RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/10/2024.

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.

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.