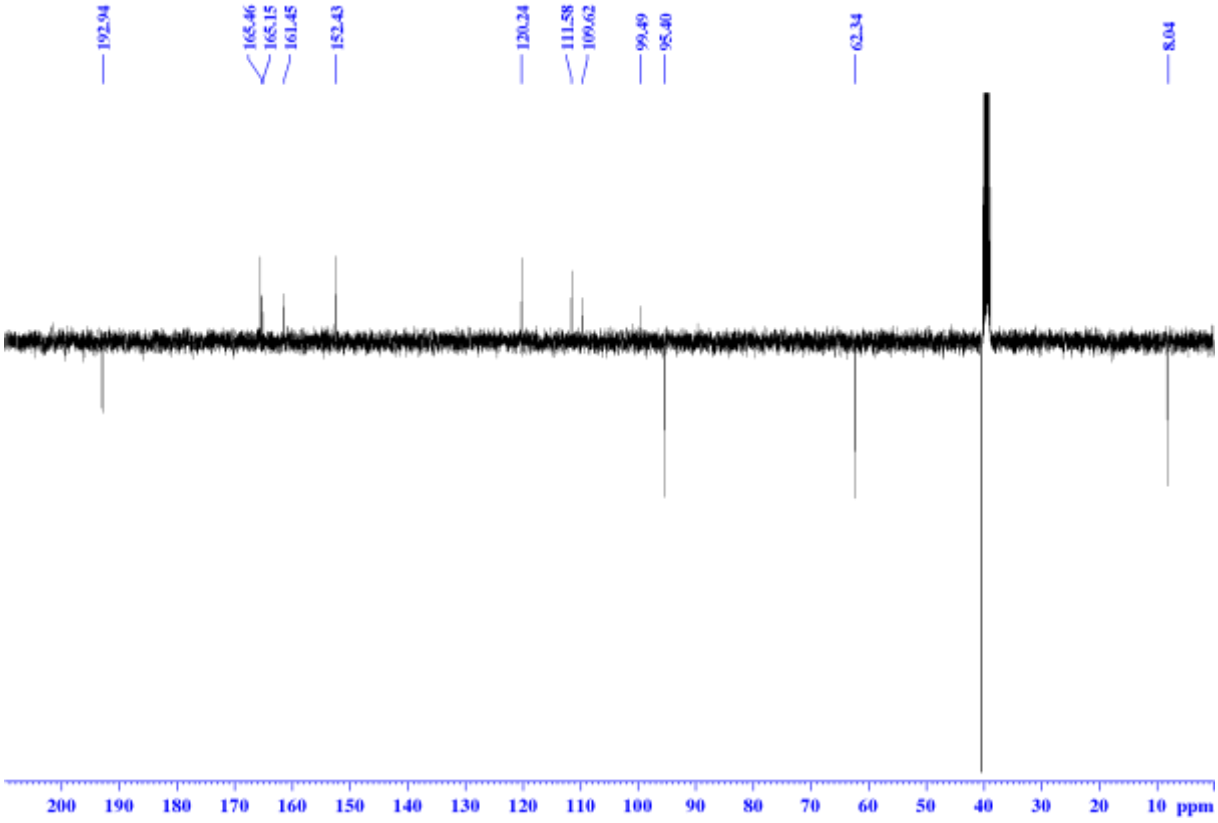


Figure S5 ^{13}C Attached-Proton-Test NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of cyclopaldic acid

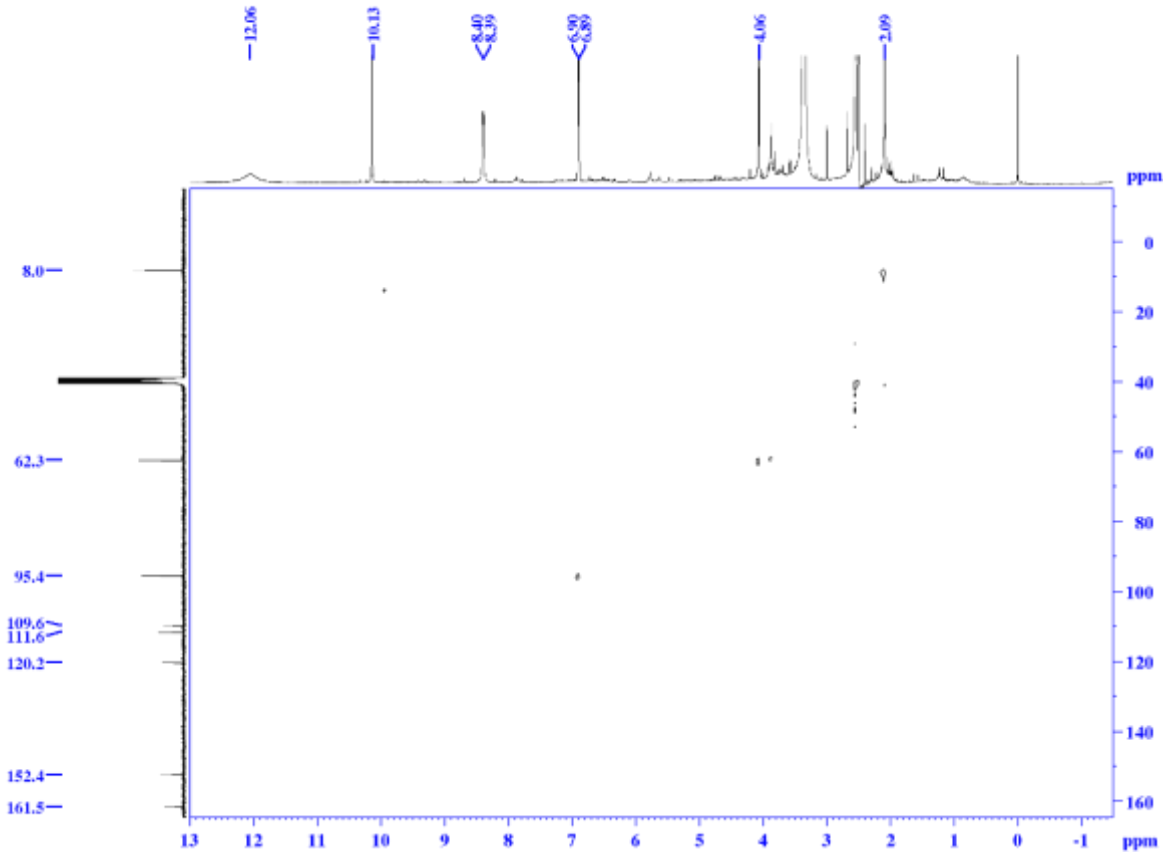


Figure S6 2D NMR HSQC (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid

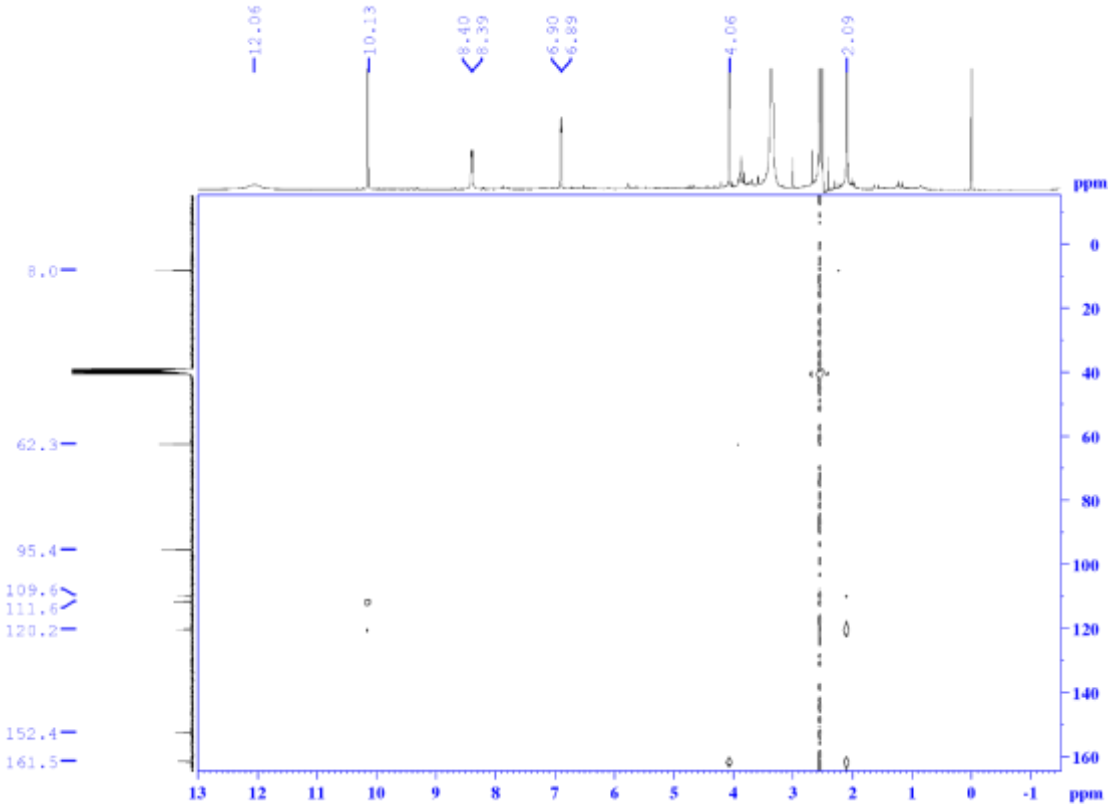


Figure S7 2D NMR HMBC (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid

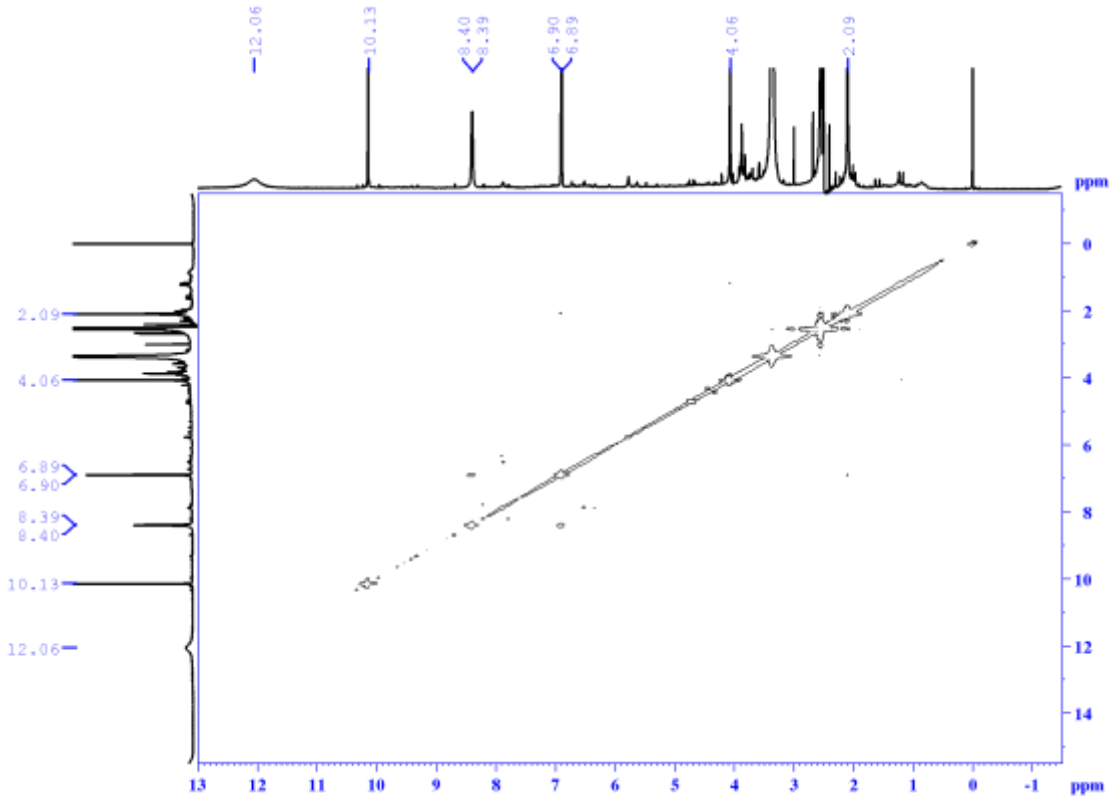


Figure S8 2D NMR COSY (DMSO-d_6) for cyclopaldic acid

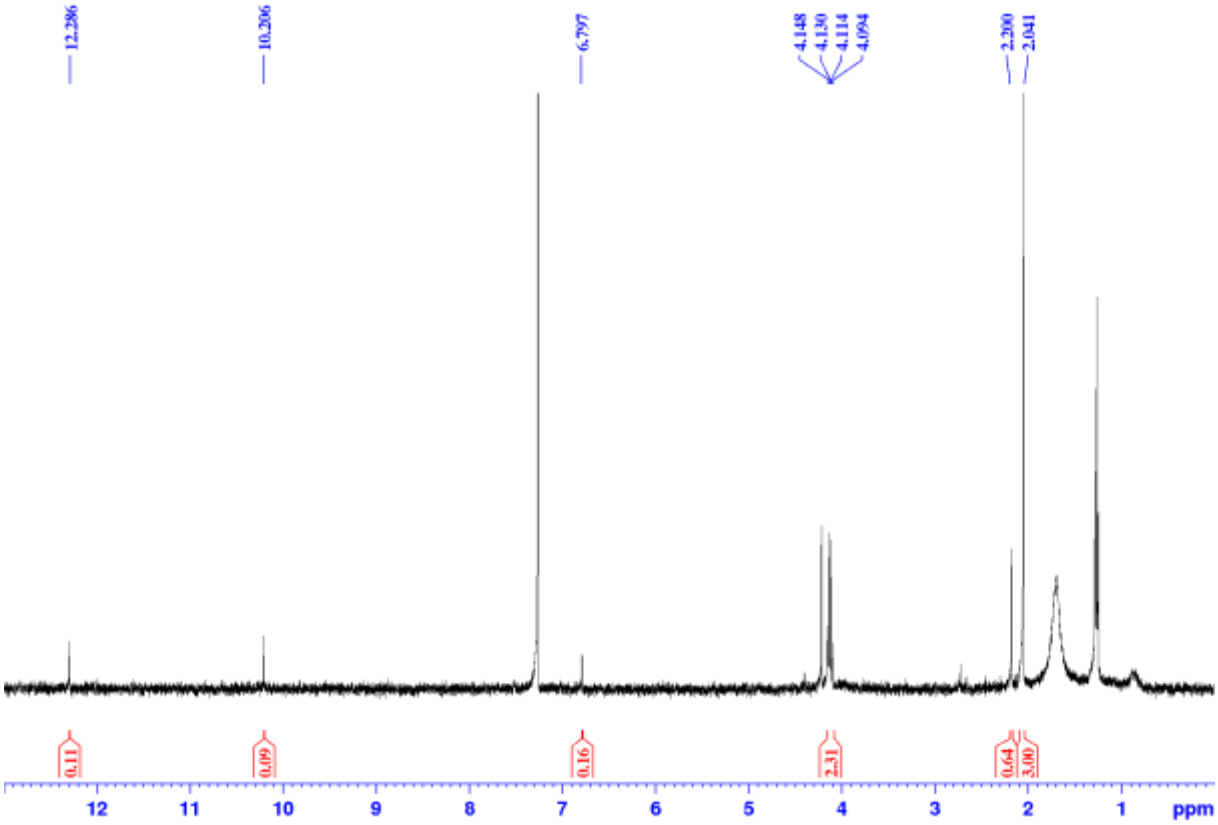


Figure S9 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of cyclopaldic acid

4. Antifungal Activity Assay

Table S2 Inhibitory activity (%) *in vitro* of cyclopaldic acid in *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina.*

Phytopathogen	Time (h)	Cyclopaldic acid (µg mL^{-1})			
		100	50	25	12.5
Rhizoctonia solani	24	3.55 ± 3.55	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	48	31.02 ± 3.08	0.06 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	72	92.83 ± 2.72	87.33 ± 1.78	32.85 ± 1.50	0.00 ± 0.00
	96	97.18 ± 1.40	48.07 ± 4.32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Macrophomina phaseolina	24	21.68 ± 1.86	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	48	34.42 ± 0.81	5.39 ± 5.39	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	72	89.94 ± 2.95	75.95 ± 4.56	62.25 ± 8.84	0.00 ± 0.00
	96	96.13 ± 0.02	62.70 ± 2.32	8.56 ± 8.56	0.00 ± 0.00

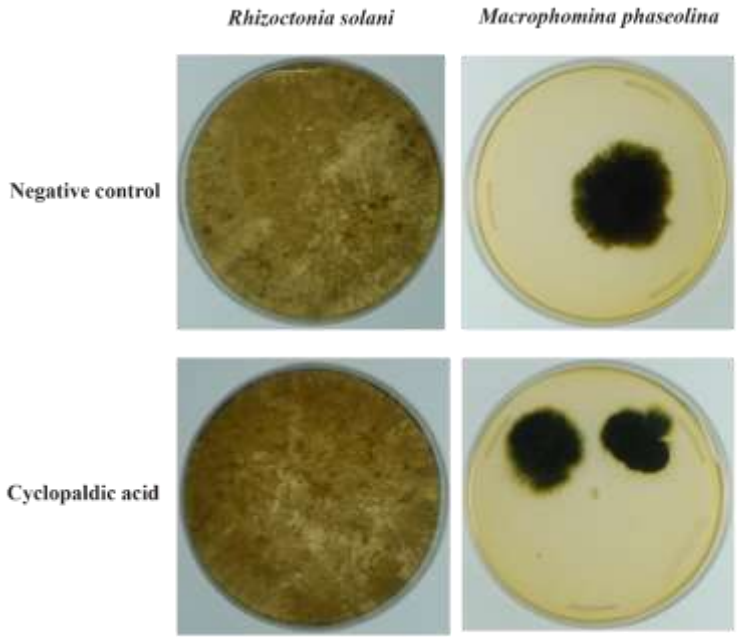


Figure S10 Evaluation of fungistatic activity of cyclopaldic acid against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. Four-day *R. solani* and seven-day *M. phaseolina* colonies developed on PDA medium after 96h of treatment with cyclopaldic acid at 100 µg mL^{-1}.

References

1. Achenbach H, Mühlenfeld A, Weber B, Kohl W, Brillinger G-U. 1982. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, XXVII[1] Cyclopaldsäure und 3-O-Methyl-cyclopolsäure, zwei antibiotisch wirksame Substanzen aus Aspergillus duricaulis/Investigations on Metabolites of Microorganisms, XXVII [1] Cyelopaldic Acid and 3-O-Methyl Cyc. Zeitschrift für Naturforschung B 37:1091-1097.

CAPÍTULO 5

IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-FURANO-2-CARBOXÍLICO DE *Penicillium* sp. CRM 1545A DE AMBIENTE MARINHO ANTÁRTICO

RESUMO

A eficiência e segurança ecológica de compostos químicos são qualidades indispensáveis para moléculas com aplicação nas áreas clínica, industrial e agricultural, por isso, os produtos naturais tem ganhado papel de destaque em pesquisas de bioprospecção. Assim, organismos considerados reservatórios de compostos naturais, como os fungos, tem sido explorados. E dentre os fungos, isolados de ambientes extremos ainda são consideravelmente pouco conhecidos. O gênero *Penicillium* é extremamente importante para a biotecnologia devido à seu potencial biossintético, sendo capaz de produzir compostos de diversas classes químicas com variadas aplicações. O ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico, um composto intermediário de interesse para a indústria de combustíveis renováveis, foi isolado a partir do extrato bruto do fungo de sedimentos marinhos *Penicillium* sp. CRM 1545A. A aplicação de análises de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas possibilitou a identificação desse composto com confirmação via comparação com a literatura. O relato de atividades biológicas dessa molécula é escasso, entretanto, pesquisas envolvendo a produção desse composto por outros microrganismos tem ganhado interesse na comunidade cientifica, uma vez que este apresenta valor agregado. Dessa forma, além de um reservatório de agentes antimicrobianos, o ambiente antártico é também uma fonte a ser explorada de microrganismos para a biotransformação de compostos de toxicidade mais elevada e de interesse em processos como a produção de polímeros.

Palavras-chave: Extremófilos; Biotransformação; *Penicillium*; HFMA; Produtos naturais.

CHAPTER 5

IDENTIFICATION OF 5-HYDROXYMETHYL-FURAN-2-CARBOXILIC ACID FROM *Penicillium* sp. CRM 1545A FROM THE MARINE ANTARCTIC REGION

ABSTRACT

The efficiency and ecological safety of chemical compounds are essential qualities for molecules with application un clinical, industrial and agricultural areas therefore, natural products have gained a prominent role in bioprospecting researches. Thus, organisms considered to be reservoirs of natural compounds, such as fungi, have been explored recently. Among fungi, many isolates from extreme environments are still relatively unknown. The *Penicillium* genera is extremely important for biotechnology due to its biosynthetic potential, being able to produce compounds of different chemical classes with different application. 5-hydrocymethyl-furan-2-carboxilic acid, an intermediate compound of interest to the renewable fuel industry, was isolated from the crude extract of the marine sediment fungus *Penicillium* sp. CRM 1545A. The application of nuclear magnetic resonance and mass spectrometry analysis allowed the identification of this compound which was confirmed by literature comparison. Reports on the biological activities of this molecule are scarce, however, researches involving the production of this compound by microorganisms are of interest to the scientific community, due to the added value of this molecule. Thus, besides being a source of antimicrobial agents, the Antarctic environment is also a source of microorganisms to be explored for the biotransformation of compounds of high toxicity and of importance in the production of polymers.

Keywords: Extremophiles; Biotransformation; *Penicillium;* HFMA; Natural products.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos para aumentar o rendimento e a eficiência agrícola é essencial para que a demanda crescente gerada pelo aumento da população seja suprida (BONNER; ALAVANJA, 2017). Dentre as ferramentas empregadas para prevenir a queda da produtividade ao redor do mundo, está o uso de pesticidas para proteção de culturas contra insetos, ácaros, bactérias e fungos.

A aplicação contínua desses produtos, no entanto, pode gerar acúmulo no solo e o aparecimento de linhagens tolerantes ou resistentes e, nesse contexto, pesticidas derivados de produtos naturais tem ganhado popularidade devido à sua eficiência e segurança ecológica (LI *et al.*, 2021).

Atualmente, os microrganismos ainda são considerados um reservatório inexplorado para biomoléculas promissoras com variada ação estrutural e funcional antimicrobiana. O estudo de fungos, em particular, foi impulsionado pela descoberta de Penicilina G em 1928 e revelou diversos metabólitos ativos como enfumafungina, favolona, coprinuslactona, ácido microporênico A, retapamulina e rubrolida S, entre outros.

A exploração de compostos produzidos por microrganismos e seu efeito são importantes na era atual de resistência antimicrobiana devido à sua biodiversidade (AMANING *et al.*, 2022). Um dos gêneros mais comuns de fungos, *Penicillium* tem distribuição mundial e é encontrado nos mais diversos ambientes, com 483 espécies atualmente descritas.

Os indivíduos desse gênero são de grande importância para as áreas de biotecnologia, alimentos, patologia de plantas e medicina devido à sua capacidade de produzir um amplo espectro de metabólitos secundários como micotoxinas, compostos antibacterianos e antifúngicos, imunossupressores e outras moléculas biologicamente ativas. O potencial biosintético de *Penicillium* tornou esse um gênero largamente explorado como fonte de produtos naturais ativos (DE CARVALHO *et al.*, 2021; EL HAJJ ASSAF *et al.*, 2020).

O oceano, comparado aos ambientes terrestres, é considerado uma fonte rica e subexplorada de moléculas estruturalmente novas devido às condições de baixa temperatura, alta pressão, luminosidade reduzida. Os microrganismos marinhos tem inegavelmente provado serem um reservatório vital de produtos naturais

(TAKAHASHI *et al.*, 2017). Dentro desse grupo, isolados do gênero *Penicillium* de ambientes marinhos extremos são descritos na literatura como sensíveis a composição de meios de cultivo e assim, mais propensos a produção de novos compostos (CHEN; WANG; PEI, 2014; MA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020).

Entre 1991 e 2014, 390 novos produtos naturais produzidos por isolados do gênero *Penicillium* de origem marinha foram descritos. A maioria desses fungos foi isolada de sedimentos (41%) e de esponjas (15%), e seus compostos apresentam estruturas diversas, incluindo policetídeos (48%), compostos nitrogenados (25%), terpenóides e esteróides (13%), e outros (14%). Dentre esses, 58% apresentaram alguma atividade biológica e 42% não teve atividade relatada (MA *et al.*, 2016).

Os policetídeos compreendem uma classe extensa e de grande importância de moléculas naturais produzidos por plantas, bactérias e fungos, incluindo antibióticos, mico toxinas e pigmentos, com atividades anticâncer, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória sendo relatadas na literatura (TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2021). Entre os policetídeos produzidos por fungos, lovastatina, estrobirulina A e a fumagilina são compostos benéficos e utilizados nos campos da medicina e agricultura (SKELLAM, 2022).

Os macrolídeos, grupo de policetídeos constituídos por anéis de diferentes tamanhos e caracterizados pela presença de um grupo lactona, são compostos com diferentes bioatividades como atividade antiviral, antiparasítica, antifúngica, antibacteriana, imunosupressiva, herbicida e citotóxica (EVIDENTE, 2022). Considerando a necessidade do uso de moléculas alternativas, os organismos de ambientes marinhos produtores de macrolídeos, como fungos filamentosos, são uma fonte de metabólitos importante a ser investigada (KARPIŃSKI, 2019).

1.1. Objetivos

Este Capítulo teve como objetivo:

a. Elucidar a estrutura de um composto fracionado do extrato produzido por *Penicillium* sp. CRM 1545A em Malte 2% por meio de técnicas espectroscópicas (LC-MS e RMN).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Detalhes gerais dos experimentos

Penicillium sp. CRM 1545A, isolado de sedimentos marinhos, foi cultivado em meio líquido Malte 2% por 20 dias à 15 ºC e 150 rpm para produção de metabólitos secundários (Capítulo 1, item *2.2.1* e **2.3**).

O extrato produzido, CRM 1545A-M, foi fracionado em coluna preparativa de fase-reversa C8 conforme descrito no Capítulo 1, item **2.5**. As frações foram analisadas quanto à similaridade e agrupadas, dando origem a 40 frações finais.

2.2. Identificação da fração F4

O extrato bruto foi analisado em sistema UPLC-DAD-QTOF na Universidade de Queensland, Austrália e a partir do tempo de retenção do composto principal de F4, a massa da molécula foi detectada.

A fração F4 foi submetida à análise de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-*d6* para elucidação estrutural. Foram obtidos espectros de 1D de ^{1}H e ^{13}C, e dados 2D como COSY, HSQC e HMBC.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detalhes gerais dos experimentos

Após cultivo em larga escala, foram obtidos 222,20 mg do extrato bruto de *Penicillium* sp. CRM 1545A. A Tabela 3 apresenta os dados de massa (mg) das frações obtidas pelo fracionamento de 100 mg extrato CRM 1545A-M.

Tabela 3. Frações da purificação do extrato CRM 1545A-M após agrupamento

Fração ID	Massa (mg)	Fração ID	Massa (mg)
F1	0,2	**F21**	1,5
F2	7,3	**F22**	0,8
F3	6,2	**F23**	1,0
F4	3,7	**F24**	1,1
F5	3,1	**F25**	0,6
F6	2,3	**F26**	1,0
F7	4,2	**F27**	1,0
F8	2,1	**F28**	0,8
F9	0,9	**F29**	0,4
F10	3,5	**F30**	0,7
F11	3,5	**F31**	0,1
F12	2,5	**F32**	0,9
F13	3,4	**F33**	0,2
F14	2,9	**F34**	1,2
F15	3,3	**F35**	1,1
F16	1,9	**F36**	0,7
F17	3,5	**F37**	1,2
F18	1,5	**F38**	0,6
F19	2,4	**F39**	0,8
F20	0,7	**F40**	2,5

3.2. Identificação da fração F4

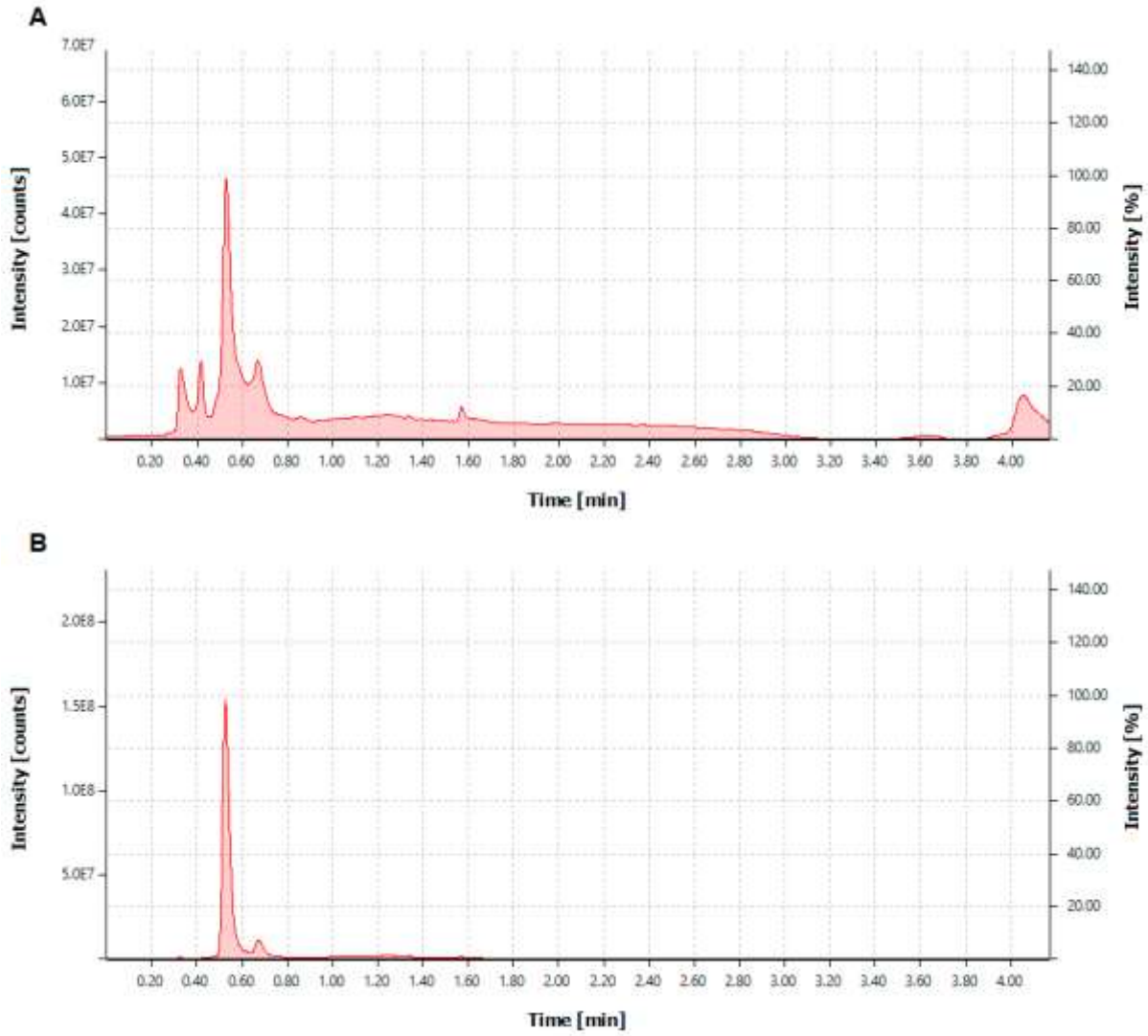
Análise de pureza de F4 em 210 e 254 nm revelou a presença de um componente principal de F4, com absorção maior em 254 nm e com tempo de retenção 0,52 min (Figura 24). Com base na análise de massas do extrato de origem para o sinal em 0,52 min, o íon sodiado do composto foi detectado em 165,04 *m/z* $[M+Na]^+$, e um sinal em 143,02 *m/z* $[M+H]^+$ também foi detectado. (Figura 25).

A massa da molécula portanto, foi definida como 142,07 Da (íon monoisotópico 142,07 *m/*z). Os dados de espectrometria de massas em conjunto com os dados de RMN, sugeriram a fórmula $C_6H_6O_4$ para o composto F4. Os espectros de ressonância magnética nuclear (Tabela 4, Figuras 26-28) corroboraram para a elucidação da molécula como ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico, produto principal da oxidação de hidroximetilfurfural pela reação de Maillard. O ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico (HMFCA) é um composto com absorção máxima em 255 nm, e sua fórmula é $C_6H_6O_4$ com massa monoisotópica de 142,11 *m/z* (JÖBSTL; HUSØY; ALEXANDER; BJELLAAS *et al.*, 2010; KIMURA; TANI; HAYASHI; OHTANI *et al.*, 2007).

O ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico (HMFCA), originalmente isolado de cultivos de *Penicillium italicum* e *Pyricularia grisea*, pertence ao grupo dos policetídeos e a classe dos furanos (JADULCO *et al.*, 2001; MUNEKATA; TAMURA, 1981; NCBI, 2022).

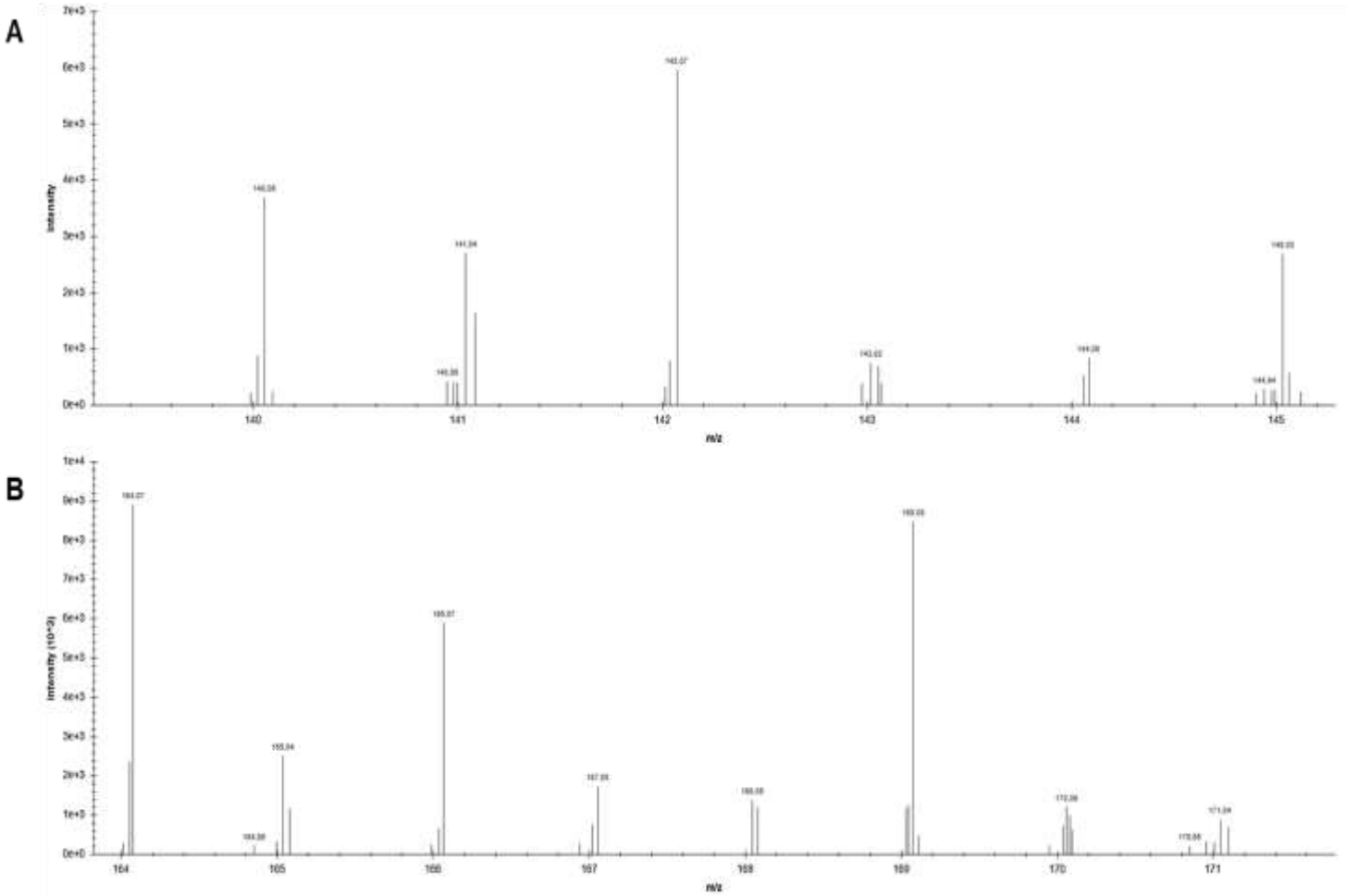
De acordo com o banco de dados LOTUS (Natural Products Occurence Database), essa molécula é produzida pelas espécies de plantas *Homalomena occulta* e *Rehmannia glutinosa*, pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* e pelos fungos de origem marinha *Wardomyces anomalus*, *Cladosporum herbarum*, *Apiospora montagnei* e *Chaetomium* sp., além de também ter sido detectada em cultivo de *Aspergillus* sp. (ABDEL-LATEFF, 2008; ABDEL-LATEFF *et al.*, 2003; JADULCO *et al.*, 2001; KIMURA *et al.*, 2007; KLEMKE *et al.*, 2004; WON *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Nenhum relato de produção de HMFCA por linhagens de *Penicillium* da região terrestre ou marinha da Antártica foi encontrado.

Figura 24. Cromatogramas DAD da fração F4 após agrupamento.



(**A**): Cromatograma de F4 obtido em 210nm. (**B**): Cromatograma de F4 em 254 nm. Observa-se que as impurezas tem menor absorção em 254 nm, enquanto que o composto predominante de F4 apresenta maior absorção em 254 nm.

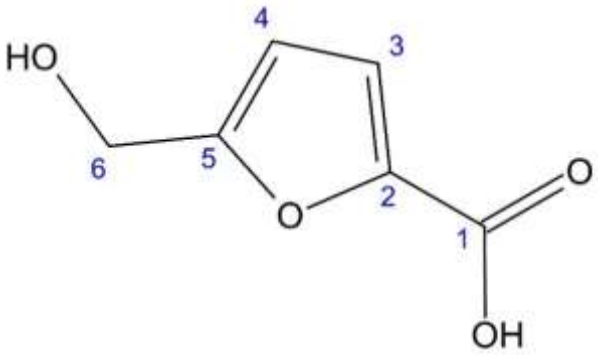
Figura 25. Espectrometria de massas da fração F4 para composto com TR = 0,52 min.



(**A**): Sinal do íon monoisotópico em 142,07 *m/z* e do íon $[M+H]^+$ em 143,02 *m/z* para o composto principal de F4. (**B**): Sinal do íon sodiado $[M+Na]^+$ em 165,04 *m/z*.

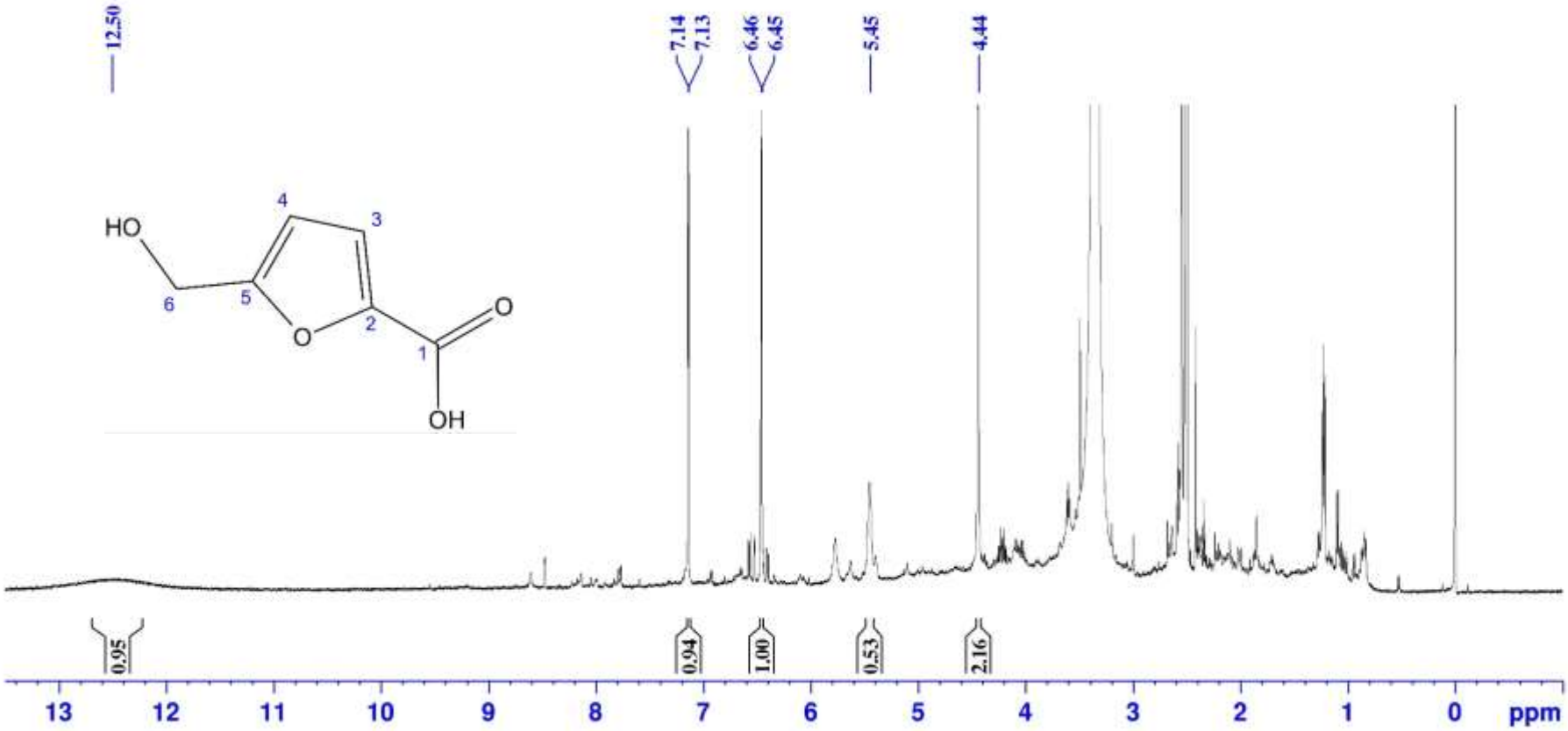
Tabela 4. Ressonância Magnética Nuclear para F4

ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico



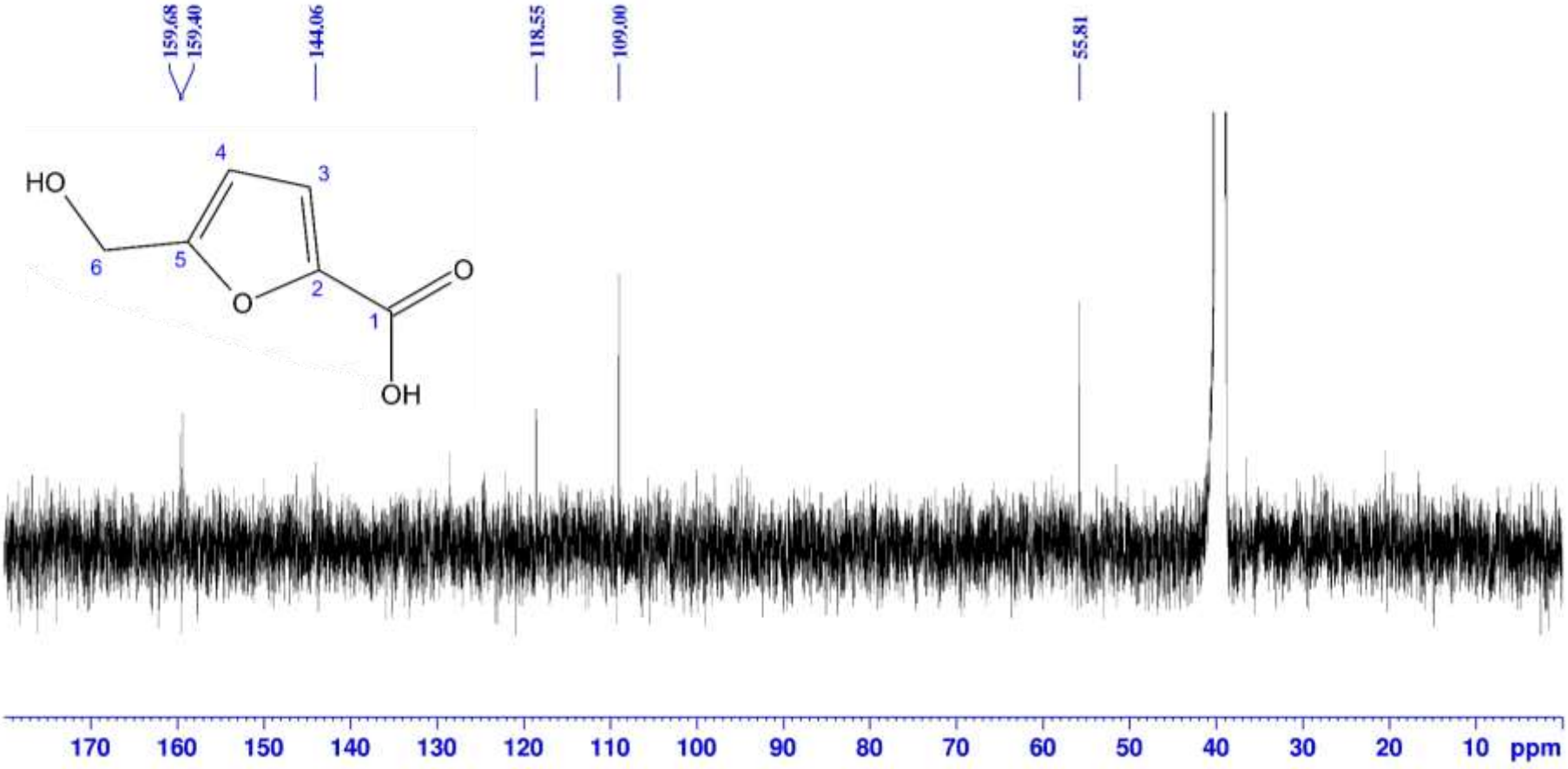
#	δC (ppm)	δH (ppm)	∫	COSY	HMBC
1-C**OOH**	159,68	-	-	-	
2-C	159,40	-	-	-	
3-C**H**	118,55	7,14	1	4,44 / 6,46	4, 5, 2
4-C**H**	109,00	6,46	1	4,44 / 7,14	3, 5, 1
5-C**-CH$_2$**	144,06	-	-	-	
6-C**H$_2$OH**	55,81	4,44	2	5,45	4, 1
CH$_2$OH	-	5,45	1	4,44	
-COOH	-	12,50	1	-	1

Figura 26. Espectro ^{1}H de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-*d6*



1D 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ: 12,50 (s, 1H), 7,14 (d, J = 3,49 Hz, 1H), 6,46 (d, J = 3,32 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,44 (s, 2H). Carbonos numerados conforme Tabela 4.

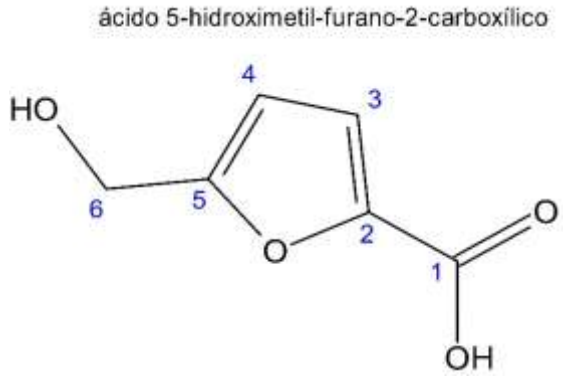
Figura 27. Espectro ^{13}C de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-*d6*



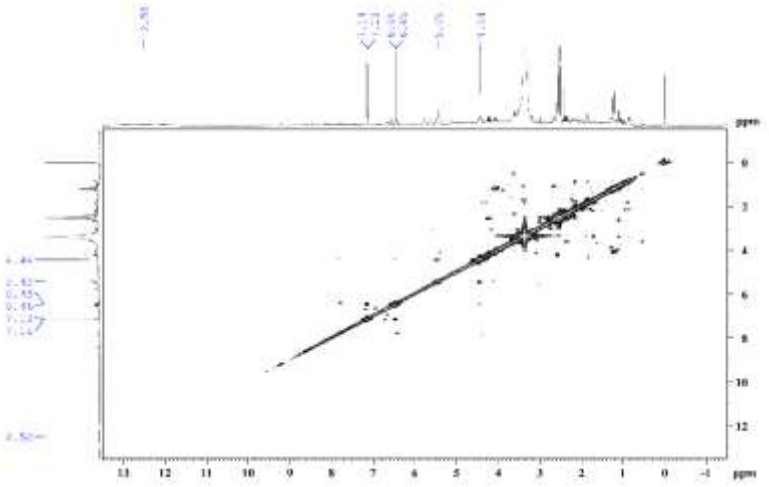
1D 13C RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ: 159,68 (1-*C*OOH), 159,40 (2-*C*O), 144,06 (5-*C*CH_2OH), 118,55 (3-*C*H), 109,00 (4-*C*H), 55,81 (6-*C*H_2OH). Carbonos numerados conforme Tabela 4.

Figura 28. Espectros 2D de ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico em DMSO-*d6*.

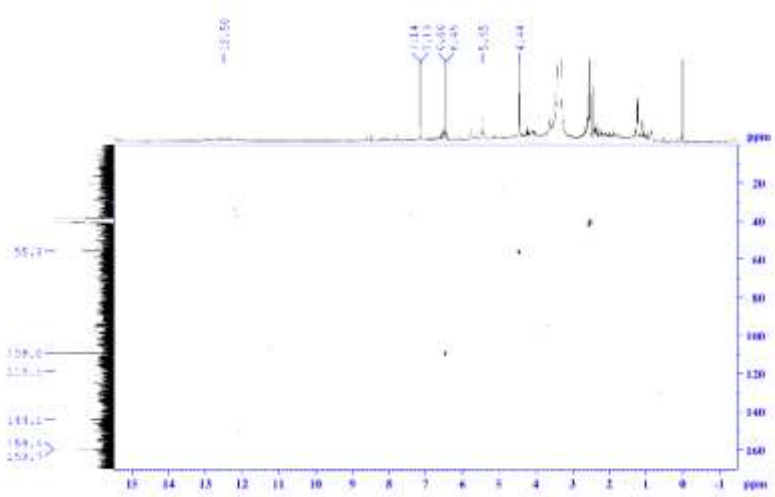
A



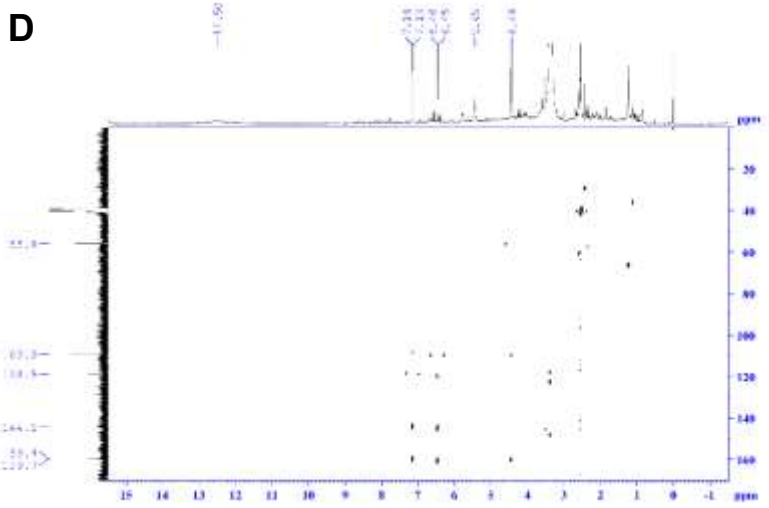
B



C



D



(A): Numeração dos carbonos da molécula de acordo com a Tabela 4. **(B):** Dados HMBC de acoplamento H-H. **(C):** Dados HSQC para acoplamento H-C. **(D):** Dados HMBC para acoplamento H-C.

Quanto às atividades biológicas desse composto, Munekata e Tamura (1981) mostraram a citotocixidade de HMFCA em células SV-40 transformadas *in vitro* e o potencial antitumoral da molécula em células Sarcoma 180 *in vivo*.

De acordo com Kimura *et al.* (2007), o ácido hidroximetil-furano-2-carboxílico tem atividade nematicida contra *Caenorhabditis elegans*, com mortalidade de 86% à 2 mM, 10% à 0,2 mM e 4% à 0,02 mM após 2 dias de incubação; e atividade nemacitida contra *Bursaphelenchus xylophilus* proporcional ao tempo de exposição de 4 à 14 dias, com a maior mortalidade alcançada após 14 dias de incubação: 4% à 0,02 mM, 48% à 0,2 mM e 73% à 2,0 mM.

Em ensaios de fitotoxicidade, não foi detectada atividade inibitória siginificativa em sementes de alface. Para plantulas de cenoura, houve promoção do crescimento radicular em 0,02 mM e nenhuma promoção foi observada nas demais concentrações.Para mudas de arroz, houve promoção do crescimento das raízes e no comprimento total das mudas em 0,2 mM e 2 mM. HMFCA, isolado de *Cladosporium herbarum* cultivado em meio Malte por 28 dias e extraído com AcOEt, apresentou atividade inibitória em *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, formando halos de inibição de 7 mm em ambos após 24h de incubação em 5 µg (JADULCO *et al.*, 2001).

O HMFCA é um produto da biotransformação de HMF (5-hidroximetilfurfural), um composto importante na industria devido à sua versatilidade (anel furano, grupo aldeído e grupo hidroximetil), constituindo uma alternativa à produção de químicos de valor agregado, polímeros e biocombustíveis à partir de biomassa renovável (GODAN *et al.*, 2019; ZHANG; ZONG; LI, 2017). A biotransformação de HMF via oxidação do grupo aldeído dá origem à HMFCA, que é considerado um novo monômero para a sintese de poliésteres (BECERRA *et al.*, 2022; XIE *et al.*, 2022).

O foco das pesquisas em HMFCA por muito tempo se baseou no uso de métodos químicos de conversão de HMF para HMFCA, principalmente utilizando metais nobres como catalistas (XIE *et al.*, 2022).

O processo químico de transformação tem elevado custo, uma vez que faz uso de solventes orgânicos e altas temperatura e pressão. Em contrapartida, a oxidação biocatalítica tem ganhado espaço por apresentar alta eficiência e ser ecologicamente segura, além de ocorrer em condições mais brandas (BECERRA *et al.*, 2022; GODAN *et al.*, 2019; ZHANG; ZONG; LI, 2017).

No campo da biotransformação, um desafio encontrado é a elevada toxicidade e reatividade de HMF. O substrato causa inibição dos biocatalisadores, dificultando a produção direta do produto de interesse quando em altas concentrações. O uso de células íntegras consistui então uma vantagem ao uso de enzimas, pois oferece uma barreira ao volume de toxicidade de HMF (BECERRA *et al.*, 2022; PAN *et al.*, 2020).

Assim, grande parte dos estudos envolvendo HMFCA são direcionados para a descoberta de microrganismos capazes de biotransformar HMF em HMFCA com eficiência e na otimização do processo de conversão utillizando bactérias e leveduras (BECERRA *et al.*, 2022; GODAN *et al.*, 2019; PAN; WU; YAO; LIU *et al.*, 2020; ZHANG; ZONG; LI, 2017). O emprego de fungos filamentosos como biocatalisadores em sistema de células íntegras ainda é subrepresentado (TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2022). Estudos direcionados para a produção dos demais produtos da degradação de HMF tem atraído interesse, mas são escassos as pesquisas que focam na bioconversão de HMFCA por fungos (FELDMAN *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2020; RAN *et al.*, 2014) . Recentemente, apenas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* foram identificados como candidatos promissores na biotrasformaçãode HMF para HMFCA (RAJESH *et al.*, 2019; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2022).

4 CONCLUSÃO

Microrganismos de ambientes extremófilos possuem sistemas enzimáticos e biocatalíticos robustos devido às suas adaptações decorrentes das severas condições de seu ambiente de origem (DE CARVALHO, 2017; SHUKLA; SINGH, 2020). A produção do ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico por *Pencillium* CRM1545A e seu isolamento durante nossa investigação do metabolismo secundário de fungos marinhos de regiões extremas como a Antártica, abre mais uma alternativa na busca por fungos capazes de biotransformar HMF em HMFCA. A confirmação potencial do ácido 5-hidroximetil-furano-2-carboxílico como agente antimicrobiano ainda requer muito estudo, tanto na seleção de organismos-alvo para seu uso como no modo de ação da molécula nas bactérias relatadas na literatura, *B. subtilis* e *S. aureus*. O mesmo é requerido quanto ao seu uso como agente nematicida, antitumoral e como promotor de crescimento em plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATEFF, A. Chaetominedione, a new tyrosine kinase inhibitor isolated from the algicolous marine fungus *Chaetomium sp.* **Tetrahedron Letters**, 49, n. 45, p. 6398-6400, 2008/11/03/ 2008.

ABDEL-LATEFF, A.; KLEMKE, C.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Two New Xanthone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Wardomyces anomalus*. **Journal of Natural Products**, 66, n. 5, p. 706-708, 2003/05/01 2003.

AMANING DANQUAH, C.; MINKAH, P. A. B.; OSEI DUAH JUNIOR, I.; AMANKWAH, K. B. *et al.* Antimicrobial Compounds from Microorganisms. **Antibiotics**, 11, n. 3, p. 285, 2022-02-22 2022.

BECERRA, M. L.; LIZARAZO, L. M.; ROJAS, H. A.; PRIETO, G. A. *et al.* Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural and furfural with bacteria of *bacillus* genus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 39, p. 102281, 2022/01/01/ 2022.

BONNER, M. R.; ALAVANJA, M. C. R. Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security**, 6, n. 3, p. 89-93, 2017-08-01 2017.

CHEN, G.; WANG, H.-F.; PEI, Y.-H. Secondary metabolites from marine-derived microorganisms. **Journal of Asian Natural Products Research**, 16, n. 1, p. 105-122, 2014-01-02 2014.

DE CARVALHO, A. C.; OGAWA, C. Y.; DE CAMILLIS RODRIGUES, L.; DE MEDEIROS, L. S. *et al. Penicillium* genus as a source for anti-leukemia compounds: an overview from 1984 to 2020. **Leukemia & Lymphoma**, 62, n. 9, p. 2079-2093, 2021-07-29 2021.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. **Microbial Biotechnology**, 10, n. 2, p. 250-263, 2017-03-01 2017.

EL HAJJ ASSAF, C.; ZETINA-SERRANO, C.; TAHTAH, N.; KHOURY, A. E. *et al.* Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 24, p. 9462, 2020-12-12 2020.

EVIDENTE, A. Fungal bioactive macrolides. **Nat Prod Rep**, Jun 20 2022.

FELDMAN, D.; KOWBEL, D. J.; GLASS, N. L.; YARDEN, O. *et al.* Detoxification of 5-hydroxymethylfurfural by the *Pleurotus ostreatus* lignolytic enzymes aryl alcohol oxidase and dehydrogenase. **Biotechnology for Biofuels**, 8, n. 1, 2015-12-01 2015.

GODAN, T. K.; RAJESH, R. O.; LORENI, P. C.; KUMAR RAI, A. *et al.* Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural by *Acinetobacter oleivorans* S27 for the synthesis of furan derivatives. **Bioresource Technology**, 282, p. 88-93, 2019/06/01/ 2019.

JADULCO, R.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; SUDARSONO *et al.* New Macrolides and Furan Carboxylic Acid Derivative from the Sponge-Derived Fungus *Cladosporium herbarum*. **Journal of Natural Products**, 64, n. 4, p. 527-530, 2001/04/01 2001.

JÖBSTL, D.; HUSØY, T.; ALEXANDER, J.; BJELLAAS, T. *et al.* Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine. **Food Chemistry**, 123, n. 3, p. 814-818, 2010/12/01/ 2010.

KARPIŃSKI, T. M. Marine Macrolides with Antibacterial and/or Antifungal Activity. **Marine Drugs**, 17, n. 4, p. 241, 2019-04-23 2019.

KIMURA, Y.; TANI, S.; HAYASHI, A.; OHTANI, K. *et al.* Nematicidal Activity of 5-Hydroxymethyl-2-furoic Acid against Plant-Parasitic Nematodes. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 62, n. 3-4, p. 234-238, 2007-04-01 2007.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. New Secondary Metabolites from the Marine Endophytic Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, 67, n. 6, p. 1058-1063, 2004-06-01 2004.

LI, S.; YANG, B.; TAN, G.-Y.; OUYANG, L.-M. *et al.* Polyketide pesticides from actinomycetes. **Current Opinion in Biotechnology**, 69, p. 299-307, 2021/06/01/ 2021.

MA, H.-G.; LIU, Q.; ZHU, G.-L.; LIU, H.-S. *et al.* Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi. **Journal of Asian Natural Products Research**, 18, n. 1, p. 92-115, 2016.

MARTINS, C.; HARTMANN, D. O.; VARELA, A.; COELHO, J. A. S. *et al.* Securing a furan-based biorefinery: disclosing the genetic basis of the degradation of hydroxymethylfurfural and its derivatives in the model fungus *Aspergillus nidulans*. **Microbial Biotechnology**, 13, n. 6, p. 1983-1996, 2020-11-01 2020.

MUNEKATA, M.; TAMURA, G. The selective inhibitors against SV40-transformed cells. Antitumor activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, 45, n. 9, p. 2149-2150, 1981-01-01 1981.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 80642, 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic-acid. . 2022.

PAN, X.; WU, S.; YAO, D.; LIU, L. *et al.* Efficient biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid by a new whole-cell

biocatalyst *Pseudomonas aeruginosa* PC-1. **Reaction Chemistry & Engineering**, 5, n. 8, p. 1397-1404, 2020-01-01 2020.

RAJESH, R. O.; GODAN, T. K.; RAI, A. K.; SAHOO, D. *et al.* Biosynthesis of 2,5-furan dicarboxylic acid by *Aspergillus flavus* APLS-1: Process optimization and intermediate product analysis. **Bioresource Technology**, 284, p. 155-160, 2019/07/01/ 2019.

RAN, H.; ZHANG, J.; GAO, Q.; LIN, Z. *et al.* Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. **Biotechnology for Biofuels**, 7, n. 1, p. 51, 2014-12-01 2014.

SHUKLA, A. K.; SINGH, A. K. Exploitation of Potential Extremophiles for Bioremediation of Xenobiotics Compounds: A Biotechnological Approach. **Curr Genomics**, 21, n. 3, p. 161-167, Apr 2020.

SKELLAM, E. Biosynthesis of fungal polyketides by collaborating and *trans*-acting enzymes. **Natural Product Reports**, 39, n. 4, p. 754-783, 2022-01-01 2022.

TAKAHASHI, K.; SAKAI, K.; NAGANO, Y.; ORUI SAKAGUCHI, S. *et al.* Cladomarine, a new anti-saprolegniasis compound isolated from the deep-sea fungus, *Penicillium coralligerum* YK-247. **The Journal of Antibiotics**, 70, n. 8, p. 911-914, 2017-08-01 2017.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M.-J. Use of filamentous fungi as biocatalysts in the oxidation of 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF). **Bioresource Technology**, 344, p. 126169, 2022/01/01/ 2022.

TYŚKIEWICZ, R.; NOWAK, A.; OZIMEK, E.; JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 4, p. 2329, 2022-02-19 2022.

WON, T. H.; LIAO, L.; KANG, S. S.; SHIN, J. Simultaneous analysis of furfural metabolites from *Rehmanniae radix* preparata by HPLC-DAD–ESI-MS. **Food Chemistry**, 142, p. 107-113, 2014/01/01/ 2014.

XIE, T.; YUE, S.; SU, T.; SONG, M. *et al.* High selective oxidation of 5-hydroxymethyl furfural to 5-hydroxymethyl-2-furan carboxylic acid using Ag-TiO2. **Molecular Catalysis**, 525, p. 112353, 2022/06/01/ 2022.

XU, X.; QU, R.; WU, W.; JIANG, C. *et al.* Applications of microbial co-cultures in polyketides production. **Journal of Applied Microbiology**, 130, n. 4, p. 1023-1034, 2021-04-01 2021.

ZHANG, P.; WEI, Q.; YUAN, X.; XU, K. Newly reported alkaloids produced by marine-derived *Penicillium* species (covering 2014–2018). **Bioorganic Chemistry**, 99, p. 103840, 2020/06/01/ 2020.

ZHANG, S.; WINESTRAND, S.; CHEN, L.; LI, D. *et al.* Tolerance of the Nanocellulose-Producing Bacterium *Gluconacetobacter xylinus* to Lignocellulose-Derived Acids and Aldehydes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, n. 40, p. 9792-9799, 2014-10-08 2014.

ZHANG, X.-Y.; ZONG, M.-H.; LI, N. Whole-cell biocatalytic selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid. **Green Chemistry**, 19, n. 19, p. 4544-4551, 2017-01-01 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de microrganismos extremófilos é fundamental para o conhecimento ecológico de comunidades microbianas e sua interação com o ambiente, além de ser a base para estudos envolvendo o potencial biotecnológicos desses organismos.

O ambiente marinho antártico apresenta características únicas de salinidade, incidência de luz solar, pH, temperatura, nutrientes disponíveis e de competição e interação em seu ecossistema. Tais características geram condições únicas para a sobrevivência dos organismos na região, as quais tem o potencial de gerar adaptações que dão origem a novas moléculas. Por sua vez, as moléculas produzidas em ambiente tão severo, podem apresentar estruturas químicas e desempenhar funções biológicas novas ou desconhecidas.

Nesse contexto, a cromatografia líquida continua sendo a principal aliada na purificação de produtos naturais, proporcionando grande quantidade de dados para análise em um tempo muito curto; e a utilização de bancos de dados como Scifinder® foi de extrema importância como ferramenta auxiliar na identificação dos compostos isolados.

O estudo conduzido reafirma a realidade dos fungos de ambientes extremos como reservatório de moléculas naturais com diversas atividades de interesse para o desenvolvimento sustentável da indústria e da agricultura. O conhecimento do metabolismo secundário desses isolados é também de fundamental importância para o estudo posterior de otimização de cultivo para a produção de compostos de interesse.

O gênero *Penicillium*, embora amplamente explorado em comparação com outros gêneros de microrganismos, ainda pode oferecer novos caminhos na produção de compostos bioativos e de valor agregado, como evidenciado pela produção de compostos com diferentes estruturas químicas e aplicações.

Além disso, compostos conhecidos podem ser reavaliados com técnicas atuais em diversas aplicações e se tornarem moléculas-chave para o desenvolvimento de formulações, retendo assim, seu valor para a pesquisa e para o mercado, uma vez que o isolamento e liberação de compostos novos para uso é desafiador.

Os compostos bioativos isolados nesse estudo, ácido penicílico e ácido ciclopáldico, apresentaram atividades desconhecidas até o presente momento, tendo sido por muito tempo esquecidos pela comunidade científica, que tem seu maior foco na descoberta de novas estruturas e moléculas inéditas em detrimento de compostos já conhecidos.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Received: 18 November 2021 | Accepted: 13 December 2021

DOI: 10.1111/jam.15413

Journal of Applied Microbiology sfam

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker

Gabrielle Vieira[1] | **Zeinab G. Khalil**[2] | **Robert J. Capon**[2] | **Lara D. Sette**[1] | **Henrique Ferreira**[1] | **Daiane C. Sass**[1]

[1]Institute of Biosciences, Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil

[2]Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Australia

Correspondence
Daiane Cristina Sass, Institute of Biosciences, Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Avenue 24 A, 1515, Rio Claro, SP, Brazil.
Email: daiane.sass@unesp.br

Funding information
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: #141988/2018-5; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Grant/Award Number: #88887.467270/2019-00; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award Number: #2018/11747-3 and #2016/07957-7

Abstract

Aims: The control of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), causal agent of citrus canker, relies heavily on integrated agricultural practices involving the use of copper-based chemicals. Considering the need for alternatives to control this disease and the potential of fungi from extreme environments as producers of bioactive metabolites, we isolated and identified a bioactive compound from *Penicillium* sp. CRM 1540 isolated from Antarctica marine sediment.

Methods and Results: The potential of compound as an antibacterial agent against *X. citri* was assessed through *in vitro* and greenhouse experiments. Molecular taxonomy indicates that this fungus is a possible new species of *Penicillium*. Results revealed 90% bacterial inhibition *in vitro* at 25 μg ml^{-1} and a decrease in 75.37% of citrus canker symptoms emergency *in vivo* in treated leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck considering the number of lesions per cm^2 ($p < 0.05$) in comparison with the control. The structure of the active agent was identified as penicillic acid based on a detailed spectroscopic analysis.

Conclusion: Penicillic acid can be an alternative against citrus canker.

Significance and Impact of Study: Research into extremophile micro-organisms can identify molecules with biotechnological potential and alternatives to current agricultural practices.

KEYWORDS

agriculture, antimicrobials, bioproducts, biotechnology, plant diseases

INTRODUCTION

Citrus canker affects all the commercially important cultivars of citrus around the world, and it is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), a Gram-negative bacterium belonging to the Xanthomonadaceae family. Infection takes place by bacterial entry into the aerial parts of the host plant, especially the leaves, through natural openings (stomata) and wounds (Costerton et al., 1995; Graham et al., 1992, 2004). Upon infection, bacteria multiply in the intercellular spaces (such as the mesophyll), producing eruptive lesions from which cells can exudate and be spread to nearby plants by the combined action of wind and rain (Gottwald et al., 2002).

Tropical and subtropical climates are favourable for *X. citri* development during all times due to high temperatures and frequent storms (Bock et al., 2005). Citrus canker is not systemic, but highly infected plants lose productivity because of defoliation or fruit loses (Schubert et al., 2001).

The objective of disease management is to reduce infection to decrease or avoid loss of crops and production. In the case of citrus canker, it consists mostly the use of healthy seeds and seedlings, less susceptible cultivars,

 © 2021 The Society for Applied Microbiology

windbreaks around the crops and the application of copper-based bactericides as preventive measure (Behlau & Belasque, 2014; Gottwald et al., 2002; Leite & Mohan, 1990; Stein et al., 2007).

According to many studies, although copper-based chemicals are effective, these compounds do not eradicate the pathogen, and must be applied several times throughout the harvest period. The constant use of heavy metals generates an environment propitious for the selection of resistant strains (Graham et al., 2010; Scapin et al., 2015; Sundin et al., 1989). For instance, resistance has already been documented for *X. citri* (Canteros, 1996).

In view of this rising problem, application of compounds of microbial origin can be a friendly alternative to the current use of copper-based sprays, and fungi from Antarctica are proven producers of bioactive secondary metabolites (Cheung et al., 2014; Dayan et al., 2009; Gonçalves et al., 2015; Henríquez et al., 2014). Many compounds with antibacterial, antiviral and antitumor activities were isolated from organisms within the Antarctic region and bioactive metabolites were shown to inhibit the growth of species of *Xanthomonas* (Encheva-Malinova et al., 2014, 2015; Moncheva et al., 2002; Nedialkova & Naidenova, 2005; Silber et al., 2013).

In an ongoing study on the biotechnological potential of fungi isolated from marine and terrestrial Antarctic samples carried out by our research group, we have screened filamentous fungi with antimicrobial activity against *Xanthomonas* spp. (Ferrarezi et al., 2019; Purić et al., 2018; Vieira et al., 2018). We now report the procedure for isolation and identification of penicillic acid produced by *Penicillium* sp. CRM 1540 recovered from Antarctic marine sediment at Botany Point (King George Island, Antarctic Peninsula) and its potential use as a preventive measure against citrus canker in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

MATERIALS AND METHODS

Microbial resources

Penicillium sp. CRM 1540 belongs to UNESP Central of Microbial Resources (CRM-UNESP), where it is cryopreserved at −80°C. For culture analytical and large-scale cultivation conditions, see Supplementary Material.

The phytopathogenic bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolate 306 (*X. citri*; IBSBF 1594) (Schaad et al., 2006) and *Xanthomonas campestris* ACM477 were reactivated in agar NYG medium (3 g yeast extract, 5 g peptone and 20 ml glycerol per litre) and incubated at 29°C for 48 h.

Extraction and isolation of secondary metabolites

A scheme for the production and isolation process is available in Supplementary Material (Scheme S1). The dried organic fraction was solubilized in MeOH, filtered in PTFE 0.45 μm syringe filter and subjected to preparative reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm × 25 cm × 7 μm column, 20 ml min^{-1} gradient elution over 30 min from 90% to 0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN). Peak detection was set to 210, 254 and 290 nm. The fractions were put in a Genevac Solvent Evaporator for 8h for removal of the solvents from the purification process.

The active fraction (11.7 mg) was solubilized in methanol (0.3 ml) and subjected to semi-preparative HPLC purification (Zorbax Stable Bond-Phenyl, 9.4 mm × 25 cm × 5 μm, 3 ml min^{-1} gradient elution over 25 min from 90% to 50% H_2O/MeCN with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) (Figure S2) to yield penicillic acid (1) (4.9 mg) as a white powder.

Molecular taxonomy of the fungal strain

Penicillium sp. CRM 1540 molecular taxonomy data are described in supplementary material.

Antibacterial activity assays

Inhibitory activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* was evaluated using the Resazurin Microtitre Assay method described by Silva et al. (2013). Analytes were dissolved in 10% (v/v in water) dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution (30,000 μg ml^{-1}) which was 10-fold diluted in NYG liquid medium for assay in a 96-well plate format. Bacterial cells were inoculated in NYG broth (30 ml) at 200 rev min^{-1} to arrive at a 10^7 CFU ml^{-1} (OD_{600} 0.8) pre-inoculum. Microdilution of analytes allowed for the assessment of antibacterial activity at concentrations ranging from 3000, 1500, 750 and 325 μg ml^{-1}. A stock solution of kanamycin in NYG broth (20 μg ml^{-1}) was used as the positive control (PC), with 1% DMSO in NYG broth (v/v) as the vehicle control (VC) and NYG medium as the negative control (NC). Bacterial inoculum was standardized to 10^5 CFU $well^{-1}$ from the pre-inoculum and the assay was performed in triplicate. For screening of fractions, the same method was applied. A stock solution for each analyte was prepared by dissolving samples in DMSO followed by dilution in NYG media to 100 μg ml^{-1} (with DMSO <1%).

Cell viability was detected by the reduction of resazurin (non-fluorescent dye) in the presence of NADH to resorufin (red fluorescent dye). Resazurin (0.01% v/v in water) was added to the 96-well plate and the fluorescence scanning of resorufin was measured at 530 nm (excitation) and 590 nm (emission) with Biotek Synergy H1MFD microplate reader (BioTek Instruments, Inc.). Percentage of growth inhibition was calculated based on the fluorescence units (FU) detected according to the formula below:

$$\text{Inhibition} = \frac{(\text{average FU of NC}) - (\text{Fu of sample})}{(\text{average FU og NC})} * 100$$

Antibacterial activity against *Xanthomonas campestris* in 96-well plates followed the same conditions, except that optical density was measured for inhibition (%). The absorbance at 600 nm of each well was measured in a POLARStar Omega plate reader. Percentage of inhibition was calculated based on optical density of the negative control with the formula:

$$\text{Inhibition} = \frac{(\text{average OD of NC}) - (\text{OD ofsample})}{(\text{average OD of NC})} * 100$$

Plant protection experiment

Penicillic acid (**1**) was tested at 25 μg ml^{-1} (90% inhibition *in vitro*) for activity in greenhouse conditions. The compound was prepared for application in 100 ml ultrapure water with DMSO 1%, similar to the *in vitro* assay. Two controls were applied for comparison: 100 ml of 1% DMSO solution (untreated, negative control—NC) and 100 ml of Difere® 2 ml L^{-1}, a commercially available copper-based fungicide and bactericide (active ingredient: copper oxychloride 588 g L^{-1} equivalent to 350 g L^{-1} of metallic copper).

Three nursery trees were used per treatment during the experiment. Nursery trees of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (rootstock *Citrus* × *limonia*) were pruned 10 days before the experiment begun and three branches with young leaves (4–7 cm length) were marked from each seedling for compound or control application (Figure 1a). Spray bottles were used to apply the treatments in the abaxial (inferior) and adaxial (superior) surface of the leaves until the run off point (Figure 1b).

After 24 h of treatment, the same method of application was used to spray *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on the leaf surfaces (Figure 1b). A pre-inoculum was prepared in the same day as the treatments were applied in NYG liquid media at $OD_{600} = 0.1$. The pre-inoculum was cultivated at 29°C and 200 rev min^{-1} for 14 h and then 1 ml of pre-inoculum was transferred to sterilized falcon tubes containing 30 ml of NYG media and cultivated at 29°C and 200 rev/min until OD_{600} of 0.5, within the log phase of bacterial growth.

The bacterial inoculum was centrifuged at 516 g for 15 min for pellet formation and then resuspended in 0.85% saline solution and standardized to $OD_{600} = 0.5$ (10^7 CFU ml^{-1}) for application. After the phytopathogen application, the seedlings were covered with a plastic bag to encourage stomatal opening and bacterial penetration

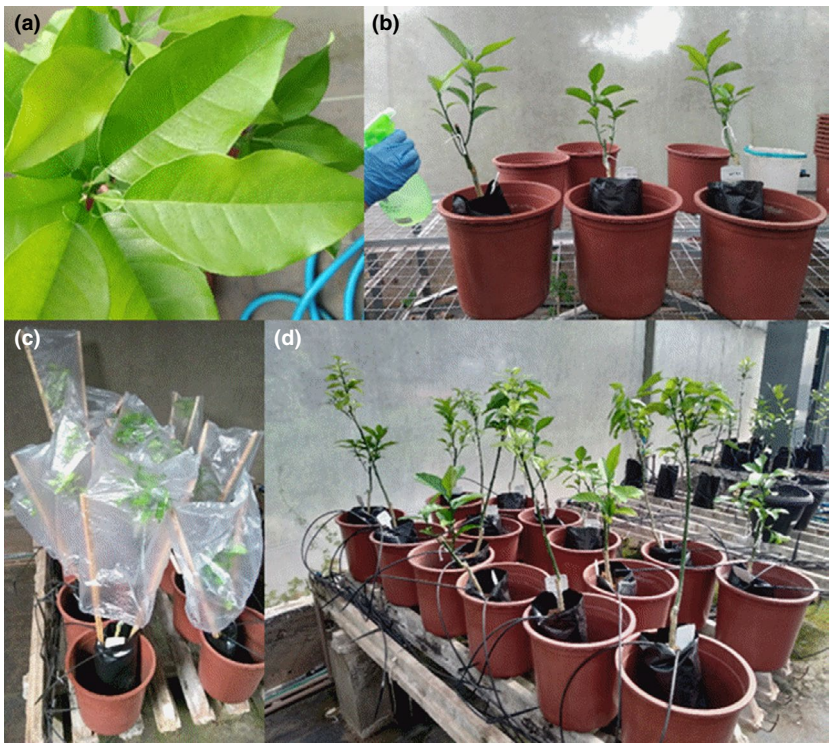


FIGURE 1 Greenhouse experiment process. (a) Young and healthy leaves after pruning. (b) Method of compound and phytopathogen application. (c) Covered seedlings to facilitate bacterial infection. (d) Plastic bags removed after 48 h and experiment start

for 48 h (Figure 1c). The bags were then removed and the experiment was observed weekly until its completion after 40 days of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* application (Figure 1d).

The leaves on each treated branch were carefully detached and scanned for analysis of the leaves' abaxial area (cm^2) and number of lesions per leaf. Analysis was carried out using the open-source software ImageJ—Fiji (Schindelin et al., 2012).

Statistical analysis

The open-source statistic software JASP version 0.14.1. (University of Oslo) (Team JASP, 2020) was used for statistical analysis of data obtained by greenhouse assay with confidence interval of 95%.

Data analysis

NMR data were analysed by Bruker TopSpin 4.0.9 software (academic license), compound structure was drawn using ChemSketch Freeware v 14.00 (ACD/ChemSketch, 2019). Mean and standard deviation data were calculated in Microsoft Excel (Microsoft Office), graphics were plotted in Microsoft Excel and PAST 4 version 4.05 (Hammer et al., 2001).

RESULTS

The fungus CRM 1540 was isolated as reported by Wentzel et al. (2019), with molecular taxonomy (beta-tubulin sequencing and phylogenetic analyses) suggesting it is a new species of the genus *Penicillium*.

Sequence similarity with the closest related species of *Penicillium* (*P. commune* and *P. caseifulvum*) ranged from 98% to 99%. In the phylogenetic tree (Figure S9), the sequence of the strain CRM 1540 (390 nt) and two other sequences of *Penicillium* also isolated from Antarctic marine sediments (strains CRM 1542 and CRM 1543) formed a cluster supported by 65% of bootstrap clearly separated from the cluster composed of representatives of *P. commune* and *P. caseifulvum*, including the type strains of these species. Although these results suggest that the fungus used in the present study is an unknown species of the genus *Penicillium*, further investigations will be necessary to confirm the hypothesis of a new species.

The biotechnological potential of *Penicillium* sp. CRM 1540, cultivated in 2% malt broth, as growth inhibitor of *Xanthomonas* spp., was previously reported in 2018 (Purić et al., 2018; Vieira et al., 2018). The organic extract of this isolate inhibited the growth of *X. citri* in 90% when applied at a concentration of 2900 $\mu g\ ml^{-1}$. To check the production of active molecules in another cultivation broth, Czapek Dox broth was used for fungal growth under the same conditions previously reported. The filtered broth was extracted with ethyl acetate (EtOAc) and the extract's antibacterial activity increased, with 90% growth inhibition at 679 $\mu g\ ml^{-1}$, which illustrates the importance of culture media as a variable for driving metabolite production.

The bioactive extract was subjected to preparative reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm ×25 cm ×7 μm column, 20 ml min^{-1} gradient elution over 30 min from 90% to 0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) to give 40 fractions (Figure S1). The fractions were evaluated for antibacterial activity against *X. campestris* and *X. citri*, with subsequent fractionation by semi-preparative HPLC (Zorbax Stable Bond-Phenyl column, 9.4 mm × 25 cm × 5 μm with a gradient of MeCN (0.01% TFA) leading to isolation of the active agent **1** (Figure S2).

Compound **1**, the major compound in the bioactive fraction, was isolated as a white powder with the molecular formula $C_8H_{10}O_4$ (170 Da) based on HRESIMS *m/z* 193.0477 $[M + Na]^+$ (calculated for $C_8H_{10}O_4Na$, 193.0471). (Figure S3). Analysis of the 1D NMR (600 MHz, *DMSO-d_6*) data for **1** (Figure 2 and Figures S4–S8, and Table S1) including comparison with literature data (Bladt et al., 2013), confirmed the structure for penicillic acid (**1**).

In the *in vitro* assays, penicillic acid showed minimal concentration for 90% growth inhibition of bacterial cells at 49.39 $\mu g\ ml^{-1}$ for *X. campestris* and 25 $\mu g\ ml^{-1}$ for *X. citri*. The overall results of the bioassay of Compound **1** against *X. campestris* and *X. citri* subsp. *citri* are shown in Figure 3.

Experiments conducted in greenhouse conditions revealed that penicillic acid (25 $\mu g\ ml^{-1}$) suppressed citrus canker development by 75.31%. The positive control used in the experiment, Difere®, decreased the disease symptoms by 84.74%, though applied in more concentration than penicillic acid; meanwhile, the untreated control showed 4.05 times more lesions per cm^2 than the treatment with penicillic acid (Figure 4).

The mean of lesion/cm^2 of each treatment with the standard error is shown in Figure 5.

Results from Shapiro–Wilk normality test showed that the data obtained were non-normal ($p < 0.001$) as expected by the experimental design.

Nonparametric analysis (distribution shown in Figure S10) revealed a significant difference in the number of lesions/cm^2 between the treatments ($p < 0.001$) and Dunn post-hoc comparisons (Table 1) showed a slight significant difference between Difere® and penicillic acid ($p = 0.035$, $\alpha = 0.05$). Penicillic acid and

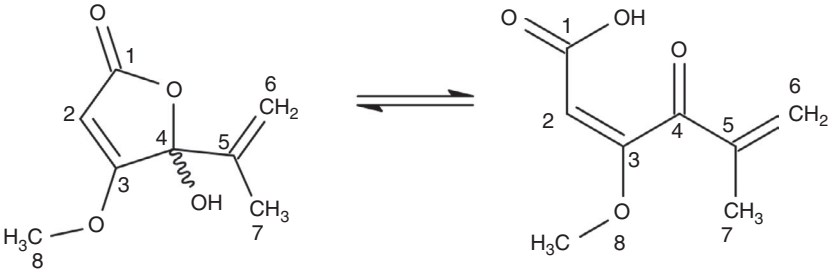


FIGURE 2 Structure of penicillic acid (1) isolated from the crude extract of the liquid medium of CRM 1540 (Penicillium sp.) culture

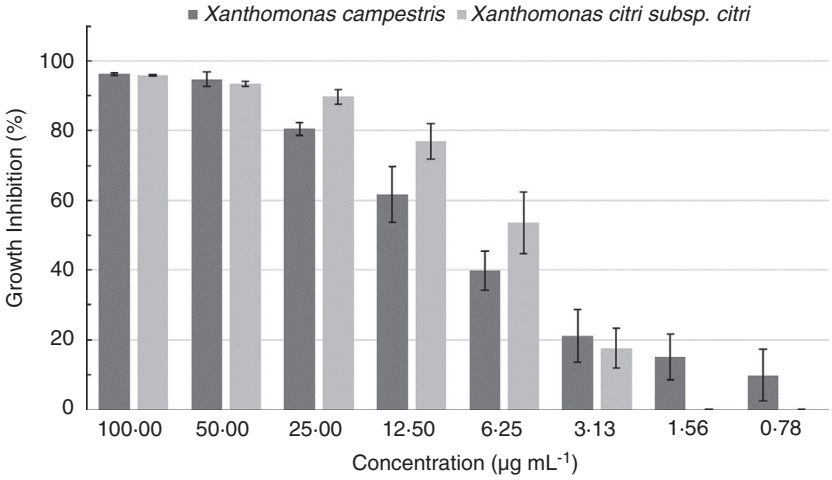


FIGURE 3 Antibacterial activity of penicillic acid (1), against *X. campestris* and *X. citri*. Bars represent the average percentage (%) of growth inhibition, and whiskers, the standard deviation of the means. Rifampicin (50 μg ml^{-1}) inhibited 95% of *X. campestris* growth, Kanamycin (20 μg ml^{-1}) inhibited 93.6% of *X. citri* growth and DMSO had no inhibitory effect on both phytopathogens

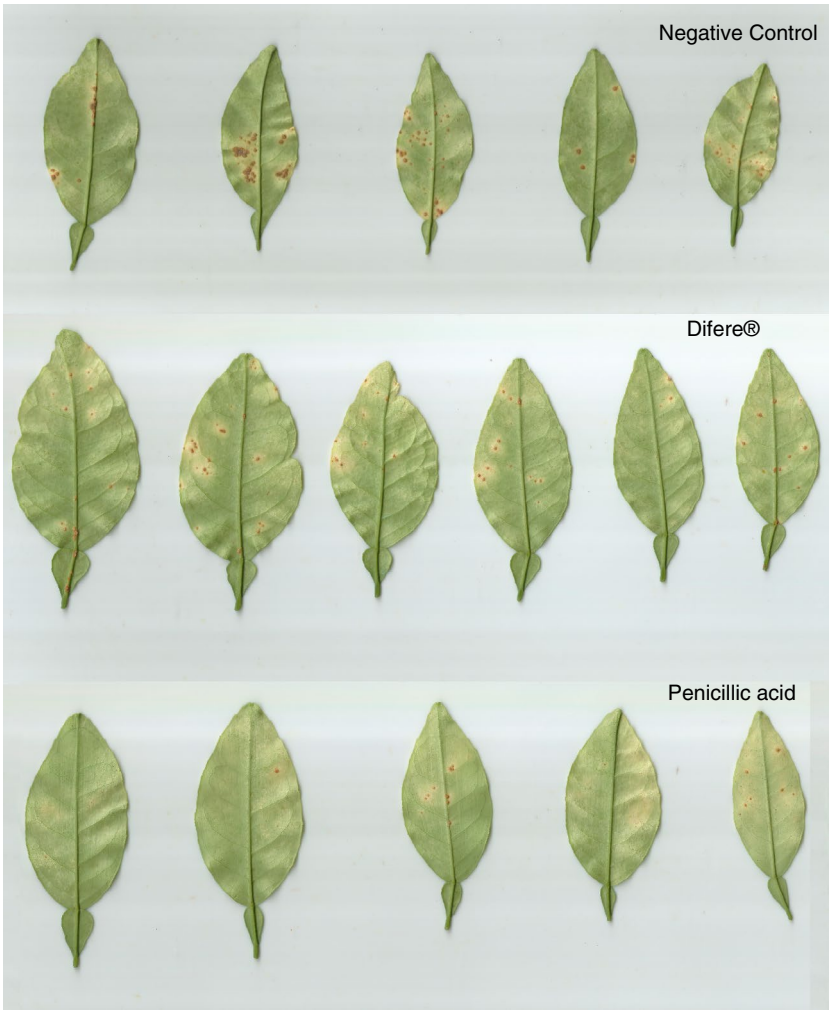


FIGURE 4 Citrus canker symptoms in leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 40 days post-inoculation

Difere® treatments had a significant effect on protection of leaves, with less lesions compared to the control ($p < 0.001$, $\alpha = 0.05$).

DISCUSSION

Penicillic acid is a mycotoxin known as quorum sensing inhibitor first isolated from *Penicillium puberulum* (Alsberg et al., 1913). This biologically active metabolite interferes in biofilm formation, reducing bacterial colonization (Liaqat et al., 2014; Montenegro et al., 2012; Rasmussen et al., 2005; Uroz et al., 2009; Wang et al., 2011).

According to the literature, this penicillic acid exhibits antifungal, antiviral, antitumoral, antidiuretic and antibacterial activities in addition to being phytotoxic, cytotoxic hepatotoxic and nephrotoxic (Frisvad, 2018; Kang & Kim, 2004; Keromnes & Thouvenot, 1985; Lindenfelser & Ciegler, 1977).

At least 101 fungi species, including different chemotypes, are related as producers of penicillic acid but only 48 are well documented, with the fungus correctly identified by phenotypical and molecular methods, well-defined criteria for the isolation and identification of the compound, and the strain available for the scientific community (Frisvad, 2018). Members from the *Penicillium* and *Aspergillus* genera that are the most commonly reported are as follows: *Penicillium fennelliae*, *P. commune*, *P. roqueforti*, *P. brasilianum*, *P. carneum*, *P. viridicateum*, *P. chrysogenum*, *Aspergillus affinis*, *A. bridgeri*, *A. cretensis*, *A. melleus*, *A. ohcraceus* and *A. roseoglobulosus* (Ciegler et al., 1972; Olivigni & Bullerman, 1978; Van Eijk, 1969).

The inhibitory effect of penicillic acid has been observed in Gram-negative and Gram-positive bacteria in which *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus* are some examples (Ezzat et al., 2007). In phytopathogenic bacteria, the antibacterial activity of penicillic acid was reported for the first time by Nguyen and collaborators (2016). Penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* EML-HPB1-11 was tested against 12 phytopathogenic bacteria: *Acidovoraz avenae* subsp. *cattlyae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia glumae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Streptococcus scabies*. According to the study, MIC values ranged between 37 μg ml^{-1} against *Acidovoraz avenae* subsp. *cattlyae*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas euvesicatoria* and 111 μg ml^{-1} for the remaining bacteria. The group performed an *in vitro* and detached leaf experiment in peach for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* where penicillic acid inhibited and reduced the development of bacterial spot with MIC of 12.3 μg ml^{-1} *in vitro* and inhibitory effect observed in the leaves proportional to dose–response.

Penicillic acid, isolated from seaweed-derived *Aspergillus* sp., also showed antibacterial activity against *X. campestris* and *X. citri* with MIC of 100 and 200 μg ml^{-1}, respectively (Huang et al., 2020).

In our study, the leaves treated with Difere® showed less symptoms than the other treatments; however, the results for penicillic acid were still significant, decreasing substantially the ability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* to colonize the host citrus. Penicillic acid had a mean of 0.437 lesions/cm² (SE ± 0.087), when applied at 25 μg ml^{-1}, while the positive control, with application equivalent to 700 μg ml^{-1} of metallic copper, showed

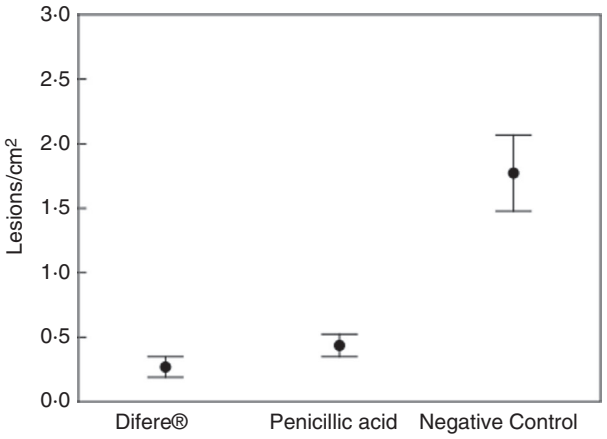


FIGURE 5 Mean and standard error of lesions/cm² for each treatment on leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck seedlings for Difere® ($n = 60$), Penicillic acid ($n = 82$) and NC ($n = 63$). PAST 4

TABLE 1 Dunn's post-hoc comparisons of treatments[a]

Comparison	z	W_i	W_j	p
Difere®—Penicillic acid	−1.808	71.983	89.939	0.035
Difere®—Negative control	−7.355	71.983	149.540	<0.001
Penicillic acid—Negative control	−6.086	89.939	149.540	<0.001

[a]JASP (v. 0.14.1).

values of 0.270 lesions/cm² (SE ± 0.080) and in the negative control the mean was 1.772 lesions/cm² (SE ± 0.294).

Penicillic acid had a protective effect on leaves similar to the effect observed by Cavalca et al. (2020) with the application of hexyl gallate (600 μg ml^{-1}) for citrus canker treatment where the mean of lesions observed for the compound was of 0.5 lesions/cm². Maxwell et al. (2019) also reported a ternary zinc chelate solution (TSOL) at 800 μg ml^{-1} with similar results to copper chemicals in a 3-year study conducted in greenhouse and field conditions.

In conclusion, a previously unknown application for penicillic acid in citriculture, as an alternative for currently employed copper-based chemicals, was revealed in our research. Studies on the potential health and environmental effects of penicillic acid when applied at 25 μg ml^{-1} in plants must be carried out and discussed before a decision can be made. Nevertheless, the potential use of penicillic acid in agriculture against citrus canker is real, as is the need to investigate its derivatives, new uses for known metabolites, and the biotechnological potential of extremophile microorganisms from Antarctica.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant #141988/2018-5), Brazil; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, PrInt (grant #88887.467270/2019-00) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant numbers #2018/11747-3 and #2016/07957-7). We also acknowledge the support of the University of Queensland, Institute for Molecular Bioscience.

CONFLICT OF INTERESTS

No conflict of interest declared.

ORCID

Daiane C. Sass https://orcid.org/0000-0001-9466-5633

REFERENCES

ACD/ChemSketch. (2019) *Advanced chemistry development, Inc.* Toronto, ON: ACD/ChemSketch.

Alsberg, C., Black, O.F. & Industry, U.S.B.o.P. (1913) *Contributions to the study of maize deterioration*. Washington, DC: G.P.O., Washington Govt Print Off, pp. 1–47.

Behlau, F. & Belasque, J. Jr (2014) *Cancro cítrico—a doença e seu controle*. Araraquara: Fundecitrus.

Bladt, T., Dürr, C., Knudsen, P., Kildgaard, S., Frisvad, J., Gotfredsen, C. et al. (2013) Bio-activity and dereplication-based discovery of ophiobolins and other fungal secondary metabolites targeting leukemia cells. *Molecules*, 18, 14629–14650.

Bock, C.H., Parker, P.E. & Gottwald, T.R. (2005) Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. *Plant Disease*, 89, 71–80.

Canteros, B.I. (1996) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria. Madras, India.

Cavalca, L.B., Zamuner, C.F.C., Saldanha, L.L., Polaquini, C.R., Regasini, L.O., Behlau, F. et al. (2020) Hexyl gallate for the control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*. *MicrobiologyOpen*, 9, e1104.

Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Pan, W.L., Chan, Y.S., Yin, C.M., Dan, X.L. et al. (2014) Antifungal and antiviral products of marine organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3475–3494.

Ciegler, A., Mintzlaff, H.-J., Weisleder, D. & Leistner, L. (1972) Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (Salami). *Applied Microbiology*, 24, 114–119.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. & Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745.

Dayan, F.E., Cantrell, C.L. & Duke, S.O. (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022–4034.

Encheva-Malinova, M., Stoyanova, M., Avramova, H., Pavlova, Y., Gocheva, B., Ivanova, I. et al. (2014) Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28, 721–727.

Encheva-Malinova, M., Vancheva, T., Badzhinerov, N., Koleva, V., Tishkov, S., Bogatzevska, N. et al. (2015) Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. *Annuaire De L'université De Sofia "st Kliment Ohridski" Faculte De Biologie*, 100, 216–222.

Ezzat, S.M., El-Sayed, A.E., Abou El-Hawa, M.I. & Ismaiel, A.A. (2007) Morphological and ultrastructural studies for the biological action of penicillic acid on some bacterial species. *Research Journal of Microbiology*, 2, 303–314.

Ferrarezi, J.H., Dos Santos, J., Aparecida, S., Sette, L.D., Ferreira, H. & Sass, D.C. (2019) Anti-*Xanthomonas* activity of Antarctic fungi crude extracts. *African Journal of Biotechnology*, 18, 713–718.

Frisvad, J.C. (2018) A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11, 73–100.

Gonçalves, V.N., Carvalho, C.R., Johann, S., Mendes, G., Alves, T.M.A., Zani, C.L. et al. (2015) Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, 38, 1143–1152.

Gottwald, T.R., Graham, J.H. & Schubert, T.S. (2002) Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 3, 15.

Graham, J.H., Dewdney, M. & Myers, M.E. (2010) Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. Crystal River, Florida, USA, pp. 92–99

Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J. & Achor, D.S. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, 5, 1–15.

Graham, J.H., Gottwald, T.R., Riley, T.D. & Achor, D. (1992) Penetration through leaf stomata and growth of strains of Xanthomonas campestris in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82, 1319–1325.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.

Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P. et al. (2014) Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 65–76.

Huang, R.-H., Lin, W., Zhang, P., Liu, J.-Y., Wang, D., Li, Y.-Q. et al. (2020) Anti-phytopathogenic bacterial metabolites from the seaweed-derived fungus *Aspergillus* sp. D40. *Frontiers in Marine Science*, 7, 313.

Kang, S.W. & Kim, S.W. (2004) New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. *Biotechnology Letters*, 26, 695–698.

Keromnes, J. & Thouvenot, D. (1985) Role of penicillic acid in the phytotoxicity of *Penicillium cyclopium* and *Penicillium canescens* to the germination of corn seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 660–663.

Leite, R.P. & Mohan, S.K. (1990) Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by Xanthomonas campestris pv. citri in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection*, 9, 3–7.

Liaqat, I., Bachmann, R.T. & Edyvean, R.G.J. (2014) Type 2 quorum sensing monitoring, inhibition and biofilm formation in marine microorganisms. *Current Microbiology*, 68, 342–351.

Lindenfelser, L.A. & Ciegler, A. (1977) Penicillic acid production in submerged culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 553–556.

Maxwell, T.J., Rajasekaran, P., Das, S., Campos, M.G.N., Young, M., Mendis, H.C. et al. (2019) Control of citrus canker in greenhouse and field with a zinc, urea, and peroxide ternary solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 12393–12401.

Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V. & Antonova-Nikolova, S. (2002) Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 3, 3–14.

Montenegro, T.G.C., Rodrigues, F.A.R., Jimenez, P.C., Angelim, A.L., Melo, V.M.M., Rodrigues Filho, E. et al. (2012) Cytotoxic activity of fungal strains isolated from the ascidian *Eudistoma vannamei*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2203–2209.

Nedialkova, D. & Naidenova, M. (2005) Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 4, 29–35.

Nguyen, H.T., Yu, N.H., Jeon, S.J., Lee, H.W., Bae, C.-H., Yeo, J.H. et al. (2016) Antibacterial activities of penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* against various plant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 62, 488–493.

Olivigni, F.J. & Bullerman, L.B. (1978) Production of penicillic acid and patulin by an atypical *Penicillium roqueforti* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 435–438.

Purić, J., Vieira, G., Cavalca, L.B., Sette, L.D., Ferreira, H., Vieira, M.L.C. et al. (2018) Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66, 530–536.

Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O. et al. (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 151, 1325–1340.

Scapin, M.D.S., Behlau, F., Scandelai, L.H.M., Fernandes, R.S., Silva Junior, G.J. & Ramos, H.H. (2015) Tree-row-volume-based sprays of copper bactericide for control of citrus canker. *Crop Protection*, 77, 119–126.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E. et al. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 690–695.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682.

Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H. & Dixon, W.N. (2001) Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. *Plant Disease*, 85, 340–356.

Silber, J., Ohlendorf, B., Labes, A., Erhard, A. & Imhoff, J. (2013) Calcarides A-E, antibacterial macrocyclic and linear polyesters from a *Calcarisporium* Strain. *Marine Drugs*, 11, 3309–3323.

Silva, I.C., Regasini, L.O., Petrônio, M.S., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Belasque, J. et al. (2013) Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, 195, 85–94.

Stein, B., Ramallo, J., Foguet, L. & Graham, J.H. (2007) Citrus leafminer control and copper sprays for management of citrus canker on lemon in Tucuman. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. Palm Beach County, FL, pp. 127–131.

Sundin, G.W., Jones, A.L. & Fulbright, D.W. (1989) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology*, 79, 861–865.

Team JASP. (2020). JASP (Version 0.14.1) [Computer software]. Retrieved from https://jasp-stats.org/

Uroz, S., Dessaux, Y. & Oger, P. (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the Yin and Yang of bacterial communication. *ChemBioChem*, 10, 205–216.

Van Eijk, G.W. (1969) Isolation and identification of orsellinic acid and penicillic acid produced by *Penicillium fennelliae* Stolk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 35, 497–504.

Vieira, G., Purić, J., Morão, L.G., Dos Santos, J.A., Inforsato, F.J., Sette, L.D. et al. (2018) Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Letters in Applied Microbiology*, 67, 64–71.

Wang, L., Zou, S., Yin, S., Liu, H., Yu, W. & Gong, Q. (2011) Construction of an effective screening system for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors and its application in bioautographic thin-layer chromatography. *Biotechnology Letters*, 33, 1381–1387.

Wentzel, L.C.P., Inforsato, F.J., Montoya, Q.V., Rossin, B.G., Nascimento, N.R., Rodrigues, A. et al. (2019) Fungi from admiralty bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. *Microbial Ecology*, 77, 12–24.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Vieira, G., Khalil[2], Z.G., Capon, R.J., Sette, L.D., Ferreira, H. & Sass, D.C. (2021) Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker. *Journal of Applied Microbiology*, 00, 1–8. https://doi.org/10.1111/jam.15413

APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR

Supplementary Material

Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker

Gabrielle Vieira[1], Zeinab G. Khalil[2], Robert J. Capon[2], Lara Durães Sette[1], Henrique Ferreira[1], Daiane Cristina Sass[1]

[1]São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of General and Applied Biology, Avenue 24 A, 1515, Rio Claro, SP, Brazil.

[2]The University of Queensland, Institute for Molecular Bioscience, Brisbane, QLD, Australia.

Corresponding author: daiane.sass@unesp.br, +55 19 35264189.

Table of Contents

1. General Experimental Details 3
2. Analytical cultivation of the fungal strain 4
3. Large scale cultivation, extraction and fractionation of *Penicillium* sp. CRM 1540 4
3.1. Isolation of penicillic acid by HPLC purification in semi-preparative phenyl column .. 6
4. Spectroscopic characterization of penicillic acid 8
5. Fungal DNA isolation and taxonomic analysis 13
5.1. Phylogenetic Tree 14
6. Data distribution of citrus canker lesions observed in treatments under greenhouse conditions 15
References 16

List of Figures

Figure S1. Fractions from the fractionation process of Penicillium sp. CRM 1540 6
Figure S2. DAD chromatogram of the purification of penicillic acid (**1**) 7
Figure S3. UV-visible absorption spectra of compound **1**. 8
Figure S4. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) spectrum of penicillic acid (**1)** 10
Figure S5. ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO-d_6) spectrum of penicillic acid (**1**) 10
Figure S6. 2D NMR HSQC (DMSO-d_6) for penicillic acid (**1**). 11
Figure S7. 2D NMR HMBC (DMSO-d_6) for penicillic acid (**1**). 11
Figure S8. 2D NMR COSY (DMSO-d_6) spectrum for penicillic acid (**1**). 12
Figure S9. HRESIMS analysis in micrOTOF of compound **1** 12
Figure S10. Phylogenetic analysis of beta-tubulin gene sequence of the fungus CRM 1540 isolated from Antarctic marine sediment 13
Figure S11. Violin plot of data distribution for individual treatments 15

List of Tables

Table S1. 1D and 2D NMR (600 MHz, DMSO-d_6) data for penicillic acid (**1**) 9

List of Schemes

Scheme S1. Isolation scheme of penicillic acid 5

1. General experimental details

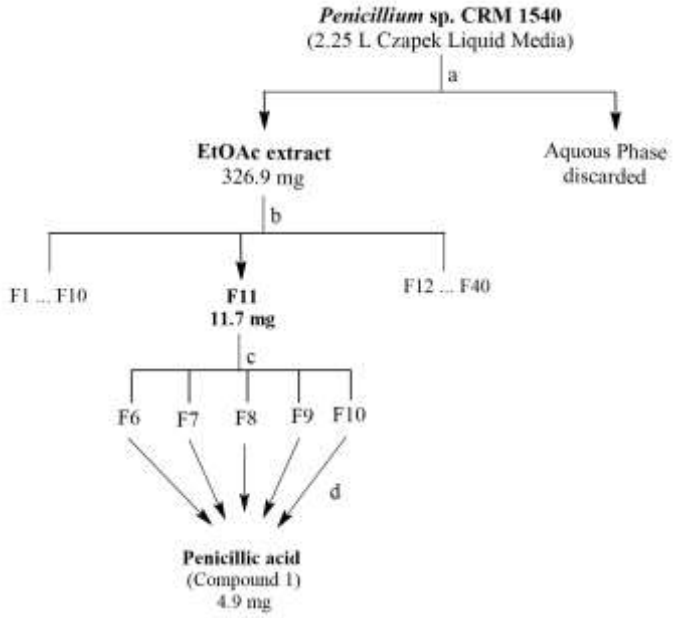
Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Merck unless otherwise specified. Analytical-grade solvents were used for solvent extractions. Chromatography solvents were of HPLC grade supplied by Labscan or Sigma-Aldrich and filtered/degassed through 0.45 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane prior to use. Deuterated solvents were purchased from Cambridge Isotopes (Tewksbury, MA, USA). Microorganisms were manipulated under sterile conditions using a Laftech class II biological safety cabinet and incubated in either MMM Friocell incubators (Lomb Scientific, NSW, Australia) or an Innova 42R incubator shaker (John Morris, NSW, Australia). Liquid chromatography-diode array-mass spectrometry (HPLC-DAD-MS) data were acquired either on an Agilent 1100 series separation module equipped with an Agilent 1100 series HPLC/MSD mass detector and diode array multiple wavelength detector. Semi-preparative HPLCs were performed using Agilent 1100 series HPLC instruments with corresponding detectors, fraction collectors and software inclusively. UPLC chromatograms were obtained on Agilent 1290 infinity UPLC system equipped with diode array multiple wavelength detector (Zorbax C_8 RRHD 1.8 μm column, 50 × 2.1 mm, eluting with 0.417 mL min^{-1} 90% H_2O/MeCN to 100% MeCN (with isocratic 0.01% TFA modifier) over 2.50 min). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer with either a 5 mm PASEL 1H/D-13C Z-Gradient probe or 5 mm CPTCI 1H/19F-13C/15N/DZ-Gradient cryoprobe, controlled by TopSpin 4.08 software. In all cases spectra were acquired at 25 °C in DMSO with referencing to residual ^{1}H or ^{13}C signals (δ_H 2.50 and δ_C 39.51 ppm). High-resolution ESIMS spectra were obtained on a Bruker micrOTOF mass spectrometer by direct injection in MeOH at 3 μL min^{-1} using sodium formate clusters as an internal calibrant.

2. Analytical cultivation of the fungal strain

Penicillium sp. CRM 1540 was cultivated in Czapek Dox (34 g L^{-1}, KASVI®) agar plates for 7 days at 15 ºC (x3). Following incubation, three squares containing mycelium plus medium from the border of each culture were transferred to 150 mL of Czapel Dox Broth in erlenmeyers (250 mL). Three erlenmeyers per agar plate were prepared and incubated at 15 ºC for 20 days at 150 rev min^{-1}. Following cultivation period, the broth was filtered using 0.45 um filter and extracted with EtOAc (450 mL/erlenmeyer). The organic phase was concentrated *in vacuo* to yield the crude extract (40 mg).

3. Large scale cultivation, extraction and fractionation of *Penicillium* sp. CRM 1540

For scale-up cultivation three squares from the border of the fungal strain cultivated in Czapek Dox agar plates were transferred to 150 mL of Czapek Dox broth in 250 mL erlenmeryers (x15). The flasks were incubated at 15 ºC (Solab SL, 221) for 20 days at 150 rev min^{-1} (5 erlenmeyers/batch), after which the broth was extracted with EtOAc (450 mL/erlenmeyer). The EtOAc extract was concentrated *in vacuo* at 40 °C to yield the crude extract (326.9 mg). An aliquot (60 mg) of the later was dissolved in MeOH (1 mL) and subjected to reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm × 25 cm × 7 µm column, 20 mL min^{-1} gradient elution over 30 min from 90%–0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) to yield fractions which were combined based on UPLC-DAD-QTOF analysis. Fraction 11 (11.7 mg) was subjected to semi-preparative reversed-phase HPLC (Zorbax Stable Bond-Phenyl 9.4 mm x 25 cm x 5 µm, 3 mL min^{-1} gradient elution over 25 min from 90%–50% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) to yield penicillic acid (**1**) (4.9 mg, 1.5 %) (Scheme **S1**).



(a) Liquid-liquid partitioning of filtered broth (1:3)
(b) Preparative reversed-phase HPLC chromatography
(c) Semi-preparative HPLC purification
(d) Fractions from the same peak reunited

Scheme S1. Isolation scheme of penicillic acid: a) liquid-liquid extraction of the microbial broth using ethyl acetate; b) reversed-phase HPLC (Phenomenex Luna-C_8 21.2 mm × 25 cm × 7 µm column, 20 mL min^{-1} gradient elution over 30 min from 90%–0% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN) for 326.9 mg of crude extract; c) semi-preparative HPLC purification for 11.6 mg: (Zorbax Stable Bond-Phenyl (9.4 mm x 25 cm x 5 µm, 3 mL min^{-1} gradient elution over 25 min from 90%–50% H_2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN; d) Fractions from the same peak were grouped as compound **1**.

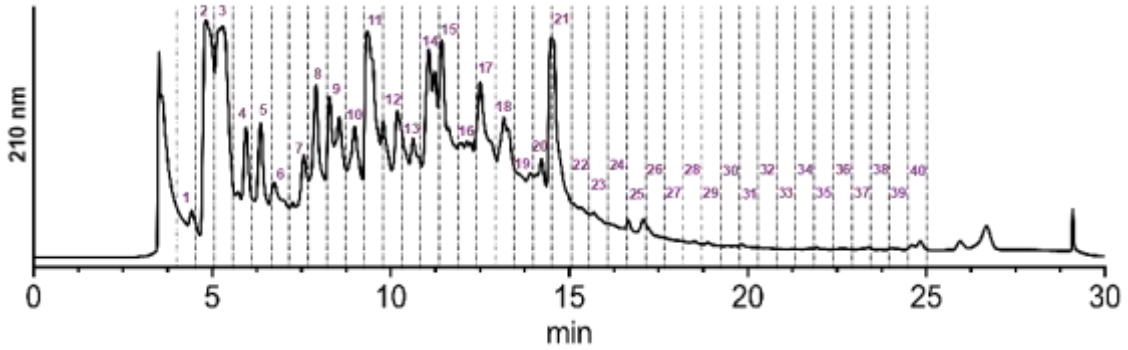


Figure S1. Fractions from the fractionation process of *Penicillium* sp. CRM 1540. C_8 preparative column and mobile phase: 90%-0% H_2O/MeCN with a constant isocratic 0.01% TFA, 20 mL min^{-1}, 30 min. DAD detector: 210 nm.

3.1. Isolation of penicillic acid by HPLC purification in semi-preparative phenyl column.

Fraction 11 (11.6 mg) from the primary fractionation of the EtOAc crude extract from *Penicillium* sp. CRM 1540 was dissolved in 0.3 mL of MeOH (38.6 mg mL^{-1}) and subjected to chromatographic fractionation using semipreparative HPLC. Six aliquots of 50 µL (1.93 mg $injection^{-1}$) were injected for HPLC fractionation (Zorbax Stable Bond-Phenyl 9.4 mm x 25 cm x 5 µm, 3 mL min^{-1} gradient elution over 25 min from 90%–50% H2O/MeCN, with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN).

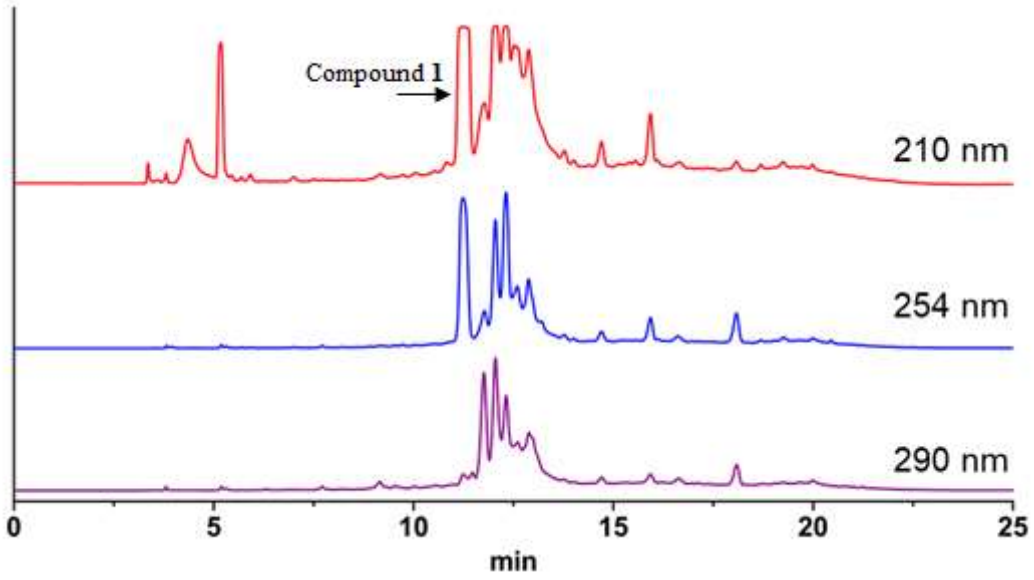


Figure S2. HPLC-DAD chromatograms for fraction 11 using phenyl-bonded silica semipreparative column in HPLC with gradient mode (90%-50% H_2O/MeCN with a constant isocratic 0.01% TFA/MeCN).

4. Spectroscopic characterization of Penicillic acid

Colourless powder; UV-vis (UPLC-DAD) see Figure S3; NMR (600 MHz, DMSO-d_6) see Table S1 and Figures S4, S5, S6, S7 and S8; 193.0477 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_8H_{10}O_4Na$, 193.0471 (Figure S9).

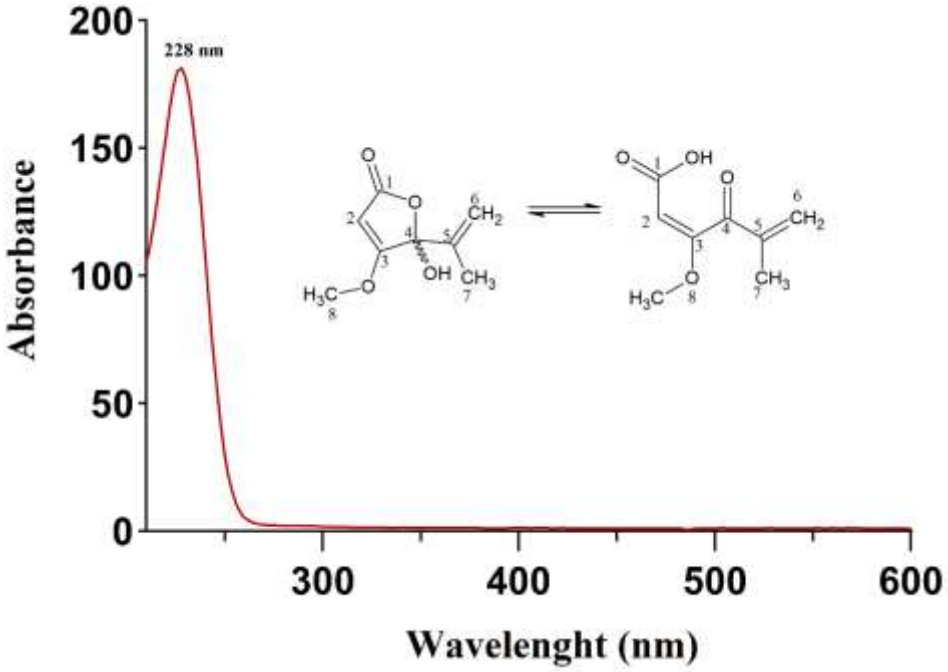


Figure S3. UV-visible absorption spectra of compound **1**.

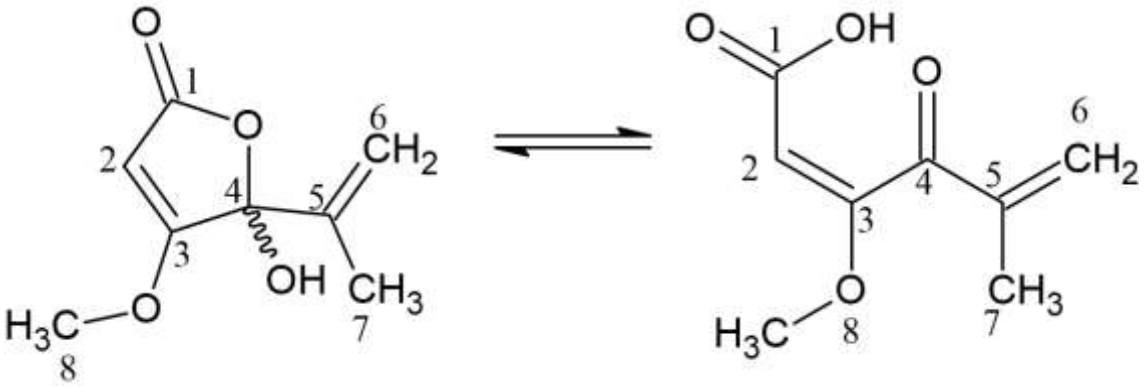


Table S1. 1D and 2D NMR (600 MHz, DMSO-d_6) data for penicillic acid (**1**)

Position	**δ_H mult. J Hz**	**δ_C**	**COSY**	**^{1}H-^{13}C HMBC**
1		170.3		
2	5.38, s	90.2		1, 4
3		179.6		
4		102.6		
4-OH	7.94, s			
5		140.7		
6a	5.13, s	116.3	7	
6b	5.30, br s	116.3	7	7
7	1.64, 3H, s	17.5	6a, 6b	4, 5, 6
8	3.83, 3H, s	60.2		3

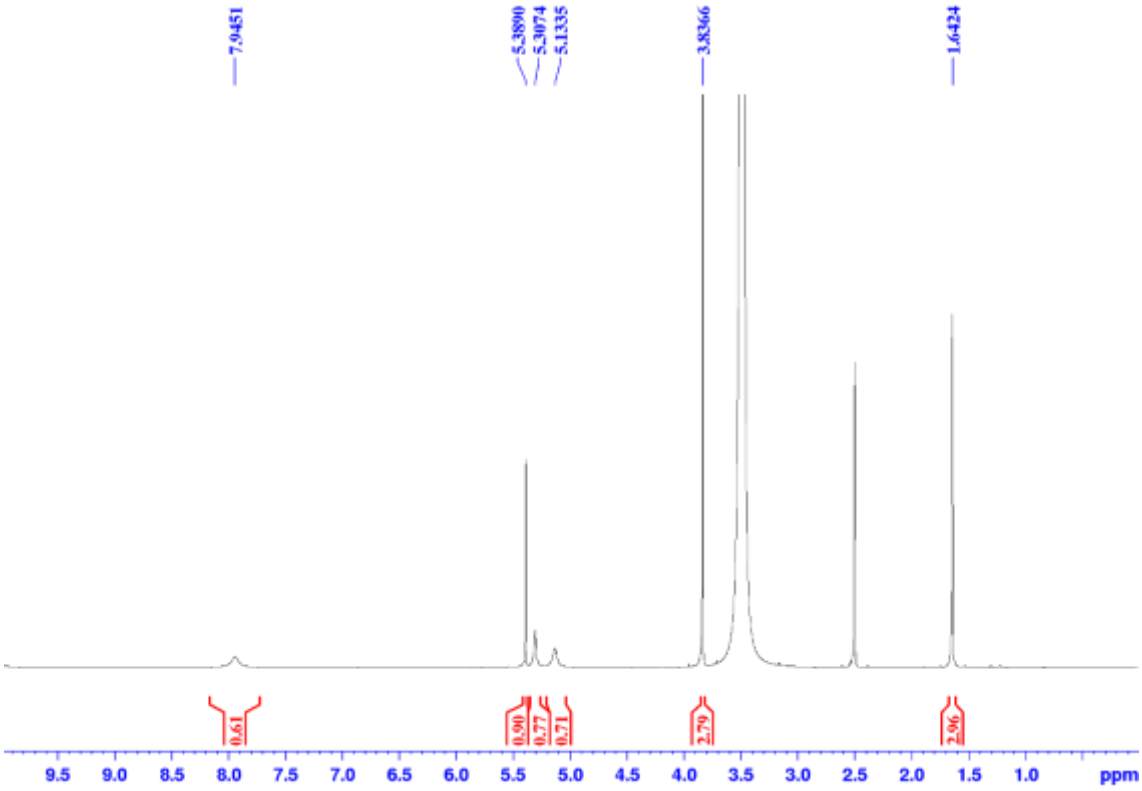


Figure S4. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) spectrum of penicillic acid (**1)**

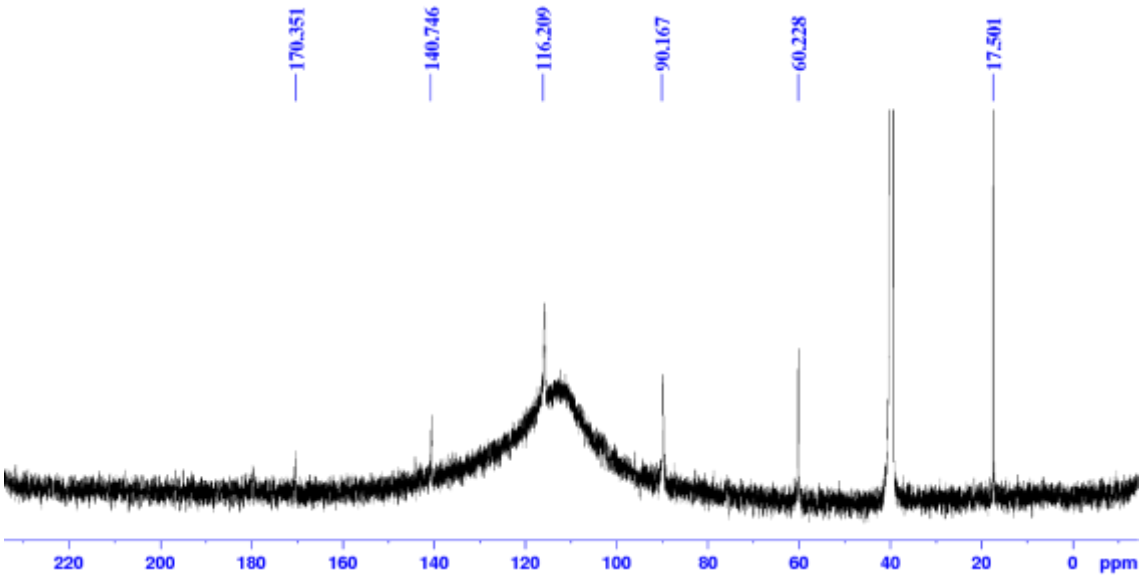


Figure S5. ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO-d_6) spectrum of penicillic acid (**1**)

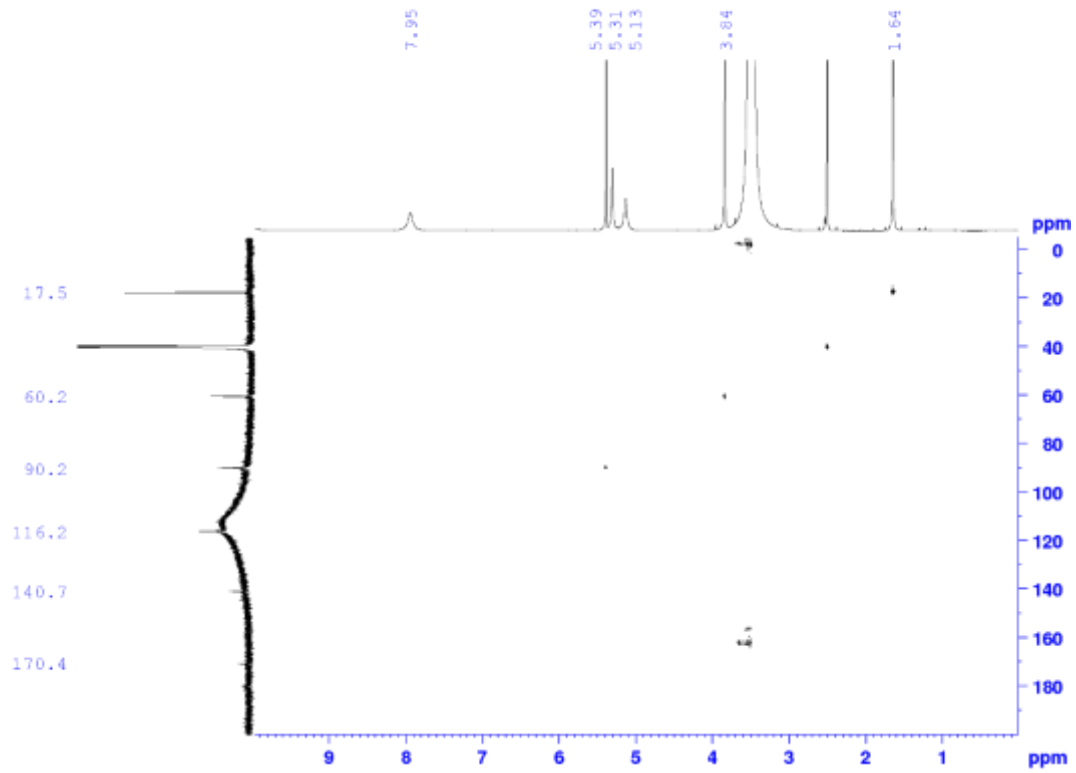


Figure S6. 2D NMR HSQC (DMSO-d_6) for penicillic acid (**1**).

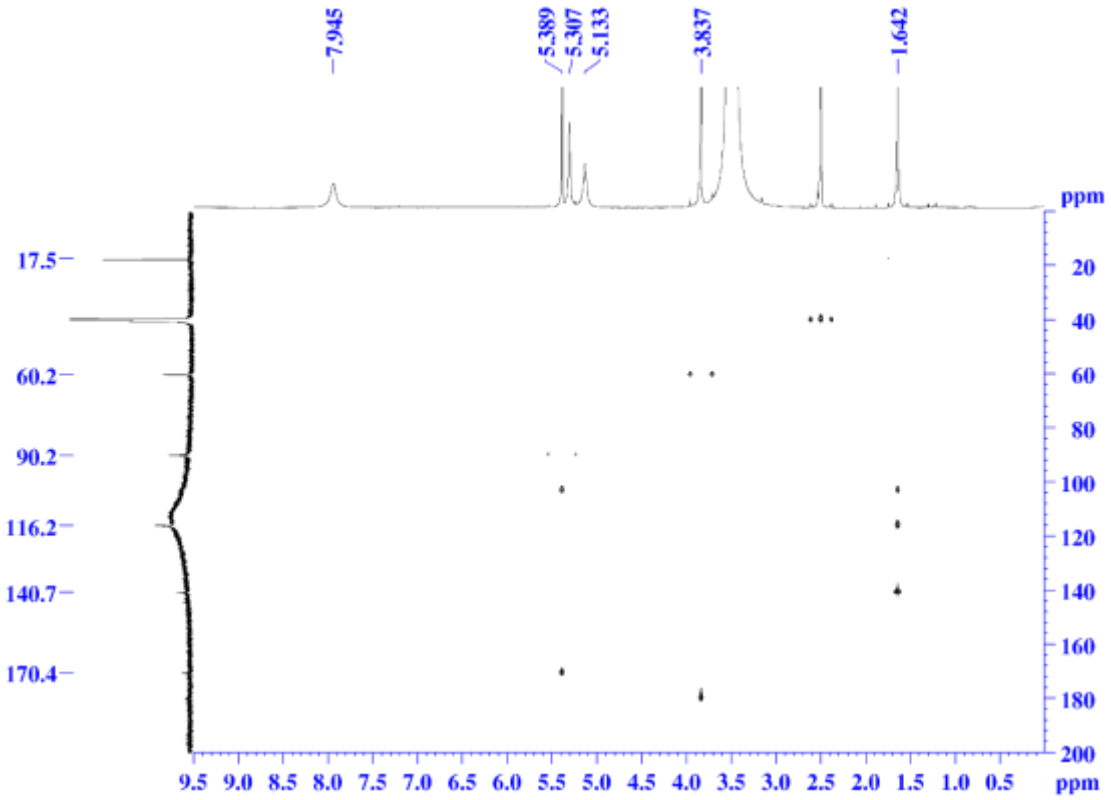


Figure S7. 2D NMR HMBC (DMSO-d_6) for penicillic acid (**1**).

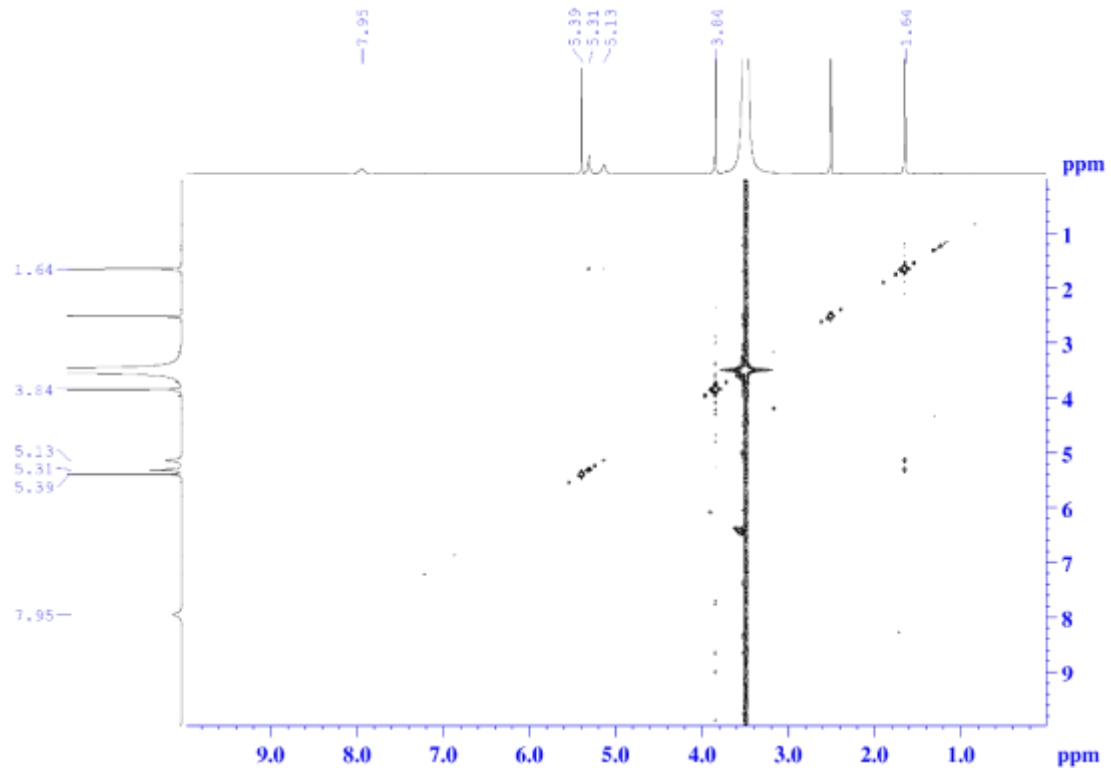


Figure S8. 2D NMR COSY (DMSO-d_6) spectrum for penicillic acid (**1**).

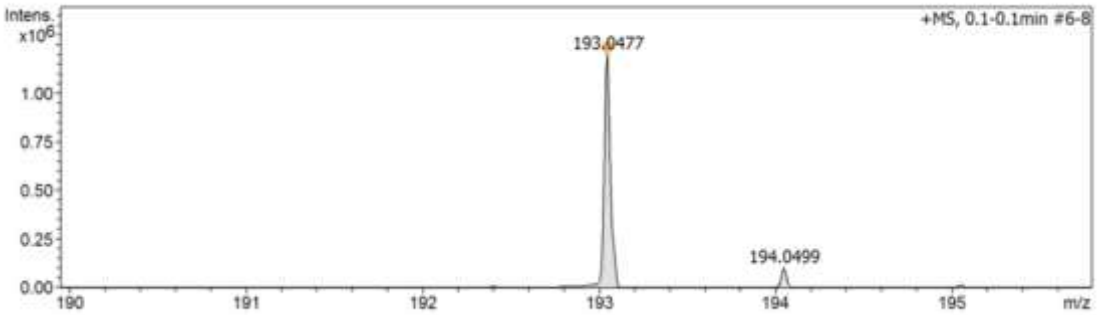


Figure S9. HRESIMS analysis in micrOTOF of compound 1. Suggested molecular formula of C8H10O4. HRMS m/z 193.0477 [M + Na]+ (calcd for C8H10O4Na, 193.0471).

5. Fungal DNA isolation and taxonomic analysis

Fungal DNA extraction was carried out as reported by Wentzel et al. (2019). The beta-tubulin gene was amplified according to (Godinho et al. 2013), using the primers Bt2a (5′-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) and Bt2b (5′-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass and Donaldson 1995). The amplicons were purified and sequenced according to Wentzel et al. (2019). The generated sequences were assembled into contig (390 bp) using BioEdit v.7.2.5 (Hall 1999) and compared to homologous sequences deposited in the NCBI-GenBank and CBS Fungal Biodiversity Centre databases using BLAST. The beta-tubulin sequence of the antarctic-derived fungus strain CRM1540 was deposited in GenBank under the accession number MZ198745.

5.1. Phylogenetic Tree

The sequences were aligned using ClustalX (Thompson, 1997) and analyzed using MEGA v.7.1(Kumar et al., 2016). Evolutionary distances were calculated using the Maximum Likelihood algorithm and Kimura-2p nucleotide substitution model(Kimura, 1980). The robustness of the phylogenetic tree was calculated using the bootstrap method, with 1000 generations.

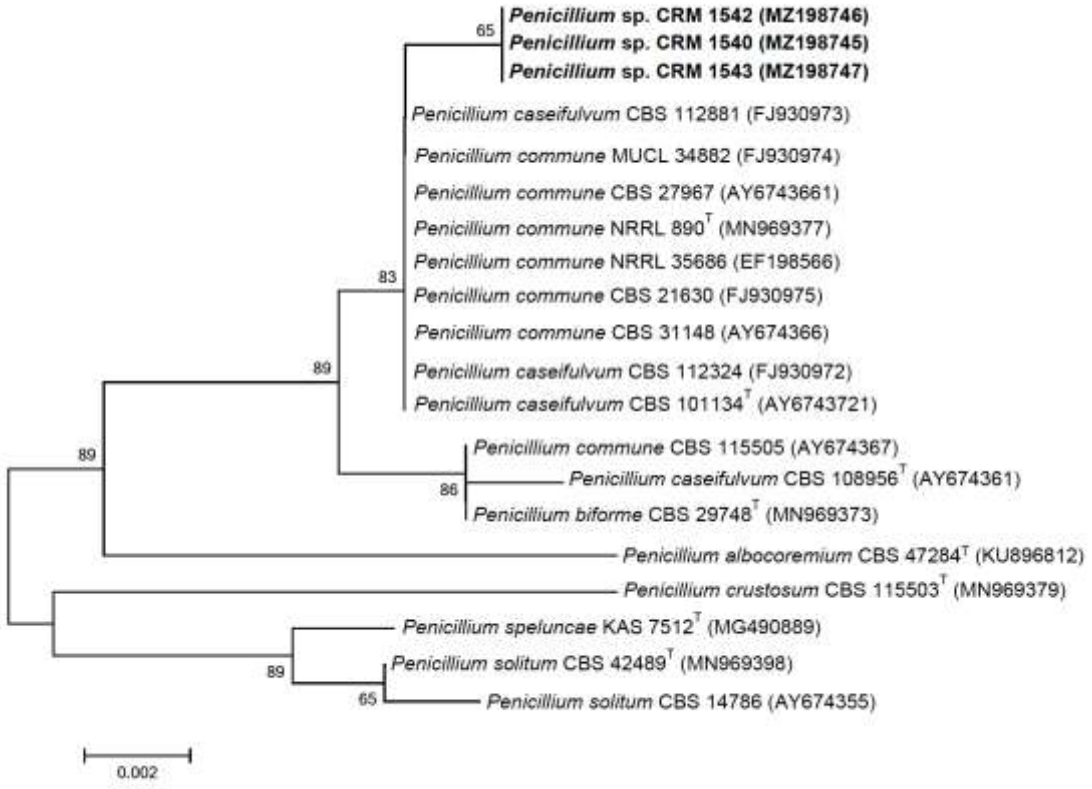


Figure S10. Phylogenetic analysis of beta-tubulin gene sequence of the fungus CRM 1540 isolated from Antarctic marine sediment. Evolutionary distances were based on the Maximum Likelihood algorithm and Kimura 2p model. Boothstrap values (1000 replicate runs) >50% are listed.

6. Data distribution of citrus canker lesions observed in treatments under greenhouse conditions

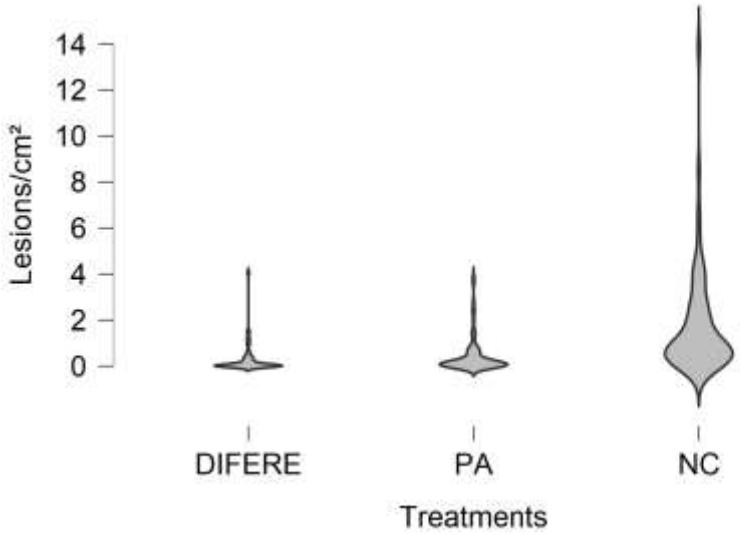


Figure S11. Violin plot of data distribution for individual treatments ($p<0.001$). JASP v. 0.14.1 (Team 2020)

References

Glass, N.L. and Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology* **61**, 1323-1330.

Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D., Alves, T.M., S Junior, P.A., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A. and Rosa, L.H. (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal* **7**, 1434-1451.

Hall, T. (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.

Team JASP. (2020) JASP (Version 0.14.1)[Computer software].

Wentzel, L.C.P., Inforsato, F.J., Montoya, Q.V., Rossin, B.G., Nascimento, N.R., Rodrigues, A. and Sette, L.D. (2019) Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. *Microbial Ecology* **77**, 12-24.