

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Co-cultivo Fúngico Como Estratégia Para Obtenção de Metabólitos Biologicamente Ativos”

Airton Damasceno Silva*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

* **bolsista CNPq** (processo nº 142347/2016-7)

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Airtton Damasceno Silva, realizada em 23/02/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira (UFSCar)

Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva (UNESP)

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa (FCFRP/USP)

Profa. Dra. Hosana Maria Deboni (FCFRP/USP)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao meu pequeno príncipe...
...meu filho Bernardo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e pai científico, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira. Não tenho palavras para agradecê-lo. A sua expertise, orientação e conselhos foram fundamentais para a realização dessa pesquisa. Vou me lembrar com imensa saudade de todas as vezes que processamos juntos os espectros de ressonância e de como as discussões eram longas e extremamente construtivas. O senhor sempre foi um orientador presente mesmo estando longe. Nunca me deixou sem uma resposta. Me proporcionou todas as condições para que a pesquisa fosse desenvolvida plenamente. Obrigado pela amizade, sensibilidade, profissionalismo, por todos os ensinamentos e por ter me guiado nessa jornada de crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozin, colaboradora atuante cuja participação nesse trabalho foi essencial. Com você aprendi muito sobre escrita científica e graças a sua dedicação e empenho os artigos resultantes desse trabalho foram possíveis. O seu conhecimento na área da Química de Produtos Naturais bem como o seu altruísmo foram essenciais no desenvolvimento desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos colaboradores Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo, pesquisador principal do Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC - IFSC, USP São Carlos) e todos os membros desse grupo de pesquisa, responsáveis pelos ensaios antiparasitários. À Profa. Dra. Ilana Baratella Lopes, pesquisadora principal do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo - IFSC, USP São Carlos) e todos os membros desse grupo de pesquisa, responsáveis pelos ensaios antibacterianos. À Doutora Taynara Lopes Silva (FCFRP - USP Ribeirão Preto), responsável pelo ensaio de inibição da atividade enzimática da catepsina V. Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pesquisador principal do Grupo de Quimiometria Aplicada (GQA, UFSCar São Carlos), quimiometrista cuja expertise e colaboração foi essencial para a racionalização dos resultados obtidos. Agradeço também à Dra. Christiane Ceriani Aparecido, Pesquisadora Científica e curadora da micoteca “Mário Barreto Figueiredo” do Instituto Biológico de São Paulo.

Obrigado ao Laboratório de Produtos Naturais pela excelente infraestrutura e pela oportunidade que me foi dada de desenvolver meu doutorado

junto a um grupo de pesquisa referência na área de Produtos Naturais cuja excelência me possibilitou imenso crescimento profissional e pessoal. Aproveito também para agradecer a todos os meus professores que contribuíram muito na minha formação por meio das disciplinas ministradas: Dra. Quezia Bezerra Cass, Dra. Arlene Gonçalves Correa, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. Joaquim de Araújo Nobrega, Dr. Romeu Cardozo Rocha Filho. Agradeço também aos técnicos Ademir Sertori, Edilson Almeida e Dorai Periotto Zandonai por todo suporte, prestatividade e amizade.

Ao meu melhor amigo, meu filho Bernardo. Lidar com os desafios de um doutorado e da paternidade me exigiu compromisso, disciplina, organização e, acima de tudo, amor. Foi o amor por você que me moveu durante esses 4 anos, foi o meu combustível, minha motivação, minha força. Cada dia trabalhado, cada hora dedicada nessa pesquisa foi por você. Como é bom cuidar de você e te ver crescer. Queria eu poder voltar no tempo e fazer tudo novamente!

Ao meu pai, Romildo Rodrigues Silva, homem íntegro e de caráter irretocável, por ser o meu exemplo, pelo homem que é e que eu gostaria de ser. Obrigado por todo suporte emocional e financeiro. À minha mãe Arlete Estevão Damasceno e aos meus queridos irmãos, Arthur, Amanda, Aline e Adriele. Essa conquista é de todos vocês! À toda minha família que tanto amo e aos amigos que ficaram em Eunápolis e que me recordo com imensa saudade!

Por fim, os meus agradecimentos ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP pelo suporte e apoio financeiro.

“Fui para os bosques viver de livre vontade
Para sugar todo o tutano da vida
Para aniquilar tudo o que não era vida
para quando morrer
não descobrir que não vivi.”

Henry Thoreau

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Experimentos de cultivo axênico e co-cultivo.	15
TABELA 1.2 - Atividade bactericida dos extratos na concentração de 512 µg/mL....	17
TABELA 1.3 - Atividade antiprotozoária dos extratos.....	20
TABELA 1.4 - Inibição da atividade enzimática da catepsina V.	21

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Taxas estimadas de incidências padronizadas por idade (mundial) em 2020: todos os tipos de câncer, sexo e idade..	3
FIGURA 1.2 - Distribuição global combinada das sete principais doenças transmitidas por vetores: malária, filariose linfática, leishmaniose, dengue, encefalite japonesa, febre amarela e doença de Chagas.....	5
FIGURA 1.3 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, acetona-d ₆) do cultivo axênico do Fungo 1 e do experimento de co-cultivo 63.	31
FIGURA 1.4 - PCA do subconjunto preliminar. Os extratos 1 e 63 possuem perfis químicos semelhantes.....	31
FIGURA 1.5 - PCA do subconjunto do Fungo 2 (<i>Pestalotiopsis diospyri</i>). Amostras 7, 22 e 45 possuem atividade antifúngica contra o fungo 2.	32
FIGURA 1.6 - PCA do subconjunto do Fungo 3 (<i>Phoma caricae-papayae</i>). Amostras 8 e 26 possuem atividade antifúngica contra o fungo 3.	32
FIGURA 1.7 - PCA do subconjunto do Fungo 5 (<i>Phytophthora palmivora</i>). Amostra 45 possui atividade antifúngica contra o fungo 5.....	33
FIGURA 1.8 - PCA do subconjunto do Fungo 6 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>). Amostras 25 e 46 apresentam atividade antifúngica contra o fungo 6.	33
FIGURA 1.9 - PCA do subconjunto do Fungo 4 (<i>Colletotrichum horii</i>).....	34
FIGURA 1.10 - Comparação entre a produção metabólica do Fungo 4 e do ácido indolacético (RMN de ¹ H em acetona-d ₆).....	36
FIGURA 1.11 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 7, 45 e 37 contra o Fungo 2. À esquerda, solvente foi usado como controle.....	37
FIGURA 1.12 - Incorporação do extrato 45 em meio PDA contra o Fungo 2.....	37
FIGURA 1.13 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 8, 26 e 40 contra o Fungo 3. À esquerda, solvente foi usado como controle.....	38
FIGURA 1.14 - Incorporação do extrato 26 em meio PDA contra o Fungo 3.....	38
FIGURA 1.15 - Incorporação dos extratos 45 e 62 em meio PDA contra o Fungo 5.....	39
FIGURA 1.16 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 25, 46 e 54 contra o Fungo 6. À esquerda, solvente foi usado como controle.....	39

FIGURA 1.17 - Incorporação do extrato 46 em meio PDA contra o Fungo 6.	40
FIGURA 2.1 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre <i>P. caricae-papayae</i> (acima) e <i>F. guttiforme</i> (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de <i>P. caricae-papayae</i> no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.	48
FIGURA 2.2 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre <i>C. horii</i> (acima) e <i>F. guttiforme</i> (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de <i>C. horii</i> no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.	49
FIGURA 2.3 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre <i>C. gloeosporioides</i> (acima) e <i>F. guttiforme</i> (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de <i>C. gloeosporioides</i> no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.	49
FIGURA 2.4 - Inibição do crescimento dos fitopatógenos <i>P. caricae-papayae</i> , <i>C. horii</i> e <i>C. gloeosporioides</i> por voláteis produzidos pelo <i>F. guttiforme</i> . Inibição do crescimento é expresso como percentual de inibição comparado com o seu controle. Barras de erro indicam o desvio padrão das seis replicatas.	50
FIGURA 2.5 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre <i>P. caricae-papayae</i> e <i>F. guttiforme</i> . Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.	50
FIGURA 2.6 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre <i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i> . Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.	51
FIGURA 2.7 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. guttiforme</i> . Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.	51
FIGURA 2.8 - Estruturas químicas dos diterpenos kaur-15-eno (1) e kaur-16-eno (2).	52
FIGURA 2.9 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por <i>F. guttiforme</i> , <i>P. caricae-papayae</i> e pela interação entre eles.	54
FIGURA 2.10 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por <i>F. guttiforme</i> , <i>C. horii</i> e pela interação entre eles.	55
FIGURA 2.11 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por <i>F. guttiforme</i> , <i>C. gloeosporioides</i> e pela interação entre eles.	56

RESUMO

CO-CULTIVO FÚNGICO COMO ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE METABÓLITOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

Nesse trabalho foram avaliadas as atividades antibacteriana, antiprotozoária e de inibição da atividade proteolítica da catepsina V dos extratos provenientes do cultivo axênico de seis espécies fúngicas (*Fusarium guttiforme*, *Pestalotiopsis diospyri*, *Phoma caricae-papayae*, *Colletotrichum horii*, *Phytophthora palmivora* e *C. gloeosporioides*) e de todas as combinações de co-cultivo entre elas, resultando em 57 extratos de co-cultivo. Os resultados obtidos mostraram que o co-cultivo aumentou a atividade biológica das amostras uma vez que todos os extratos ativos contra bactérias super resistentes, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* foram obtidos de combinações de co-cultivo. Crescimento bacteriano foi inibido totalmente ou parcialmente por 46% dos extratos. Dois deles que continham majoritariamente os ácidos fusárico e 9,10-desidrofusárico foram excepcionalmente ativos. A presença do fungo *F. guttiforme* nos co-cultivos pode estar associada com a alta atividade biológica desses extratos contra *L. infantum*. Um único cultivo axênico diminuiu consideravelmente a atividade proteolítica da catepsina V, sendo uma exceção a uma tendência observada. Desta forma, os resultados de atividades biológicas indicaram que o co-cultivo fúngico aumentou o potencial biológico das amostras. As Análises dos Componentes Principais (PCA) dos espectros de RMN de ¹H dos 63 extratos permitiram o desenvolvimento de um novo método para avaliar atividade antifúngica e o antagonismo entre as espécies fúngicas dentro de uma coleção. Os resultados mostraram que o método desenvolvido foi capaz de prever a atividade fungicida e o antagonismo entre as espécies. Ensaio antifúngicos tradicionais *in vitro* de extratos ativos e inativos foram realizados com o intuito de provar as predições feitas pelas PCAs. Os resultados obtidos mostraram que o método desenvolvido é uma excelente ferramenta para se obter e avaliar, simultaneamente, amostras bioativas porque foi capaz de prever a atividade fungicida de 5 extratos diferentes em uma coleção de 63 amostras contra 4 fungos de gêneros distintos, o que seria mais difícil, laborioso e demorado se fossem ensaiados de maneira aleatória, permitindo economia de tempo e dinheiro. Por fim, no intuito de investigar alternativas ambientalmente amigáveis no controle de doenças causadas por antracnose e podridão preta este trabalho avaliou o perfil químico de substâncias orgânicas voláteis produzidas pelo fungo *F. guttiforme*

na presença dos fungos *C. horii*, *C. gloeosporioides* e *P. caricae-papayae*. Os voláteis produzidos pelo *F. guttiforme* inibiram, significativamente, o crescimento micelial dos fitopatógenos *C. horii* (91,7%), *C. gloeosporioides* (93,7%) e *P. caricae-papayae* (92,5%). A produção dos diterpenos kaur-15-eno e kaur-16-eno pelo *F. guttiforme* pode estar associada a um possível mecanismo de defesa à longa distância bem como com a atividade fungistática observada. Os resultados de inibição indicam, mesmo de maneira preliminar, que esses diterpenos são promissores agentes de biocontrole contra os fitopatógenos *P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: *Fusarium guttiforme*; *Pestalotiopsis diospyri*; *Phoma caricae-papayae*; *Colletotrichum horii*; *Phytophthora palmivora*; *C. gloeosporioides*; bactericida; leishmanicida; catepsina V; antifúngico; PCA; SPME; biocontrole.

ABSTRACT

FUNGAL CO-CULTIVATION AS A STRATEGY FOR OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES

In this work, the bactericidal, antiprotozoal, and inhibition of cathepsin V proteolytic activity of extracts from the axenic cultivation of six fungal species (*Fusarium guttiforme*, *Pestalotiopsis diospyri*, *Phoma caricae-papayae*, *Colletotrichum horii*, *Phytophthora palmivora*, and *C. gloeosporioides*) and all combinations of co-cultures among them were evaluated, resulting in 57 co-cultivation extracts. The results obtained showed that the co-culture increased the biological activity of the samples since all the extracts active against super resistant bacteria, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania infantum* were obtained from co-culture combinations. Bacterial growth was inhibited totally or partially by 46% of the extracts. Two of them that contained mostly fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids were exceptionally active. The presence of the fungus *F. guttiforme* in co-cultures may be associated with the high biological activity of these extracts against *L. infantum*. A single axenic culture considerably decreased the proteolytic activity of cathepsin V, being an exception to an observed trend. Thus, the results of biological activities indicated that the fungal co-cultivation increased the biological potential of the samples. Principal Component Analysis (PCA) of the ¹H NMR spectra of the 63 extracts allowed the development of a new method to assess fungicidal activity and antagonism between fungal species within a collection. The results showed that the developed method was able to predict fungicidal activity and antagonism between species. Traditional *in vitro* antifungal tests of active and inactive extracts were performed in order to prove the predictions made by the PCAs. The results obtained showed that the developed method is an excellent tool to obtain and evaluate, simultaneously, bioactive samples because it was able to predict the fungicidal activity of 5 different extracts in a collection of 63 samples against 4 fungi of different genera, which would be more difficult, laborious and time consuming if they were rehearsed at random, allowing time and money savings. Finally, in order to investigate environmentally friendly alternatives in the control of diseases caused by anthracnose and black rot, this work evaluated the chemical profile of volatile organic compounds produced by the fungus *F. guttiforme* in the presence of the fungi *C. horii*, *C. gloeosporioides*, and *P. caricae-papayae*. The volatiles produced by *F. guttiforme* significantly inhibited the mycelial growth of phytopathogens *C. horii* (91.7%), *C.*

gloeosporioides (93.7%), and *P. caricae-papayae* (92.5%). The production of the kaur-15-eno and kaur-16-en diterpenes by *F. guttiforme* may be associated with a possible long-distance defense mechanism as well as with the observed fungistatic activity. The inhibition results indicate, even in a preliminary way, that these diterpenes are promising biocontrol agents against the phytopathogens *P. caricae-papayae*, *C. horii*, and *C. gloeosporioides*.

Keywords: *Fusarium guttiforme*; *Pestalotiopsis diospyri*; *Phoma caricae-papayae*; *Colletotrichum horii*; *Phytophthora palmivora*; *C. gloeosporioides*; bactericidal; leishmanicide; cathepsin V; antifungal; PCA; SPME; biocontrol.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1. Co-cultivo fúngico em meio líquido: estudo dos constituintes fixos	1
1.1. Introdução	1
1.2. Experimental	8
1.2.1. Linhagens fúngicas	8
1.2.2. Condições de cultivo e co-cultivo fúngico	8
1.2.3. Filtração e partição líquido-líquido do caldo aquoso	9
1.2.4. Bioensaio sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	9
1.2.5. Bioensaio antiprotozoário	10
1.2.6. Bioensaio de inibição da atividade da catepsina V	11
1.2.7. Ensaio fungicida de difusão em ágar	12
1.2.8. Ensaio fungicida de incorporação de extrato em ágar	13
1.2.9. Análises de RMN de ¹ H	13
1.2.10. Quimiometria	13
1.2.11. Isolamento do ácido indolacético	14
1.3. Avaliação das atividades bactericidas, antiprotozoárias e inibidoras de cisteíno proteases	14
1.3.1. Resultados e discussão	14
1.3.2. Conclusão	27
1.4. Desenvolvimento de um novo método para identificação de antagonismo entre espécies fúngicas e avaliação de atividade fungicida	28
1.4.1. Considerações teóricas	28
1.4.2. Desenvolvimento do método	30
1.4.3. Ensaio <i>in vitro</i> dos extratos selecionados a partir das PCAs	36
1.4.4. Considerações sobre o método desenvolvido	40
1.4.5. Conclusão	42

Capítulo 2	43
2. Co-cultivo fúngico em placa de Petri: estudo da fração volátil	43
2.1. Introdução	43
2.2. Experimental	45
2.2.1. Linhagens fúngicas	45
2.2.2. Teste de co-cultivo usado na avaliação da atividade fungicida por substâncias orgânicas voláteis	46
2.2.3. Experimento de co-cultivo utilizado na curva diária de produção de substâncias orgânicas voláteis	47
2.2.4. Análises das substâncias orgânicas voláteis por SPME e GC-MS	47
2.2.5. Aquisição da área micelial	48
2.2.6. Análise estatística	48
2.3. Resultados e discussão	48
2.4. Conclusão	58
3. Referências	59
Apêndice A	72
Apêndice B	80

Capítulo 1

1. Co-cultivo fúngico em meio líquido: estudo dos constituintes fixos

1.1. Introdução

A procura por novos princípios ativos para o tratamento e/ou controle de doenças como o câncer ou causadas por microrganismos resistentes e protozoários é uma área de investigação extremamente importante no que concerne a políticas públicas de saúde e também uma preocupação global (WHO, 2018; WHO, 2020a; CDC 2017).

Sabe-se que diversas patologias, tais como progressão de tumores malignos, metástases (PALERMO e JOYCE, 2008; VASILJEVA e TURK, 2008; WATSON e KREUZALER, 2009), mal de Alzheimer (HOOK et al. 2010), artrite reumatoide e osteoporose (YASUDA et al. 2005) estão associados a desequilíbrios entre degradação e síntese proteica, erros na transcrição e/ou regulação de processos celulares ou mesmo alterações na expressão de algumas proteases, a exemplo das catepsinas.

Os primeiros relatos que evidenciaram a presença de catepsinas no câncer datam de 1930 (VASILJEVA e TURK, 2008) e, a partir de então, diversos estudos têm fornecido evidências cada vez mais contundentes da participação dessas proteases em processos associados a diversas doenças. A catepsina L está intimamente relacionada a carcinomas orais (MACABEO-ONG et al., 2003), tumores ósseos (LETO et al., 2010), bem como na progressão tumoral em câncer colorretal (TROY et al., 2004) e sua inibição pode implicar na desaceleração da metástase tumoral, uma vez que sua atividade proteolítica estimula a liberação de fatores de crescimento no sítio metastático (LANKELMA et al. 2010). Desta forma, o uso da catepsina L é justificado como alvo terapêutico na busca por inibidores de metástase tumoral (MOHAMED e SLOANE, 2006).

Carcinomas de cólon, mama, próstata, pâncreas e cérebro estão associados à elevação da atividade da catepsina B (SLOANE et al., 1986; LECAILLE et al. 2002; BERDOWSKA, 2004), sendo que grandes quantidades dessa enzima foram encontradas na maioria dos tumores malignos em estágios invasivos quando comparados com tecidos normais ou mesmo tumores benignos (IACOBUZIO-DONAHUE et al., 1997; SZPADERSKA e FRANKFATER, 2001; AGGARWAL e

SLOANE, 2014). Já a catepsina K, na sua forma inativa, está associada com uma desordem óssea (picnodisostose) e, por isto, esta enzima é um alvo terapêutico no estudo de doenças caracterizadas por reabsorção óssea (McGRATH, 1999).

Estudos relatam o envolvimento da catepsina D com o câncer de mama (BENES et al., 2008; MAYNADIER et al., 2013) bem como com processos degenerativos como a doença de Alzheimer (HAQUE et al., 2008), formação e progressão de estados inflamatórios, aterosclerose, trombooses intravasculares, apoptoses, mutagêneses e proliferação neoplásica (BERCHEM et al., 2002; CHWIERALSKI et al. 2006) além de conferir condições essenciais de sobrevivência do parasito responsável pela doença de esquistossomose (KASSCHAU et al. 1986).

Por fim, a catepsina V (também conhecida como catepsina L2) é secretada principalmente pela córnea, timo e testículos (BRÖMME et al. 1999; ADACHI et al. 1998) e está associada a doenças autoimunes como miastenia gravis (TOLOSA et al. 2003; VIKEN et al. 2007) e diabetes mellitus tipo I (VIKEN et al. 2007). Além disso, essa catepsina é encontrada superexpressa em tumores de mama, colorretal, renal e ovário. Por ter 78% de semelhança com a catepsina L humana (SANTAMARÍA et al. 1998; ADACHI et al. 1998), acredita-se que a catepsina V também desempenha função importante na progressão da metástase tumoral de maneira muito semelhante à catepsina L (BRÖMME et al. 1999).

Muitos são os processos patológicos em que as catepsinas estão envolvidas e, por isto, a compreensão cada vez maior dos seus mecanismos de ação justifica o uso dessas enzimas como alvos terapêuticos promissores na busca de novos inibidores, substâncias bioativas candidatas a fármacos antitumorais (EDWARDS e MURPHY, 1998).

Doenças como o câncer afetam milhões de pessoas (20% da população mundial), sendo a principal causa de mortes por doença em todo o planeta. Em 2020 foram contabilizados 19,3 milhões de novos casos (Figura 1.1) e 10 milhões de mortes, sendo o número de óbitos maior entre os homens. Os 10 tipos de cânceres mais comuns são responsáveis por mais de 60% do total de casos e mais de 70% das mortes. Câncer de mama é o mais comum no mundo todo, contabilizando 11,7% do total de novos casos, seguido por câncer de pulmão (11,4%), câncer colorretal (10,0%), câncer de próstata (7,3%) e câncer de estômago (5,6%). Apesar do câncer de mama ser o de maior ocorrência, o câncer de pulmão é o mais letal sendo responsável por 18,0% do total de mortes em todo o mundo, seguido de câncer

colorretal (9,4%), câncer de fígado (8,3%) e câncer de estômago (7,7%) (WHO, 2020b).

Estima-se que em 2040 serão diagnosticados 28,4 milhões de novos casos, um aumento de 47% em relação à 2020. Países com IDH médio ou baixo serão os mais afetados com aumento na incidência de câncer de 95% e 64%, respectivamente. Por isto, políticas públicas têm sido implementadas praticamente em todo mundo com o objetivo de controlar e prevenir novos casos da doença, uma vez que o câncer é tido como um grave problema de saúde pública mundial (BRAY et al. 2018; FERLAY et al. 2019).

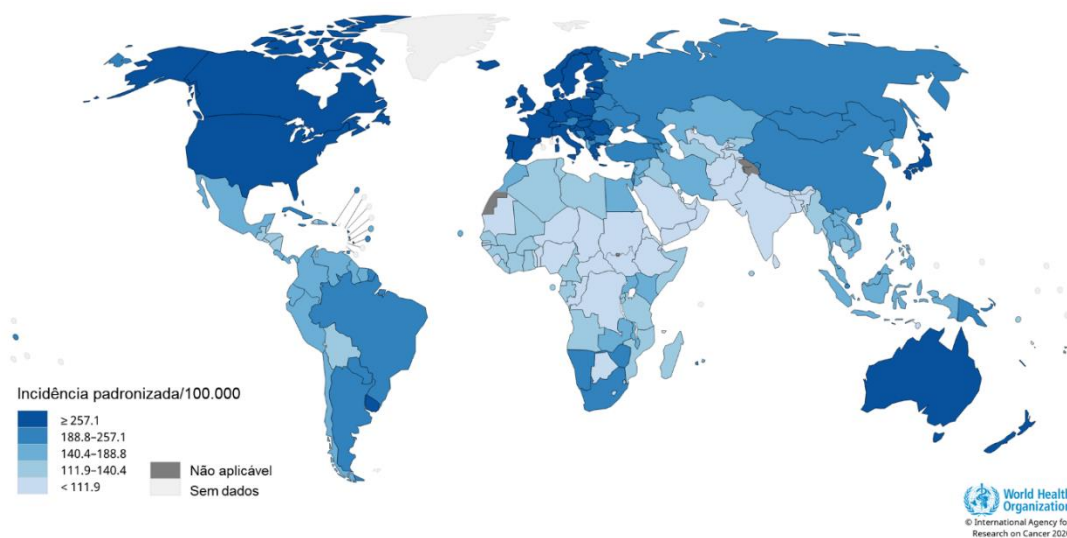


FIGURA 1.1 - Taxas estimadas de incidências padronizadas por idade (mundial) em 2020: todos os tipos de câncer, sexo e idade. (Fonte: adaptado de WHO, 2020c).

Entre os microrganismos, os fungos são capazes de produzir a maior variedade de proteases muitas das quais são extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas, exercem importante papel na patogênese de plantas (BALL et al., 1991; MOVAHEDI e HEALE, 1990; PARIS e LAMATTINA, 1999; VALUEVA e MOSOLOV, 2004). Diversos estudos evidenciam que essas enzimas proteolíticas inibem as proteases envolvidas na defesa da planta, facilitando a infestação dos tecidos da planta hospedeira pelo fungo, atuando na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular fornecendo aminoácidos essenciais ao seu desenvolvimento (GATEHOUSE et al. 2000). Desta forma, a busca por novos inibidores seletivos de catepsinas alvo e, conseqüentemente, de novas biomoléculas candidatas a fármacos contra diversos tipos de doenças perpassa por um estudo racional e biomonitorado dos inibidores produzidos por esses microrganismos.

Alguns frutos (como o mamão, abacaxi e caqui) possuem alto teor de proteases, muitas das quais estão envolvidas no seu processo de defesa contra microrganismos patogênicos (FARAHAT e EL-BATAWY, 2013; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; SALAS et al., 2008). Ainda assim, fungos como o *F. guttiforme*, *P. diospyri*, *P. caricae-papayae*, *C. horii*, *P. palmivora* e *C. gloeosporioides* conseguem infestar esses frutos sugerindo que esses microrganismos produzem potentes inibidores de proteases, o que justifica a investigação dos metabólitos produzidos por esses fitopatógenos na busca por novas moléculas bioativas potenciais inibidoras de catepsinas.

Resistência aos antimicrobianos é uma grave ameaça à saúde e ao desenvolvimento global (HOFER, 2019). Ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas se adaptam e passam a não mais responderem aos medicamentos administrados tornando as infecções mais difíceis ou mesmo impossíveis de tratar, aumentando-se o risco de propagação desses microrganismos, desenvolvimento de formas ainda mais graves de infecção e, conseqüentemente, aumento do número de mortes (ZAMAN et al. 2017). A Organização Mundial de Saúde classificou a resistência microbiana como uma das dez maiores ameaças globais que a humanidade enfrenta atualmente (WHO, 2020a).

Apesar de ser um fenômeno que ocorre naturalmente (MUNITA & ARIAS, 2016), a exposição indevida e o mau uso de antimicrobianos aceleram esse processo de resistência e isso ocorre principalmente devido a prescrição inadequada de terapias antimicrobianas e consumo excessivo dessas drogas tanto por seres humanos quanto por animais (REYGAERT, 2018). Geralmente as indicações clínicas são feitas baseadas em uma combinação de baixo custo e baixa toxicidade (GRIFFITH et al. 2012). Também, a prescrição inicial de medicamentos antimicrobianos com amplo espectro é algo comum, desnecessário e que contribui sobremaneira para o processo de resistência (VICTOR, 2011).

Microrganismos super resistentes são aqueles que crescem e se desenvolvem indiscriminadamente na presença de múltiplos antimicrobianos (WHO, 2020a). Espécies super resistentes de fungos e bactérias encontrados em ambientes hospitalares causam aproximadamente 700 mil mortes anualmente em todo mundo. Estima-se que até 2050 esses microrganismos causarão 10 milhões de mortes por ano. Se essa previsão se confirmar, resistência microbiana causará mais mortes do que o câncer (RAPPUOLI et al. 2017; ALLCOCK et al. 2017). Na agricultura, além do

problema da resistência microbiana, pestes e doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos são responsáveis por perdas de 20 a 40% da produção mundial de alimentos (FAO, 2017), daí o desafio e a importância da busca contínua por novos metabólitos bioativos capazes de controlar esses microrganismos de maneira eficiente e seletiva.

Doenças como Leishmaniose e doença de Chagas, causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, são doenças amplamente distribuídas pelo planeta e ocorrem majoritariamente em países de clima tropical (Figura 1.2). Apesar de não figurarem entre as principais causas de morte no mundo são doenças que carecem de tratamento e, justamente por isso, causam grande sofrimento para aqueles pacientes que desenvolvem sintomas graves da doença. Por ano, 8 milhões de pessoas são infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo, 7 milhões só nas américas sendo, aproximadamente, 10 mil mortes por ano a um custo de 627 milhões de dólares anuais à economia mundial destinados a políticas públicas de controle e prevenção da doença de Chagas (CDC 2017). Já em relação à Leishmaniose, a taxa de novos casos anuais é menor que aquela apresentada pela doença de Chagas, contudo, Leishmaniose é mais letal causando 40 mil óbitos por ano. Em 2018, mais de 95% dos novos casos reportados pela OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2020d).

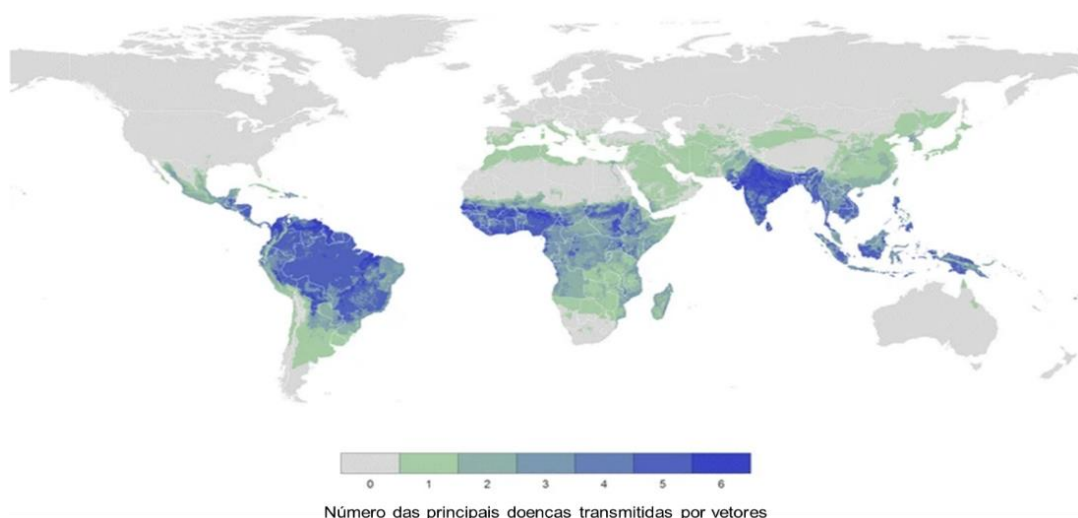


FIGURA 1.2 - Distribuição global combinada das sete principais doenças transmitidas por vetores: malária, filariose linfática, leishmaniose, dengue, encefalite japonesa, febre amarela e doença de Chagas (Fonte: adaptado de GOLDING et al. 2015).

Produtos naturais são, reconhecidamente, uma fonte promissora de novos compostos bioativos (NEWMAN e CRAGG, 2020; MARTINEZ-KLIMOVA et al. 2017) onde os microrganismos, como bactérias e fungos, destacam-se como importantes produtores de substâncias “modelo” para o desenvolvimento de novas drogas devido à alta complexidade estrutural e quimiodiversidade desses metabólitos de origem microbiana (BERTRAND et al. 2014; CARABALLO-RODRÍGUEZ et al. 2017).

Nos últimos 50 anos, produtos naturais de origem fúngica revolucionaram a medicina e a agricultura devido seu enorme potencial terapêutico e agrícola. Esses microrganismos forneceram à medicina moderna potentes antibióticos de amplo espectro utilizados na cura de doenças infecciosas potencialmente fatais (ALY et al. 2011). Uma nova era na imunofarmacologia e no transplante de órgãos se iniciou com a descoberta da ciclosporina (TEDESCO e HARAGSIM, 2012). Atualmente, diversas classes de substâncias provenientes do metabolismo fúngico estão disponíveis como drogas comerciais importantes, como é o caso das cefalosporinas, equinocandinas, penicilinas, estatinas (CRAGG e NEWMAN, 2013; SAVI et al. 2019). Para se ter uma ideia, a atorvastatina, derivado sintético e representante mais notável da classe das estatinas, foi o fármaco mais vendido nos EUA alcançando a cifra de 94,67 bilhões de dólares (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Contudo, em condições laboratoriais padrão, muitos genes biossintéticos microbianos não são transcritos permanecendo latentes. Como consequência, apenas uma fração do real potencial biossintético do metabolismo secundário microbiano é expresso levando ao gargalo atual experimentado na descoberta de novas substâncias bioativas a partir de fontes microbianas (HERTWECK, 2009; MARMANN et al. 2014). De fato, baseado no sequenciamento genético de vários fungos, estima-se que esses microrganismos sejam capazes de produzir muito mais metabólitos do que são observados em estudos laboratoriais de cultivos *in vitro* (MARMANN et al. 2014).

Os microrganismos são frequentemente encontrados na natureza em comunidades complexas onde produzem metabólitos secundários em função dos diferentes tipos de interações existentes (sexualização, inibição ou estimulação do crescimento), principalmente no que concerne à defesa ou competição por nutrientes (BERTRAND et al. 2014). De fato, a competição por recursos e o antagonismo entre as espécies que constituem esses microbiomas favorecem o desenvolvimento de

vários mecanismos de defesa que dependem principalmente da produção de substâncias bioativas (OLA et al. 2013).

São muitas as estratégias que podem ser empregadas em cultivos laboratoriais para induzir quimiodiversidade em certos microrganismos. Uma delas é o co-cultivo, definido como o cultivo simultâneo, em meio líquido ou sólido, de dois ou mais microrganismos no mesmo ambiente (KATHIRAVAN et al. 2012; BERTRAND et al. 2013; MOODY, 2014). Utiliza-se o co-cultivo na tentativa de mimetizar as condições hostis existentes em ecossistemas naturais (MARMANN et al. 2014). O cultivo simultâneo de dois ou mais microrganismos é, portanto, uma estratégia promissora aplicada no intuito de se acessar *clusters* genéticos silenciados possibilitando o aumento da diversidade química dos compostos produzidos pelos microrganismos de interesse (VIGNESHWARI et al. 2015) permitindo o acesso de novos metabólitos bioativos mesmo que os mecanismos de sinalização entre os microrganismos não sejam conhecidos (MOODY, 2014).

Além disso, diferentes abordagens experimentais de co-cultivo permitem que mecanismos de sinalização que ocorrem em comunidades de microrganismos e que caracterizam as interações entre as espécies sejam explorados (AZZOLLINI et al 2018). Nesse sentido, as estratégias de co-cultivo, também conhecidas por experimentos de confronto, têm recebido interesse crescente no que concerne a descoberta de potenciais vias biossintéticas específicas relacionadas principalmente à defesa dos microrganismos (BERTRAND et al. 2014). Segundo NEWMAN et al. (2020) existe um número significativo de produtos naturais candidatos à fármacos que foram produzidos por microrganismos e/ou pelas interações desses microrganismos no microbioma de origem, reforçando que a bioprospecção de produtos naturais microbianos bioativos a partir da utilização de co-cultivo é uma abordagem experimental que deve ser expandida e investigada cuidadosamente.

Desta forma, essa pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar as atividades biológicas de extratos provenientes de diferentes combinações de co-cultivo no intuito de provar que o cultivo simultâneo de diferentes microrganismos constitui uma excelente estratégia para aumentar a diversidade química e, conseqüentemente, o potencial biológico das amostras, sendo avaliados nesse trabalho o potencial de inibição da atividade proteolítica da catepsina V, as atividades antibacterianas contra cepas resistentes encontradas em ambientes clínicos, atividades tripanocida, leishmanicida e também atividade fungicida.

1.2. Experimental

1.2.1. Linhagens fúngicas

Fusarium guttiforme (nomeado Fungo 1), *Pestalotiopsis diospyri* (Fungo 2), *Phoma caricae-papayae* (Fungo 3), *Colletotrichum horii* (Fungo 4), *Phytophthora palmivora* (Fungo 5) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Fungo 6) foram obtidos da micoteca do Instituto Biológico do Estado de São Paulo. Todas as culturas axênicas foram preservadas em água ultrapura estéril, segundo o método de Castellani (CASTELLANI, 1963).

1.2.2. Condições de cultivo e co-cultivo fúngico

Um inóculo de cada uma das seis espécies fúngicas foi transferido dos seus respectivos estoques para o centro de uma placa de Petri contendo meio estéril de batata, dextrose e ágar (PDA, Acumedia[®], Neogen Corp., Michigan, USA), autoclavado a 121 °C por 25 minutos. Essas placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C em demanda biológica de oxigênio (DBO Solab SL-200) com fotoperíodos de 12 h. Após três repiques sucessivos de cada uma dessas placas, seis discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos dessas placas e inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, boca larga, contendo 200 mL de meio de batata e dextrose (PDB, Acumedia[®], Neogen Corp., Michigan, USA) dissolvidos em água destilada previamente estéril. Para cada experimento de cultivo axênico ou co-cultivo, foram utilizados seis frascos Erlenmeyer como descrito.

Os seis fungos foram cultivados individualmente e também combinados de todas as formas possíveis entre si, resultando em 63 extratos (6 cultivos axênicos e 57 experimentos de co-cultivo) onde a inoculação das diferentes espécies fúngicas nos experimentos de co-cultivo foi feita simultaneamente. Os frascos foram incubados por 28 dias a 25 °C em modo estático. Passado o tempo de incubação, para os experimentos de 1 a 15 os seis frascos de cada experimento foram reunidos e homogeneizados antes do procedimento de extração, resultando em apenas uma replicata. Para os experimentos de 16 a 63 os frascos foram reunidos dois a dois, obtendo-se então triplicatas de cada co-cultivo.

1.2.3. Filtração e partição líquido-líquido do caldo aquoso

O micélio de cada experimento de cultivo fúngico foi separado do seu caldo aquoso por filtração à vácuo utilizando-se papel de filtro quantitativo (125 mm, Unifil®). Cada volume do filtrado aquoso foi submetido a três partições líquido-líquido sucessivas com meio volume de acetato de etila (grau analítico, Synth®). Depois de particionado, o filtrado aquoso foi descartado e cada volume da fase orgânica foi submetida a três partições líquido-líquido sucessivas com meio volume de água destilada (*clean up*). O solvente foi então evaporado à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório (Rotavapor R-114 e R-200 equipados com banho térmico B-480, BUCHI, acoplados a reciclador refrigerado CFT-25, NESLAB).

1.2.4. Bioensaio sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Todas as bactérias usadas nesse estudo foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) da “Coleção de Microrganismos de Referência Usados em Controle de Qualidade”, gentilmente doadas pelo Laboratório de Materiais de Referência, Departamento de Microbiologia, Fundação Oswaldo Cruz (RJ, Brasil).

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada contra bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 700221) e bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Os testes de triagem foram conduzidos em duplicatas, seguindo a recomendação do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2017).

Cada extrato foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em BBL Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted) (MHCA) (Becton Dickinson, MD, USA) para concentração de 512 µg/mL a 1% (v/v) de DMSO, como recomendado pelo CLSI (CLSI, 2017). Os inóculos foram adicionados aos poços de uma microplaca de acordo com o *guideline* do CLSI para o método de microdiluição (CLSI, 2015). O controle positivo consistiu de MHCA com 1% de DMSO onde cada bactéria foi adicionada. O controle negativo consistiu de MHCA puro, sem a bactéria ou extrato.

As placas foram incubadas a 37 °C e a bioatividade analisada pela medida da densidade ótica de cada poço em um leitor de placa de microtitulação 24

h após adição do extrato. Quando nenhum crescimento bacteriano foi observado o extrato foi considerado ativo exibindo atividade bactericida na concentração de 512 µg/mL ou menor. Neste caso, a concentração inibitória mínima (MIC) pode ser considerada ≤ 512 µg/mL. Se foi observado crescimento bacteriano o extrato é considerado inativo naquela concentração. Contudo, resultados negativos não excluem a possibilidade de que o extrato possa ser ativo em concentrações mais altas e então expressas como > 512 µg/mL. Inibição parcial de crescimento bacteriano de 50% (ou maior) comparado com o controle positivo também foi indicado.

1.2.5. Bioensaio antiprotozoário

Cepas de *T. cruzi* e *L. infantum* foram gentilmente fornecidas por Frederick S. Buckner (Universidade de Washington, USA) e Angela K. Cruz (Universidade de São Paulo, Brasil), respectivamente.

1.2.5.1. Bioensaio sobre *Leishmania infantum*

Culturas axênicas de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas em meio M199 (pH 7.4) suplementadas com 10% de soro fetal de vitelo inativado termicamente e cultivadas a 28 °C (GUPTA, 2011). Os extratos foram diluídos em meio de cultura e testados a 20 µg/mL. Ensaios fluorimétricos foram conduzidos em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços onde cada poço continha 100 µL de meio de cultura com população inicial de 1×10^5 células de *L. infantum* obtidas a partir de culturas axênicas em estágio avançado de crescimento. Em poços de controle negativo (100% de crescimento parasitário) todos os componentes foram adicionados, exceto os extratos a serem ensaiados. O medicamento de referência miltefosina foi usado como controle positivo. Após 72 h de incubação, 10 µL de Alamar Blue (LOSET et al. 2009) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 3 h. Então, as placas foram lidas por fluorímetro de microplaca, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 536 nm e 588 nm, respectivamente (MIKUS e STEVERDING, 2000). Inibição do crescimento foi expresso como um percentual da fluorescência do controle negativo. Extratos com percentual de inibição de crescimento igual ou maior que 50% foram considerados ativos.

1.2.5.2. Bioensaio sobre *Trypanosoma cruzi*

Fibroblastos humanos HFF-1 foram cultivados em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% FCS (5% CO₂ a 37 °C). Culturas axênicas de *T. cruzi* epimastigotas (MHOM/CH/OO/Tulahuen C₂, lacZ) foram mantidas a 28 °C em meio LIT (10% FCS). Epimastigotas em crescimento exponencial foram colhidas, centrifugadas (10 min, 250 RCF) e ressuspensas em 1 mL de Grace's Insect Medium (10% FCS). A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos foi monitorada de 5 a 14 dias. Posteriormente, os parasitas foram colhidos e usados para infectar células HFF-1 em meio DMEM sem vermelho fenol (10% FCS, 5% CO₂ a 37 °C).

A triagem dos extratos contra *T. cruzi* foi realizada em placas de cultura de tecidos de 96 poços. Fibroblastos humanos HFF-1 foram semeados a 5x10⁴ células/poço em 80 µL de DMEM sem vermelho fenol e incubados *overnight*. No dia seguinte, tripomastigotas em Grace's Insect Medium foram adicionadas a 5x10⁵ células/poço. Após 24 h, o meio foi removido para limpar parasitas não infectantes, substituindo os poços com 100 µL de meio fresco. Depois, os extratos foram adicionados na concentração de 20 µg/mL e os pratos incubados por 120 h (5% CO₂ a 37°C). Todas as placas incluíam controle negativo e benznidazol como controle positivo. Depois, 50 µL de CPRG (1 mM) e IGEPAL CA-630 (concentração final de 0,1%) foram adicionados em cada poço. Em poços com atividade β-galactosidase, a variação da cor do meio de amarelo para vermelho foi medida em leitor de absorbância de microplaca a 570 nm.

Os dados foram transferidos para uma planilha do Excel e avaliados para determinação dos percentuais de inibição em relação ao controle não tratado. A inibição de crescimento foi expressa como um percentual da absorbância do controle negativo (100% de crescimento parasitário) (FERREIRA et al. 2019). Aqueles extratos que causaram inibição de crescimento igual ou maior que 50% foram considerados ativos.

1.2.6. Bioensaio de inibição da atividade da catepsina V

Catepsina V humana recombinante foi produzida usando o sistema de expressão de *Pichia pastoris*, como descrito previamente (BRÖMME et al. 1999). A concentração molar da enzima foi determinada pela titulação do sítio ativo com o

inibidor irreversível E-64, seguindo condições descritas previamente (BARRET et al. 1982).

A inibição da atividade proteolítica da catepsina V foi avaliada *in vitro* como descrita previamente (SEVERINO et al. 2011; SARRIA et al. 2018). Brevemente, a atividade enzimática foi medida pelo aumento da fluorescência devido a hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA (Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina) pela catepsina V, liberando o resíduo fluorescente MCA. Os testes foram conduzidos em triplicata utilizando microplaca preta de ELISA e de fundo plano, 96 poços. A fluorescência foi detectada em um espectrofluorímetro SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 nm e 460 nm, respectivamente. Extratos foram dissolvidos em DMSO e ensaiados na concentração de 100 µM. Todos os ensaios foram realizados a 27 °C em um tampão acetato de sódio na concentração de 100 mM (pH 5,5 contendo 2,5 mM de DTE e 2,5 mM de EDTA) e uma concentração fixa de enzima e substrato, 2 nM e 10 µM, respectivamente. A enzima foi previamente ativada por 5 min com DTE e então incubada com o extrato por 5 min. O substrato Z-FR-MCA foi então adicionado e o aumento da fluorescência foi lido por 5 min. Experimento controle foi realizado sem o extrato (controle negativo) e na presença do inibidor irreversível de cisteíno protease E-64 (controle positivo).

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação: % inibição = $100 \times (1 - V_i/V_0)$, onde V_i e V_0 são as velocidades determinadas na presença e na ausência do inibidor, respectivamente. Aqueles extratos com percentual de inibição enzimática maior ou igual a 85 % foram considerados ativos.

1.2.7. Ensaio fungicida de difusão em ágar

Cada extrato ensaiado foi dissolvido em acetona na concentração de 50 µg/µL. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. Para cada experimento, uma placa de Petri contendo meio PDA foi inoculada com 1 µL de uma cultura líquida de um fungo e 2 µL do extrato na concentração citada. A suspensão com as estruturas reprodutivas do fungo foi aplicada 0,5 cm da borda da placa de Petri enquanto o extrato foi aplicado a 0,5 cm do inóculo (1,0 cm da borda da placa). Cada extrato foi aplicado em posições diametralmente opostas (portanto, em uma mesma placa de Petri tem-se sempre o ensaio feito em duplicata para cada amostra testada). O

experimento controle foi feito usando-se 2 μL de acetona (grau analítico, previamente estéril) ao invés do extrato. As placas foram então incubadas por 3 dias em DBO com fotoperíodos de 12 h, a temperatura controlada de 28 °C.

1.2.8. Ensaio fungicida de incorporação de extrato em ágar

Cada experimento foi realizado solubilizando-se o extrato na concentração final de 0,5 mg/mL em meio PDA previamente estéril. Uma vez incorporado o extrato no meio de cultivo o experimento foi incubado por 4 dias em DBO com fotoperíodos de 12 h, a temperatura controlada de 28 °C. Experimentos controle foram realizados utilizando-se acetona estéril grau analítico (controle do solvente) ou meio PDA puro estéril (controle do meio de cultivo). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

1.2.9. Análises de RMN de ^1H

Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 400, utilizando-se tubos de RMN Bruker de 5 mm. Amostras foram preparadas na concentração de 15 mg/mL em acetona- d_6 (Sigma-Aldrich®) contendo 0,05% de TMS. Espectros foram adquiridos com 128 *scans* e janela espectral de 22 ppm. Sinais residuais de acetona foram usados para calibrar os espectros.

1.2.10. Quimiometria

Análises dos componentes principais (PCA) utilizando-se os dados espectrais de RMN de ^1H obtidos dos 63 extratos foram realizadas no MATLAB 2011a. Foi usada região espectral de deslocamento químico entre 1,0 ppm e 11,0 ppm excluindo-se o sinal residual do solvente. Os dados espectrais de cada extrato foram organizados em seis subconjuntos (Tabela A.1, Apêndice). O primeiro subconjunto, nomeado subconjunto preliminar, contém sete elementos sendo formado pelas seis culturas axênicas e pelo co-cultivo de todos esses fungos. Cada um dos outros cinco subconjuntos contém trinta e dois elementos, sendo formado por uma certa cultura axênica e todas as suas combinações de co-cultivo. As PCAs criadas para todos os subconjuntos foram processadas utilizando-se *autoscaling*, exceto para o subconjunto do fungo 6.

1.2.11. Isolamento do ácido indolacético

Extrato da cultura axênica do Fungo 4 (45,00 mg) foi suspenso em 2 mL de acetona (grau analítico, Synth®) e filtrado utilizando-se filtro hidrofóbico PTFE de 0,22 µm (Analítica). Após filtração, um excesso de 2 mL de solvente foi aplicado para minimizar perdas de material possivelmente retidos no filtro. O solvente foi totalmente evaporado e o extrato suspenso em 500 µL de acetona, o que representa 2% do volume do leito cromatográfico da coluna de Sephadex® LH-20 utilizada (310×10 mm, h x d.i.). O procedimento de eluição foi feito usando-se 125 mL de acetona, o que representa cinco volumes do leito cromatográfico. Trinta frações foram coletadas: as primeiras vinte e cinco foram coletadas a cada 2 mL e as últimas cinco coletadas a cada 15 mL. As frações foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico obtidos por CCD em quatro novas frações: F4.1 (25.3 mg, 1-15), F4.2 (11.2 mg, 16-18), F4.3 (6.3 mg, 19-25), F4.4 (1.5 mg, 26-30). As análises de RMN de ¹H dessas frações indicam que a fração F4.2 é uma substância pura, identificada como ácido indolacético.

1.3. Avaliação das atividades bactericidas, antiprotozoárias e inibidoras de cisteíno proteases

1.3.1. Resultados e discussão

As massas dos 63 extratos obtidos do cultivo fúngico em meio líquido (item 1.2.2) encontram-se na Tabela 1. Esses extratos foram avaliados frente a diferentes atividades biológicas: bactericida (item 1.2.4), antiprotozoária (item 1.2.5) e inibidora da atividade enzimática da catepsina V (item 1.2.6). Os resultados desses ensaios foram apresentados nas Tabelas 1.2-1.4 e serão discutidos posteriormente. De maneira geral, os resultados das atividades biológicas foram mais promissores em extratos provenientes de experimentos de co-cultivo uma vez que atividades antibacterianas e antiprotozoárias não foram observadas para nenhum cultivo axênico.

Essa avaliação preliminar já permite inferir que o co-cultivo fúngico pode aumentar o potencial biológico das amostras. De fato, na sua revisão, MARMAN et al. (2014) demonstrou que o co-cultivo aumenta a diversidade química dos compostos

produzidos por fungos e bactérias. Estes compostos são, em geral, bioativos e exibem atividades antibiótica, citotóxica e antifúngica.

TABELA 1.1 - Experimentos de cultivo axênico e co-cultivo.

Extrato	Fungo	Massa/mg	Extrato	Fungo	Massa/mg
1	1	45.28	25.1		17.52
2	2	18.26	25.2	1 + 2 + 6	15.20
3	3	18.42	25.3		15.42
4	4	61.25	26.1		16.47
5	5	59.98	26.2	1 + 3 + 4	13.44
6	6	62.06	26.3		16.58
7	1 + 2	46.27	27.1		15.40
8	1 + 3	42.83	27.2	1 + 3 + 5	15.02
9	1 + 4	49.60	27.3		14.29
10	1 + 5	44.04	28.1		17.54
11	1 + 6	38.41	28.2	1 + 3 + 6	17.06
12	2 + 3	8.78	28.3		17.38
13	2 + 4	9.50	29.1		11.10
14	2 + 5	10.32	29.2	1 + 4 + 5	10.14
15	2 + 6	17.10	29.3		10.18
16.1		17.07	30.1		17.65
16.2	3 + 4	17.85	30.2	1 + 4 + 6	17.16
16.3		16.61	30.3		21.98
17.1		5.64	31.1		30.77
17.2	3 + 5	4.38	31.2	1 + 5 + 6	26.13
17.3		4.22	31.3		21.61
18.1		4.87	32.1		16.77
18.2	3 + 6	4.90	32.2	2 + 3 + 4	17.70
18.3		4.16	32.3		18.12
19.1		15.52	33.1		6.70
19.2	4 + 5	15.93	33.2	2 + 3 + 5	6.30
19.3		15.72	33.3		6.73
20.1		16.68	34.1		3.55
20.2	4 + 6	15.30	34.2	2 + 3 + 6	3.00
20.3		16.55	34.3		3.08
21.1		10.25	35.1		24.80
21.2	5 + 6	8.86	35.2	2 + 4 + 5	22.17
21.3		11.77	35.3		22.49
22.1		10.32	36.1		32.91
22.2	1 + 2 + 3	10.84	36.2	2 + 4 + 6	45.98
22.3		10.18	36.3		37.38
23.1		11.23	37.1		7.21
23.2	1 + 2 + 4	10.68	37.2	2 + 5 + 6	7.56
23.3		10.34	37.3		8.12
24.1		18.04	38.1		17.03
24.2	1 + 2 + 5	16.86	38.2	3 + 4 + 5	22.88
24.3		15.60	38.3		17.46

Continua

TABELA 1.1 - Experimentos de cultivo axênico e co-cultivo.

Extrato	Fungo	Massa/mg	Extrato	Fungo	Massa/mg
39.1		18.62	52.1		26.93
39.2	3 + 4 + 6	19.02	52.2	2 + 3 + 4 + 5	28.80
39.3		16.12	52.3		30.97
40.1		9.70	53.1		19.05
40.2	3 + 5 + 6	8.28	53.2	2 + 3 + 4 + 6	20.50
40.3		5.94	53.3		17.76
41.1		20.15	54.1		23.20
41.2	4 + 5 + 6	18.36	54.2	2 + 3 + 5 + 6	20.87
41.3		21.28	54.3		19.26
42.1		20.46	55.1		22.26
42.2	1 + 2 + 3 + 4	21.68	55.2	2 + 4 + 5 + 6	27.28
42.3		20.82	55.3		24.79
43.1		19.71	56.1		24.75
43.2	1 + 2 + 3 + 5	20.31	56.2	3 + 4 + 5 + 6	25.83
43.3		19.05	56.3		20.18
44.1		18.83	57.1		20.40
44.2	1 + 2 + 3 + 6	19.09	57.2	1 + 2 + 3 + 4 + 5	17.91
44.3		16.44	57.3		19.77
45.1		18.37	58.1		18.34
45.2	1 + 2 + 4 + 5	18.19	58.2	1 + 2 + 3 + 4 + 6	19.03
45.3		19.75	58.3		18.75
46.1		21.22	59.1		17.11
46.2	1 + 2 + 4 + 6	16.96	59.2	1 + 2 + 3 + 5 + 6	18.55
46.3		20.65	59.3		16.98
47.1		18.52	60.1		17.83
47.2	1 + 2 + 5 + 6	18.35	60.2	1 + 2 + 4 + 5 + 6	18.09
47.3		17.41	60.3		18.22
48.1		18.78	61.1		17.81
48.2	1 + 3 + 4 + 5	19.44	61.2	1 + 3 + 4 + 5 + 6	15.90
48.3		18.83	61.3		16.95
49.1		16.80	62.1		15.37
49.2	1 + 3 + 4 + 6	18.13	62.2	2 + 3 + 4 + 5 + 6	15.00
49.3		17.63	62.3		14.96
50.1		18.06	63.1		16.12
50.2	1 + 3 + 5 + 6	19.44	63.2	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	20.41
50.3		17.66	63.3		17.48
51.1		18.94			
51.2	1 + 4 + 5 + 6	19.18			
51.3		24.63			

TABELA 1.2 - Atividade antibacteriana dos extratos na concentração de 512 µg/mL.

Extrato	Linhagens bacterianas							
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 700221	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	± ¹	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	± ²	-	+	-	-	-	-	-
20	± ³	-	+	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	± ⁴	-	-	-	-	-	-
23	± ⁵	-	-	-	-	-	-	-
24	± ⁶	-	-	-	-	-	-	-

Continua

TABELA 1.2 - Atividade antibacteriana dos extratos na concentração de 512 µg/mL.

Extrato	Linhagens bacterianas							
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 700221	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
25	± ⁷	-	-	-	-	-	-	-
26	± ⁸	-	-	-	-	-	-	-
27	± ⁹	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	± ¹⁰	-	-	-	-	-	-
30	± ¹¹	+	-	± ¹²	-	± ¹³	-	-
31	± ¹⁴	+	+	-	-	-	-	-
32	± ¹⁵	± ¹⁶	-	-	-	-	-	-
33	+	± ¹⁷	± ¹⁸	-	-	-	-	-
34	+	± ¹⁹	-	-	-	-	-	-
35	+	+	-	-	+	-	-	-
36	+	+	-	-	-	-	-	-
37	+	± ²⁰	-	-	-	-	-	-
38	+	+	-	-	-	-	-	-
39	-	-	+	-	-	-	-	-
40	-	-	+	-	-	-	-	-
41	-	-	+	-	-	-	-	-
42	-	-	+	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	± ²¹	+	+	-
46	+	+	+	+	+	+	+	-

Continua

TABELA 1.2 - Atividade antibacteriana dos extratos na concentração de 512 µg/mL.

Extrato	Linhagens bacterianas							
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 700221	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
47	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	+	-	-	+	± ²²	+	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Inibição parcial de 72.7% de *E. faecium* ATCC 700221 pelo extrato 11 ▪ ²Inibição parcial de 53.3% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 19 ▪ ³Inibição parcial de 59.0% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 20 ▪ ⁴Inibição parcial de 50.3% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 22 ▪ ⁵Inibição parcial de 86.9% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 23 ▪ ⁶Inibição parcial de 76.2% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 24 ▪ ⁷Inibição parcial de 75.4% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 25 ▪ ⁸Inibição parcial de 80.3% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 26 ▪ ⁹Inibição parcial de 70.5% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 27 ▪ ¹⁰Inibição parcial de 86.03% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 29 ▪ ¹¹Inibição parcial de 90% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 30 ▪ ¹²Inibição parcial de 71.12% de *E. faecium* ATCC 700221 pelo extrato 30 ▪ ¹³Inibição parcial de 80.6% de *E. coli* ATCC 25922 pelo extrato 30 ▪ ¹⁴Inibição parcial de 58.27% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 31 ▪ ¹⁵Inibição parcial de 88.5% de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelo extrato 32 ▪ ¹⁶Inibição parcial de 68% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 32 ▪ ¹⁷Inibição parcial de 83.4% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 33 ▪ ¹⁸Inibição parcial de 51.5% de *E. faecalis* ATCC 29212 pelo extrato 33 ▪ ¹⁹Inibição parcial de 86.1% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 34. ²⁰Inibição parcial de 73.4% de *S. aureus* ATCC 25923 pelo extrato 37 ▪ ²¹Inibição parcial de 83.8% de *K. pneumoniae* ATCC 700603 pelo extrato 45. ²²Inibição parcial de 98.5% de *E. coli* ATCC 25922 pelo extrato 51.

TABELA 1.3 - Atividade antiprotozoária dos extratos.

Extrato	<i>L. infantum</i> (% inibição)	<i>T. cruzi</i> (% inibição)	Extrato	<i>L. infantum</i> (% inibição)	<i>T. cruzi</i> (% inibição)
1	22	22	34	0	0
2	7	25	35	29	0
3	0	0	36	36	6
4	0	8	37	2	57
5	0	29	38	26	0
6	0	14	39	0	52
7	40	3	40	0	0
8	39	5	41	0	0
9	73	0	42	3	2
10	43	58	43	0	0
11	57	36	44	0	0
12	4	30	45	3	45
13	0	51	46	0	0
14	0	47	47	16	62
15	0	43	48	8	21
16	0	9	49	36	49
17	0	0	50	9	45
18	0	0	51	0	13
19	0	0	52	0	9
20	0	9	53	3	10
21	0	0	54	3	0
22	44	39	55	3	41
23	0	21	56	0	43
24	83	26	57	50	30
25	98	61	58	0	30
26	19	2	59	6	60
27	12	56	60	49	47
28	0	19	61	36	56
29	16	0	62	92	12
30	0	0	63	37	11
31	0	47	MILT	97	-
32	0	43	BZ	-	90
33	0	15			

Extratos com atividade antiprotozoária são aqueles que obtiveram percentuais de inibição $\geq 50\%$.
MILT = miltefosina; BZ = benznidazol

TABELA 1.4 - Inibição da atividade enzimática da catepsina V.

Extrato	% inibição	Extrato	% inibição
1	82	33	38
2	72	34	28
3	70	35	66
4	96	36	84
5	78	37	19
6	55	38	92
7	81	39	88
8	89	40	34
9	62	41	90
10	86	42	76
11	94	43	86
12	71	44	81
13	12	45	86
14	62	46	87
15	71	47	61
16	73	48	77
17	72	49	64
18	63	50	71
19	82	51	72
20	70	52	85
21	88	53	71
22	91	54	82
23	90	55	69
24	54	56	79
25	86	57	45
26	83	58	29
27	91	59	26
28	74	60	27
29	93	61	13
30	70	62	66
31	73	63	31
32	81	E-64	100

Extratos ativos foram aqueles que obtiveram valores de percentual $\geq 85\%$.

E-64 = L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido (4-guanidino) butano.

Em relação aos resultados apresentados na Tabela 1.2, dos 63 extratos avaliados 29 deles (ou seja, 46%) apresentaram atividade antibacteriana (inibição total e/ou parcial do crescimento bacteriano na concentração testada), todos provenientes de experimentos de co-cultivo. Em resumo, 60 resultados positivos foram observados contra alguma das oito bactérias testadas (38 resultados de inibição total e 22 de inibição parcial). Estes resultados indicam que o co-cultivo aumenta a probabilidade de obtenção de amostras bioativas, uma vez que metade dos extratos provenientes dos experimentos de co-cultivo apresentaram atividade antibacteriana enquanto que nenhum extrato obtido do cultivo axênico mostrou-se ativo.

Os extratos 45 e 46 apresentaram amplo espectro bactericida, atuando em seis e sete espécies, respectivamente, das oito testadas. Estes extratos foram obtidos do co-cultivo de quatro fungos diferentes (ver Tabela 1) onde três espécies são comuns em ambos os extratos (*F. guttiforme*, *P. diospyri* e *C. horii*) e os fungos *P. palmivora* e *C. gloeosporioides* são as espécies que diferenciam os extratos 45 e 46, respectivamente. Análise prévia dos espectros de RMN de ¹H desses extratos revelaram que essas amostras são compostas majoritariamente dos ácidos fusárico e 9,10-desidrofusárico, micotoxinas vastamente produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (BACON et al. 1996).

Dentre as várias atividades biológicas relatadas para o ácido fusárico, sua potente atividade bactericida é a mais relevante para este estudo. Atividade de inibição de *Quorum-sensing* em bactérias Gram-negativas também foi relatada por TUNG et al. (2017). Ácido fusárico exibiu atividade bactericida contra *Lactobacillus acidophilus* e *E. coli* com valores de IC₅₀ 64 µM para ambos os microrganismos, mas não foi ativo contra *S. aureus* e *Salmonella typhimurium* (SONDERGAARD et al. 2016). Embora os extratos 45 e 46 sejam ricos em ácido fusárico, os resultados de atividade bactericida obtidos nesse trabalho diferem em relação a *S. aureus* (embora concordem em relação a *E. coli*). Essa divergência indica que outras substâncias presentes no extrato, como o ácido 9,10-desidrofusárico, podem ser responsáveis pela atividade biológica relacionada a *S. aureus*. MAY et al. (2000) relatou a inibição do crescimento das bactérias *Ruminococcus albus* e *Methanobrevibacter ruminantium* pelo ácido fusárico na concentração de 84 µM. Vários fitopatógenos (*Phytophthora capsici*, *P. infestans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia glumae*, *Pectobacterium carotovora* ssp. *Carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*) foram consideravelmente inibidos pelo ácido fusárico em concentrações ≤100 µg/mL

(SON et al. 2008). Adicionalmente, essa substância apresentou efeitos bactericidas ou bacteriostáticos em várias cepas diferentes de *Bacillus mojavensis* (BACON et al. 2006).

O alto potencial bactericida do ácido fusárico, evidenciado pela literatura citada acima, permite justificar a atividade bactericida dos extratos 45 e 46. Em relação ao ácido 9,10-desidrofusárico, apenas atividades tais como inibição da germinação de sementes e do alongamento da raiz foram relatadas (CAPASSO et al. 1996; IDRIS et al. 2003). Trabalho subsequente com o ácido 9,10-desidrofusárico será conduzido com o intuito de se avaliar sua atividade bactericida, puro ou em combinação com o ácido fusárico e outros derivados dessa substância.

Entre os extratos que tiveram atividade antibacteriana parcial, o extrato 51 foi o mais ativo inibindo 98,5% do crescimento de *E. coli*. Contudo, o extrato 30 apresentou o maior espectro bactericida, inibindo o crescimento de três bactérias diferentes (*S. epidermidis* ATCC 35984, *E. faecium* ATCC 700221 e *E. coli* ATCC 25922) enquanto que outros extratos, geralmente, inibiram parcialmente apenas uma bactéria. O extrato 30 também contém os ácidos fusárico e 9,10-desidrofusárico, porém, em menor quantidade comparado com os extratos 45 e 46. É importante evidenciar que esse extrato difere do extrato 46 (amostra mais ativa) apenas pela ausência de *P. diospyri*, sugerindo que esse fungo é necessário para a obtenção do extrato totalmente ativo. Já o extrato 51 possui todos os mesmos fungos do extrato 30 e o fungo *P. palmivora* adicionalmente. Por outro lado, comparando com as espécies fúngicas que originaram o extrato 46, o extrato 51 contém *P. palmivora* ao invés do fungo *P. diospyri*.

Esses resultados evidenciam como o co-cultivo modifica a produção metabólica em uma certa condição e como isso se reflete nos resultados de atividade biológica. Também indica que uma espécie fúngica no co-cultivo pode potencializar a produção de substâncias bioativas em resposta às novas interações químicas que ocorrem naquele ambiente.

Em relação às bactérias usadas nos bioensaios, quatro (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*) são Gram-positivas e quatro (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*) são Gram-negativas. Destas, as bactérias Gram-positivas foram as mais inibidas sendo *S. epidermidis* a espécie mais suscetível a ação dos extratos. A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* provou ser a bactéria mais desafiadora dentre as espécies testadas não sendo inibida nem totalmente nem

parcialmente por nenhum dos extratos. Na maioria das infecções, como infecções urinária ou pulmonar, *P. aeruginosa* pode formar biofilmes que aumentam sua proteção contra a ação de antimicrobianos (DRENKARD, 2003).

Como foi observado nos ensaios de atividade antibacteriana, os resultados de atividade antiprotozoária dos extratos (Tabela 3) indicaram que todas as amostras bioativas foram provenientes de extratos obtidos de experimentos de co-cultivo, evidenciando uma tendência importante. Treze extratos foram ativos, representando 21% do total de amostras. Extratos de cultivo axênico não inibiram significativamente os protozoários. Como um exemplo, o extrato 3 do cultivo axênico do fungo *Phoma caricae-papayae* apresentou 0% de inibição contra ambos os protozoários.

Extratos provenientes dos experimentos de co-cultivo também foram muito seletivos frente aos protozoários, uma vez que apenas o extrato 25 foi bioativo contra ambos os parasitas. Mais extratos foram ativos contra *T. cruzi* do que contra *L. infantum* (oito e seis resultados positivos, respectivamente), contudo, o maior percentual de inibição foi observado contra *L. infantum*: o extrato 25 foi o mais ativo inibindo 98% do crescimento desse parasita, sendo mais ativo até que a miltefosina, usado como controle positivo (97% de inibição contra *L. infantum*). O extrato 25 também apresentou boa atividade antiprotozoária contra *T. cruzi* (61% de inibição) menor apenas que o extrato 47 (mais ativo, com 62% de inibição).

Note que o extrato 25 foi obtido do co-cultivo dos fungos *F. guttiforme*, *P. diospyri* e *C. gloeosporioides* enquanto que o extrato 47 foi obtido do co-cultivo dos mesmos três fungos mais *P. palmivora*. Esse é um exemplo de como as espécies fúngicas presentes em um co-cultivo são extremamente importantes no que concerne à variedade química das substâncias que estão sendo produzidas e como isso se reflete nas atividades biológicas observadas: a ausência de *P. palmivora* fez o extrato 25 extremamente ativo contra *L. infantum* enquanto que sua presença fez o extrato 47 inativo contra esse protozoário, contudo ativo contra *T. cruzi*.

Outra observação importante é que o extrato 9 (co-cultivo de *F. guttiforme* e *C. horii*) e o extrato 11 (co-cultivo de *F. guttiforme* e *C. gloeosporioides*) foram ativos contra *L. infantum*, contudo, o extrato 30 que foi obtido do co-cultivo dos 3 fungos comuns aos extratos 9 e 11 (*F. guttiforme*, *C. horii* e *C. gloeosporioides*) não apresentou atividade biológica contra o protozoário. Isto indica o quanto são específicas as interações entre os fungos em cada co-cultivo.

A presença do fungo *F. guttiforme* nos diferentes co-cultivos bioativos parece ter sido crucial para a atividade leishmanicida observada, uma vez que os extratos 9, 11, 24, 25 e 57 contém esse fungo e foram ativos contra *L. infantum*. Isso faz parecer que todas as amostras bioativas contra esse protozoário possuíam a mesma substância responsável pela atividade biológica. Isso é possível, contudo, dada a diversidade química dessas amostras, evidenciada pelos perfis químicos obtidos por espectros de RMN de ^1H tal racionalização é precipitada. Por fim, o extrato 62 (segundo mais ativo contra *L. infantum*) foi obtido de um co-cultivo que não incluía o fungo *F. guttiforme*, o que permite inferir que substâncias biologicamente ativas e estruturalmente distintas foram produzidas.

Uma ampla investigação sobre atividades biológicas de fungos endofíticos mostrou que extratos de fungos do gênero *Colletotrichum* e *Fusarium*, entre outros, exibiram atividade leishmanicida e tripanocida (ROSA et al. 2010). Também inibiram gGAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *T. cruzi* e APRT (Adenina fosforribosiltransferase) de *L. tarentolae*, exibindo potencial atividade antiparasitária (GUIMARÃES et al. 2008).

Ensaio de inibição da atividade proteolítica da catepsina V apresentou 17 resultados positivos, o que representa 27% das 63 amostras testadas (Tabela 4). Apenas um extrato bioativo (extrato 4) foi obtido de um cultivo axênico, sendo uma exceção entre os resultados positivos: todos os outros extratos que apresentaram inibição enzimática da catepsina V foram provenientes de experimentos de co-cultivo. O extrato 4, obtido do cultivo axênico do fungo *C. horii*, foi a amostra mais ativa, exibindo 96% de inibição de atividade enzimática. O extrato 11 foi o experimento que apresentou a mais alta atividade biológica dentre os experimentos de co-cultivo, com percentual de inibição de 94%. Note que esse extrato é proveniente de um co-cultivo que não contém *C. horii*. O extrato 13, obtido do co-cultivo entre os fungos *C. horii* e *P. diospyri*, exibiu o percentual de inibição mais baixo (12%).

Na literatura estão descritos alguns resultados de inibição de atividade enzimática de catepsinas por extratos fúngicos ou substâncias puras. As atividades enzimáticas das catepsinas B e V foram inibidas por lactonas tetraênicas produzidas pelo fungo *Talaromyces wortmannii*. Tais substâncias exibiram IC_{50} entre 4,3 e 13,0 μM (DONG et al. 2009). Já as atividades das catepsinas L e B foram inibidas pelo acetato de aurantiamida, substância produzida pelo fungo *Aspergillus penicillioides*, com valores de IC_{50} de 12 e 49 μM , respectivamente (ISSHIKI et al. 2001). Contudo,

outras cisteíno proteases não foram inibidas mesmo em concentrações de acetato de aurantiamida tão altas quanto 100 μM . Extrato metanólico do fungo *Microascus longirostris* e epoxisuccinatos isolados desse extrato também inibiram a atividade das catepsinas B e L e da papaína (YU et al. 1995). SABOTIC e KOS (2012) apresentaram uma revisão sobre inibidores da atividade proteolítica de proteases reportando várias substâncias inibidoras de catepsinas, citando especificamente a substância clitocipina, um inibidor da catepsina V (e também de outras catepsinas) que foi isolada do fungo *Clitocybe nebularis* (BRZIN et al. 2000).

Em relação a inibidores de catepsina V obtidos de outras fontes naturais, SEVERINO et al. (2011) descreveu alguns alcalóides acridônicos, especificamente a citibrasina, que exibiram alta atividade contra a catepsina V, sendo considerados então substâncias promissoras. Posteriormente, SARRIA et al. (2018) mostrou que chalconas diméricas inibiam fortemente a atividade enzimática da catepsina V. Urundeuvinas D e E foram as mais ativas, com valores de IC_{50} de 0.70 e 0.42 μM , respectivamente. Acredita-se que urudevina D é o inibidor natural de catepsina V mais potente já estudado. SARRIA et al. (2018) investigou também a atividade de dois flavonóides (luteolina e 5,2'-diidroxí-3-metoxi-6,7-(2',2'-dimetilcromeno)-8-(3'',3''-dimetilalilflavanona), que apresentaram valores de IC_{50} de 2,5 e 13,5 μM , respectivamente. Recentemente, SILVA et al. (2019) determinou a atividade inibitória da catepsina V das substâncias 8-metoxicoumestrol (IC_{50} de $17,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$) e de um éster derivado do ácido trans-p-cumárico (94% de inibição a 50 $\mu\text{g/mL}$).

1.3.2. Conclusão

Os resultados das atividades antibacteriana e antiprotozoária mostraram que o co-cultivo fúngico aumenta a probabilidade de obtenção de substâncias com atividades antimicrobianas e antiparasitárias, uma vez que todos os extratos ativos nesses ensaios foram obtidos de experimentos de co-cultivo.

Considerando os resultados de inibição da atividade proteolítica da catepsina V, embora o extrato mais ativo tenha sido obtido de um cultivo axênico, esse resultado foi uma exceção de uma tendência geral observada, uma vez que todos os outros 16 extratos ativos nesse ensaio foram provenientes de experimentos de co-cultivo.

Desta forma, os resultados de ensaios biológicos apresentados nesse trabalho evidenciaram que o co-cultivo é uma excelente estratégia para obtenção de extratos e substâncias biologicamente ativas.

Os resultados dessa pesquisa foram publicados no artigo “Liquid Fungal Cocultivation as a Strategy to Access Bioactive Metabolites”. *Planta Medica*, 2020. <https://doi.org/10.1055/a-1200-2046>.

1.4. Desenvolvimento de um novo método para identificação de antagonismo entre espécies fúngicas e avaliação de atividade fungicida

1.4.1. Considerações teóricas

Imagine-se uma micoteca com uma coleção imensa e variada de fungos isolados de diferentes fontes. É certo que uma espécie nessa coleção deve exercer maior antagonismo frente às outras espécies. Mas como identificá-la? Seria possível propor um experimento ou uma série de experimentos que pudessem prever, com alguma precisão e confiança, qual espécie em uma coleção produz substâncias potencialmente fungicidas contra as demais? De fato, vários métodos para se avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos têm sido padronizados e continuam sendo desenvolvidos. Contudo, quando produtos naturais são avaliados, algumas modificações nesses protocolos precisam ser consideradas (BALOUIRI et al. 2016). Além disso, métodos para avaliação de atividade fungicida geralmente necessitam de grande quantidade de amostras, comumente não disponíveis em investigações de produtos naturais.

Muitas rotas biossintéticas do metabolismo fúngico não são expressas quando estes microrganismos são cultivados individualmente em condições laboratoriais (HERTWECK, 2009; MARMANN et al. 2014). Uma excelente alternativa para ativar tais rotas metabólicas silenciadas é o co-cultivo, ou seja, o cultivo simultâneo de duas ou mais espécies de microrganismos no mesmo ambiente (KATHIRAVAN et al. 2012; BERTRAND et al. 2013; MOODY, 2014). O co-cultivo pode ocorrer entre fungos do mesmo gênero, que coexistem ou não na mesma microbiota, ou entre gêneros de fungos totalmente diferentes, de microbiotas também distintas (HERTWECK, 2009).

CHAGAS (2010) concluiu, a partir de um rigoroso estudo de diferentes condições de co-cultivo em meio líquido, que o perfil químico do co-cultivo resultante da combinação de dois microrganismos se assemelhava fortemente ao perfil químico do cultivo axênico de uma certa cultura se essa espécie fosse inoculada previamente. Concluiu também que, dentre as diferentes formas de se inocular os microrganismos em um experimento de co-cultivo, a inoculação simultânea das duas espécies fúngicas conferiu a melhor condição experimental de cultivo tendo como parâmetro diversidade metabólica.

O espectro de RMN de ^1H dos metabólitos produzidos em um co-cultivo pode ter, essencialmente, uma das seguintes características: (a) pode ser a sobreposição (a média) dos perfis químicos das culturas axênicas, ou seja, pode conter informações estruturais dos metabólitos que são produzidos pelos diferentes microrganismos quando cultivados individualmente; (b) conter informações estruturais totalmente distintas da produção metabólica dos cultivos axênicos, ou seja, pode haver divergência total de perfil químico do co-cultivo comparado com os perfis químicos dos cultivos axênicos; ou (c) pode haver predomínio das características estruturais da produção metabólica de um dos fungos, ou seja, pode haver convergência de perfil químico de uma das espécies.

Essas observações experimentais do perfil químico da produção metabólica de um experimento de co-cultivo podem fornecer informações importantes sobre as relações ecológicas que ocorrem entre os microrganismos naquele ecossistema. É razoável inferir que em (a) ambos os fungos coexistem sem que essas espécies causem prejuízo recíproco; em (b), é possível que rotas biossintéticas distintas, comparadas àquelas observadas nos cultivos axênicos, estejam sendo expressas. A situação em (c) é particularmente interessante e objeto dessa pesquisa.

Imagine-se o seguinte experimento: o cultivo axênico de dois fungos (fungos 1 e 2, hipoteticamente) em meio líquido e também o co-cultivo desses dois microrganismos. Todos os experimentos foram feitos rigorosamente sob as mesmas condições. Análises dos espectros de RMN de ^1H mostraram que o perfil químico da combinação desses dois fungos apresentou forte semelhança com o perfil químico do cultivo axênico do fungo 1. Uma questão pertinente seria “se ambos os fungos foram inoculados ao mesmo tempo no meio de cultivo por que existe predominância do perfil químico de uma das espécies?”. Duas hipóteses são relevantes: ou os metabólitos produzidos pelo fungo 2 foram extensivamente metabolizados (biotransformados) pelo fungo 1 ou o fungo 2 simplesmente não produziu substância alguma. Neste último caso, o fungo 1 exerceu atividade antagônica sobre o fungo 2 (silenciamento ou morte dessa espécie).

As características espectrais contidas no perfil químico de um experimento de co-cultivo e as suposições acerca das relações ecológicas existentes naquele experimento conduzem ao seguinte questionamento: é possível associar a informação estrutural contida em um espectro de RMN de ^1H com uma possível atividade antagonística exercida por uma espécie fúngica em um experimento de co-

cultivo? A partir da investigação cuidadosa de vários co-cultivos e das análises dos seus perfis químicos foi proposta a seguinte hipótese:

“Deve existir uma relação fundamental entre convergência de perfil químico e atividade fungicida em um experimento de co-cultivo. Quanto maior a semelhança entre o perfil químico de um experimento de co-cultivo e o perfil químico de um determinado cultivo axênico maior o potencial antagônico dessa espécie sobre as demais”. Similarmente, “quanto maior a divergência de perfil químico entre um cultivo axênico e seu co-cultivo maior é a probabilidade de que essa amostra, proveniente do experimento de co-cultivo, tenha atividade fungicida contra a cultura axênica”.

Desta forma, a ideia principal é que existe grande probabilidade de uma espécie fúngica apresentar atividade fungicida contra outros fungos quando o perfil químico do seu cultivo axênico é muito similar com o de um experimento de co-cultivo que o contenha. Embora essas inferências sobre perfil químico e atividade fungicida sejam simples (ou até evidentes), isto nunca havia sido proposto na literatura como uma forma de determinação de antagonismo entre espécies fúngicas e atividade fungicida.

Mediante o resultado de uma série de experimentos que serão discutidos posteriormente temos evidências que suportam essa hipótese.

1.4.2. Desenvolvimento do método

Como descrito no item 1.2.2 da seção experimental, foram realizados sessenta e três experimentos de cultivo fúngico utilizando-se seis fungos diferentes, combinados de todas as formas possíveis (Tabela 1.1). Os espectros de RMN de ^1H dessas amostras foram adquiridos (item 1.2.9) e submetidos a análises quimiométricas (item 1.2.10) a fim de se avaliar os perfis químicos dos experimentos de co-cultivo mais divergentes quando comparados com cada cultura axênica.

O espectro de RMN de ^1H do experimento 63, cultivo simultâneo dos Fungos 1 a 6, é muito similar ao espectro do cultivo axênico do Fungo 1 (Figura 1.3). De fato, a PCA (Figura 1.4) obtida dos dados de RMN de ^1H desses cultivos fúngicos mostra que os perfis químicos do cultivo axênico do Fungo 1 e do experimento 63 convergem. Então, de acordo com as suposições previamente discutidas, o Fungo 1 deve ser a espécie que exerce maior antagonismo sobre as outras (é o antagonista na coleção composta pelos seis fungos estudados). Não se deve esperar que este

microrganismo produza em nenhum experimento de co-cultivo substâncias lesivas a ele mesmo. Deve-se esperar, portanto, que os extratos apresentem atividade fungicida contra os outros cinco microrganismos.

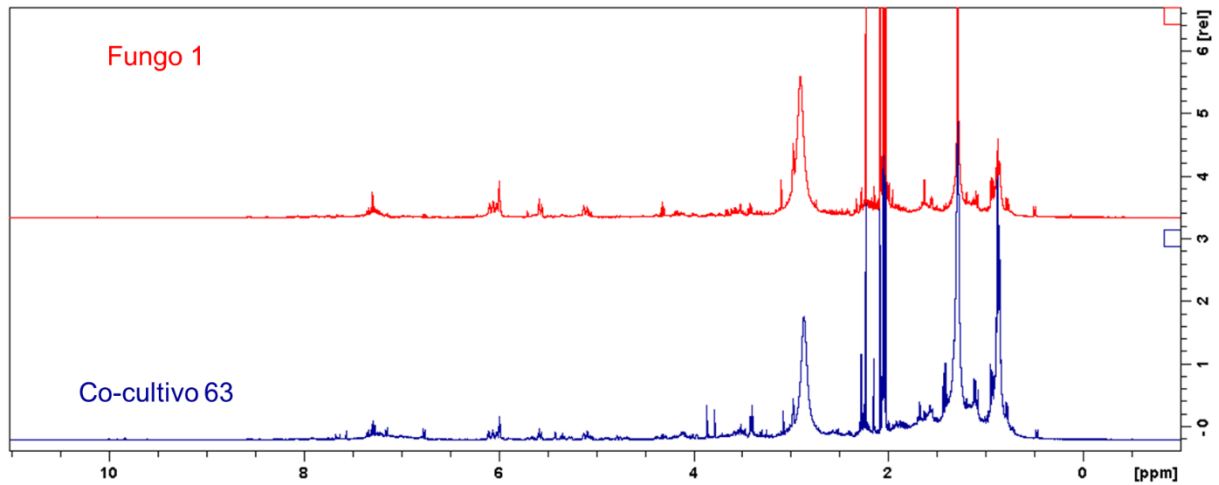


FIGURA 1.3 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do cultivo axênico do Fungo 1 e do experimento de co-cultivo 63.

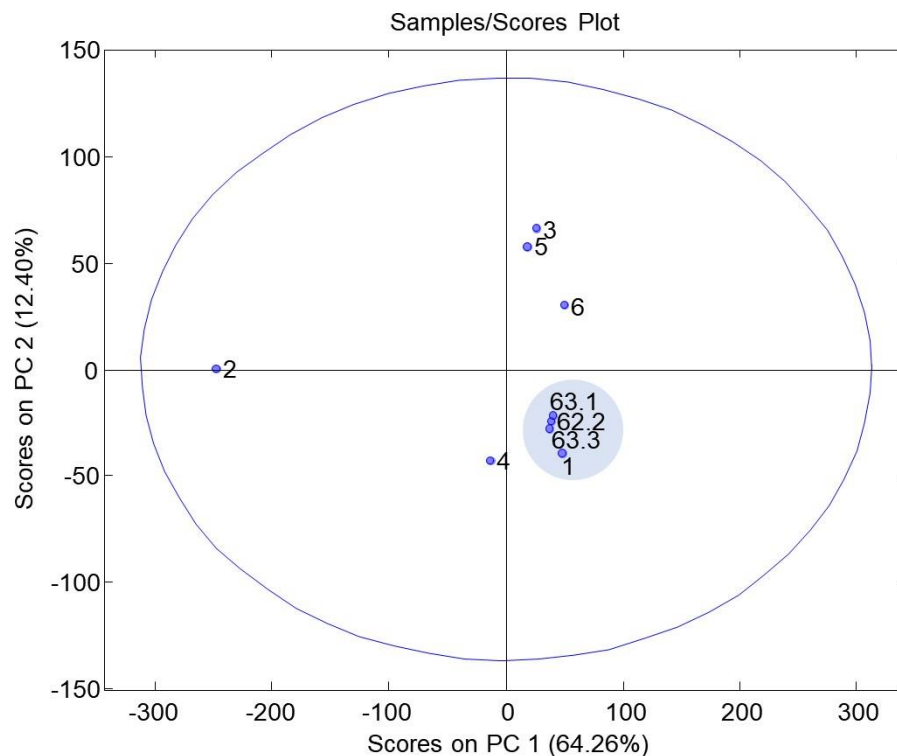


FIGURA 1.4 - PCA do subconjunto preliminar. Os extratos 1 e 63 possuem perfis químicos semelhantes.

Como descrito anteriormente no item 1.2.10, as PCAs foram criadas para cada subconjunto, exceto para o Fungo 1 e suas combinações de co-cultivo uma vez que

ele, supostamente, é responsável pela inibição do crescimento de todos os outros fungos. Aplicando essa estratégia os gráficos de *scores* foram obtidos (Figuras 1.5-1.9).

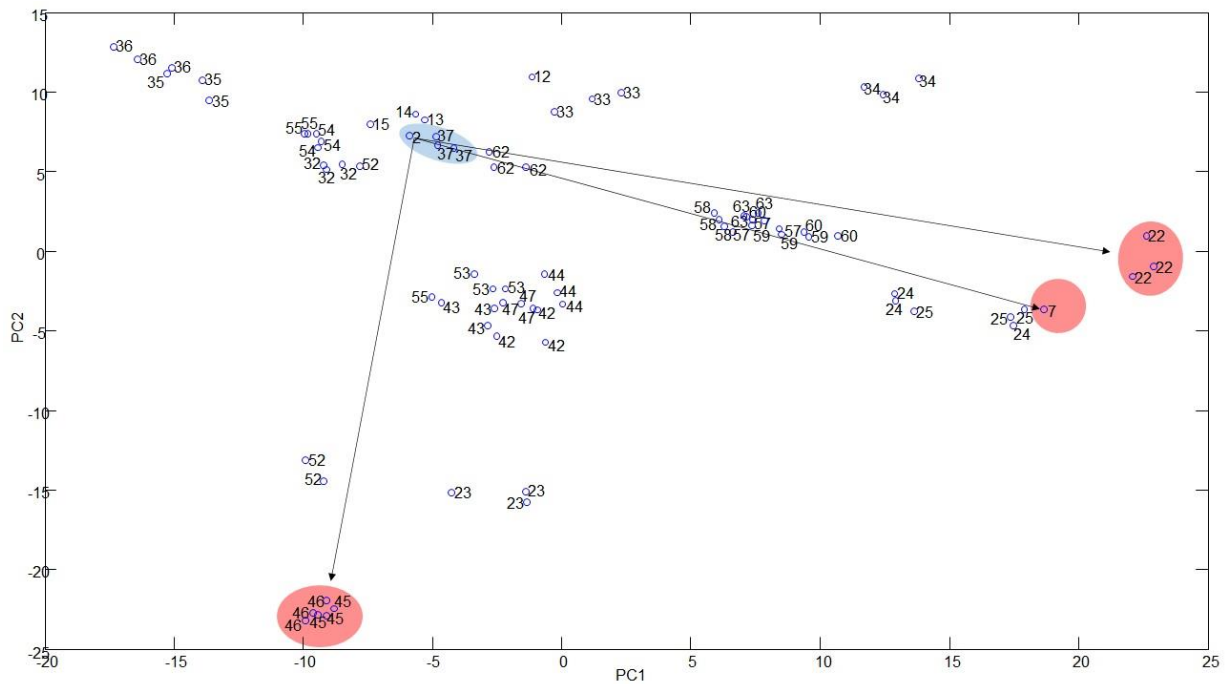


FIGURA 1.5 - PCA do subconjunto do Fungo 2 (*Pestalotiopsis diospyri*). Amostras 7, 22 e 45 possuem atividade antifúngica contra o fungo 2.

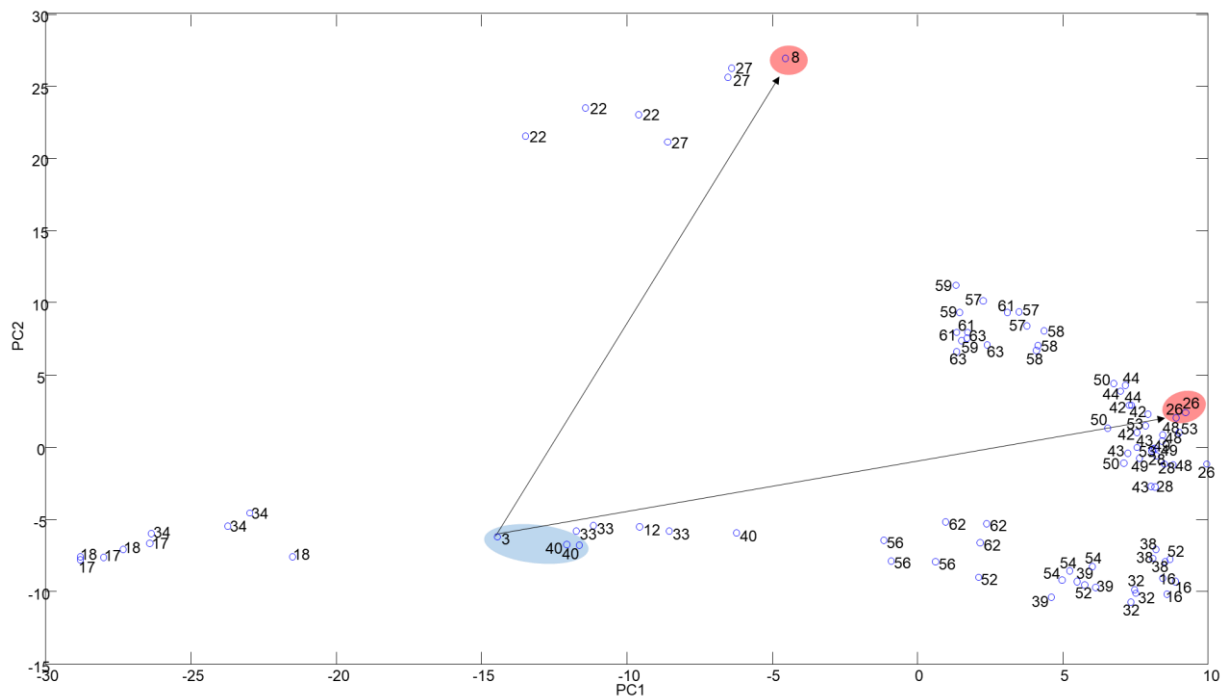


FIGURA 1.6 - PCA do subconjunto do Fungo 3 (*Phoma caricae-papayae*). Amostras 8 e 26 possuem atividade antifúngica contra o fungo 3.

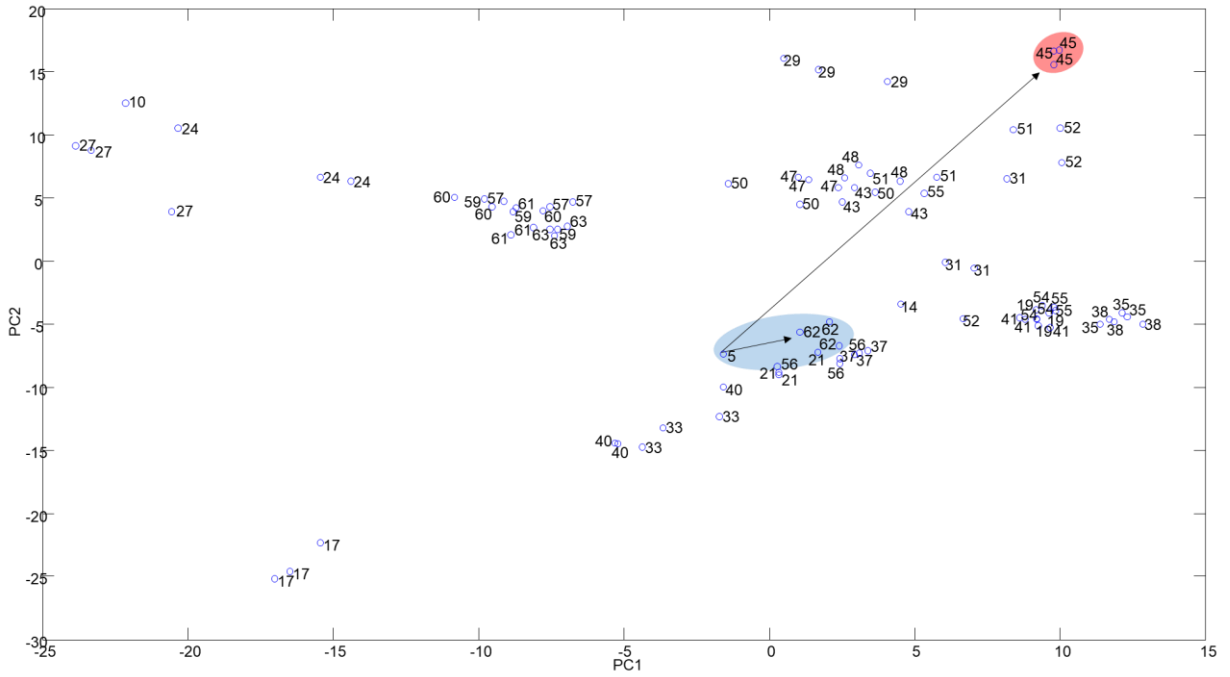


FIGURA 1.7 - PCA do subconjunto do Fungo 5 (*Phytophthora palmivora*). Amostra 45 possui atividade antifúngica contra o fungo 5.

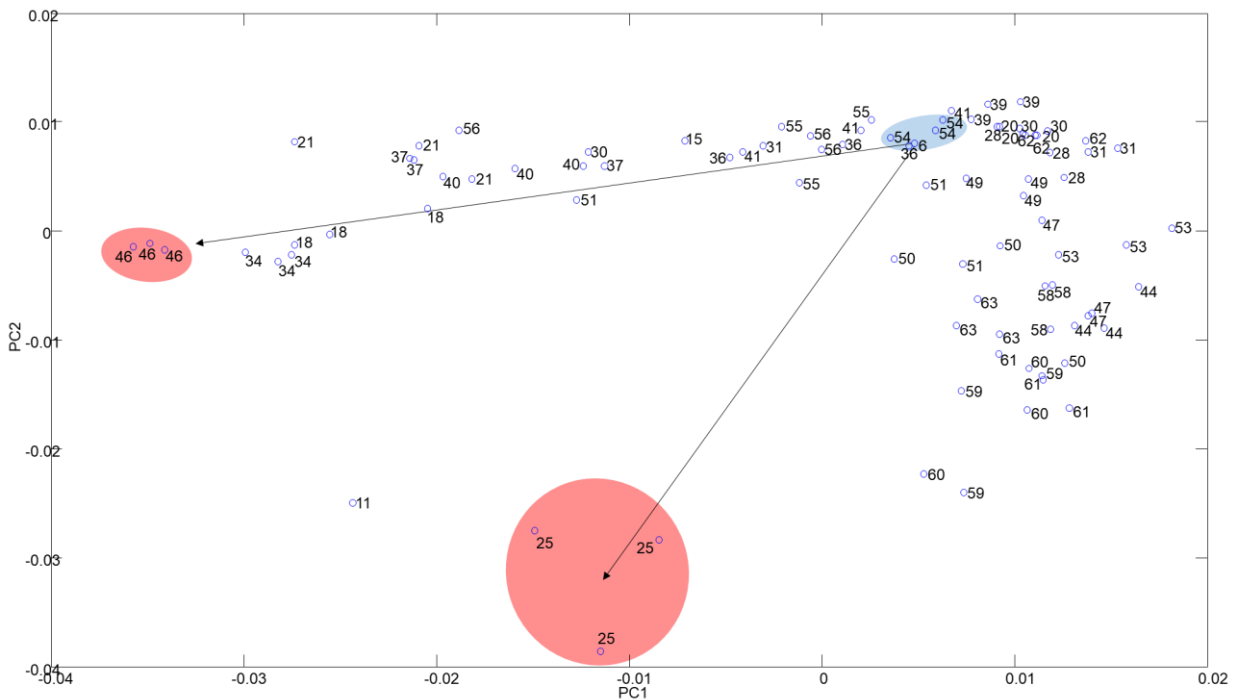


FIGURA 1.8 - PCA do subconjunto do Fungo 6 (*Colletotrichum gloeosporioides*). Amostras 25 e 46 apresentam atividade antifúngica contra o fungo 6.

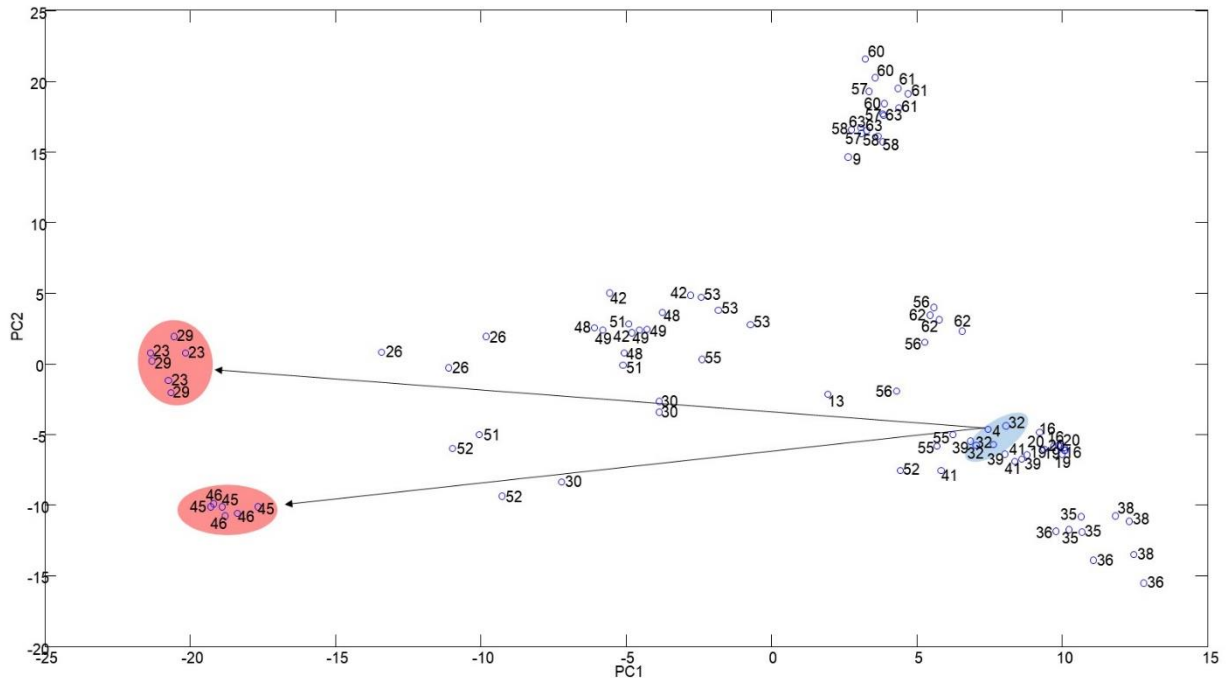


FIGURA 1.9 - PCA do subconjunto do Fungo 4 (*Colletotrichum horii*).

Os gráficos de *scores* das PCAs (Figuras 1.5-1.9) indicam a similaridade entre os perfis químicos dos extratos analisados por RMN de ^1H . Em cada PCA, maior e menor atividade fungicida contra um certo fungo foram atribuídas para as amostras mais distantes e mais próximas, respectivamente, do ponto que representa o cultivo axênico desse fungo. Para cada amostra selecionada de acordo com essas interpretações das PCAs foram realizados ensaios antifúngicos para confirmar tais suposições acerca das suas atividades biológicas. Os resultados foram descritos na seção 1.4.3 (Avaliação *in vitro* dos extratos selecionados a partir da PCA).

Para o subconjunto do Fungo 2 e suas combinações de co-cultivo (Figura 1.5), o gráfico de *scores* indicou que os extratos 7, 22 e 45 são aqueles que, provavelmente, possuem maior atividade antifúngica contra o Fungo 2 uma vez que esses extratos estão mais distantes do ponto que representa o cultivo axênico desse fungo. Por outro lado, a amostra 37 deve ser um dos extratos com menor atividade antifúngica porque está muito próxima do ponto que representa o cultivo axênico do Fungo 2. É importante ressaltar que esses resultados precisam ser avaliados (Figuras A.1-A.15), ou seja, os perfis químicos dos extratos 7, 22 e 45 precisam ser comparados com o perfil químico do cultivo axênico do Fungo 2 pela análise dos seus espectros de RMN de ^1H para comprovação da ausência de similaridade. De fato, o espectro de RMN de ^1H do extrato 37 é muito semelhante ao do cultivo axênico do

Fungo 2 (Figura A.1). Já os perfis químicos dos extratos 7, 22 e 45 são muito diferentes do perfil químico do extrato 2 (Figuras A.2-A.4).

A PCA do subconjunto que inclui o Fungo 3 e todas as suas combinações de co-cultivo (Figura 1.6) indicou que o perfil químico do extrato 40 era o mais similar (Figura A.5) e os perfis dos extratos 8 e 26 (Figuras A.6 e A.7) os mais diferentes do perfil químico do cultivo axênico do Fungo 3, indicando que essas amostras devem ter ação antifúngica contra o Fungo 3 enquanto que a amostra 40 deve ser inativa.

A partir da análise da PCA do subconjunto do Fungo 5 e suas combinações de co-cultivo (Figura 1.7) as amostras 62 e 45 foram escolhidas uma vez que os seus perfis químicos são os mais convergentes (Figura A.8) e divergentes (Figura A.9), respectivamente, comparados ao perfil químico do cultivo axênico do Fungo 5. Desta forma, espera-se que a amostra 62 não seja bioativa enquanto que o extrato 45 tenha atividade antifúngica contra o Fungo 5.

O gráfico de scores para o subconjunto do Fungo 6 e todos os seus co-cultivos (Figura 1.8) mostrou que o extrato 54, cujo perfil químico é muito similar ao perfil químico do cultivo axênico do Fungo 6 (Figura A.10), provavelmente é inativo contra essa espécie. Já os extratos 25 e 46 devem apresentar atividade antifúngica por serem as amostras mais divergentes (Figuras A.11 e A.12) em relação ao ponto que representa o cultivo axênico do Fungo 6.

Para o Fungo 4, a PCA (Figura 1.9) indicou que o extrato 32 (Figura A.13) deveria ser inativo e os extratos 29 e 45 (Figuras A.14 e A.15) deveriam possuir atividade antifúngica. Contudo, os bioensaios realizados (seção 1.4.3) não confirmaram essas suposições. A cultura axênica do Fungo 4 produziu, essencialmente, o ácido indolacético. Este ácido é uma auxirina (hormônio de crescimento que promove o alongamento celular diferencial e funciona como regulador do crescimento dos vegetais) que pode ser produzida por plantas ou certos microrganismos (KHAMNA et al. 2009; PRUSTY et al. 2004) ou que pode ser reconhecida por certos fungos como um sinal para o início de mudanças morfogênicas que levam à infecção da planta. Essa substância inibiu, em altas concentrações, o crescimento de *Saccharomyces* e outros fungos levando os pesquisadores a acreditar que certos patógenos oportunistas usam o próprio sistema de defesa da planta para atacá-la (PRUSTY et al. 2004).

Na Figura 1.10, o espectro em vermelho é do cultivo axênico do Fungo 4. O espectro em azul é do ácido indolacético, substância majoritária produzida pelo Fungo 4 e isolada do seu cultivo axênico (item 1.2.11). Vários experimentos de co-cultivo realizados com o Fungo 4 sugerem que, na presença de outros fungos, este microrganismo usa rotas metabólicas não expressas em condições axênicas de cultivo e a produção de ácido indolacético é praticamente silenciada. A questão é que o extrato do cultivo axênico do Fungo 4 não deve ser usado como referência porque o seu perfil químico é extremamente simples e não reflete nem de longe o potencial de produção metabólica deste fungo. Diante disto, pode-se até inferir que a grande agressividade desse patógeno pode estar na sua versatilidade em “enganar” seu hospedeiro (caquizeiro), fornecendo inicialmente o hormônio de crescimento benéfico para o crescimento da planta e, então, expressando rotas metabólicas diferentes e prejudiciais causando a lesão e, conseqüentemente, a infestação da planta.

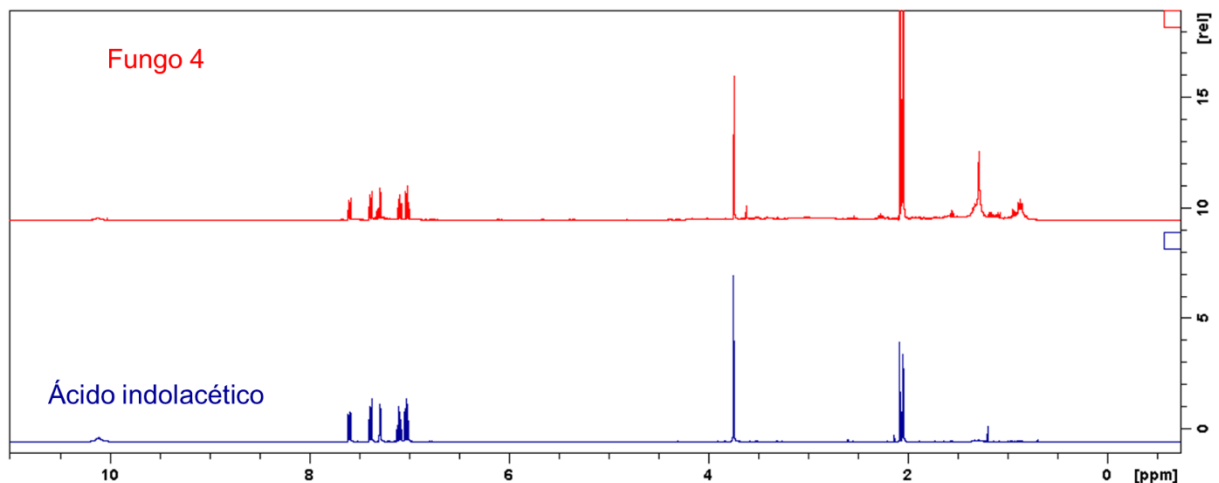


FIGURA 1.10 - Comparação entre a produção metabólica do Fungo 4 e do ácido indolacético (RMN de ^1H em acetona- d_6).

1.4.3. Ensaio *in vitro* dos extratos selecionados a partir das PCAs

Como descrito na seção experimental (item 1.2), os extratos foram avaliados por dois ensaios fungicidas a fim de se confirmar a hipótese de que os espectros de RMN de ^1H e a PCA poderiam ser usados na predição da atividade fungicida dos extratos obtidos por co-cultivo.

As amostras 7, 45 e 37 foram ensaiadas contra o Fungo 2 em testes de difusão em ágar (item 1.2.7). Esperava-se que as amostras 7 e 45 apresentassem alguma atividade antifúngica. Os ensaios mostraram que, de fato, essas amostras inibem o crescimento do Fungo 2 (Figura 1.11). Já em relação à amostra 37 esperava-se que ela não fosse bioativa e, neste caso, o modelo também fez a predição correta (Figura 1.11). O extrato 45 mostrou-se mais ativo contra o Fungo 2 que o extrato 7 sendo, por isto, escolhido para o ensaio de incorporação em ágar (Fig.1.12). De fato, esse ensaio mostrou que o extrato 45 possui forte atividade fungicida contra o Fungo 2, inibindo consideravelmente o seu crescimento.

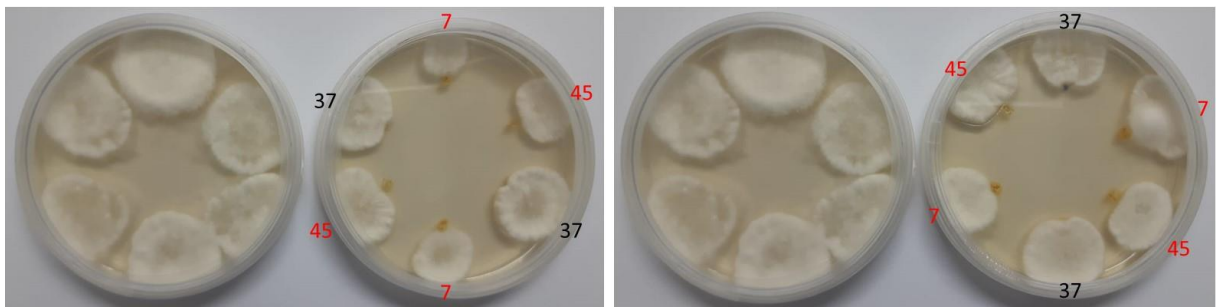


FIGURA 1.11 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 7, 45 e 37 contra o Fungo 2. À esquerda, solvente foi usado como controle.

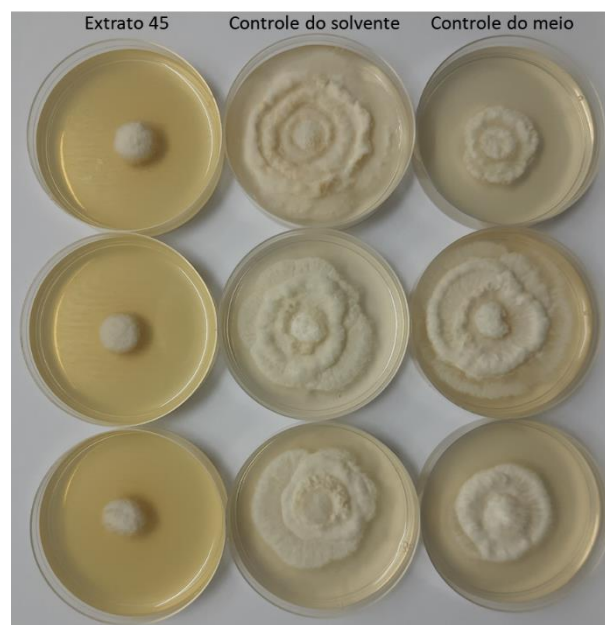


FIGURA 1.12 - Incorporação do extrato 45 em meio PDA contra o Fungo 2.

Os extratos 8, 26 e 40 foram testados contra o Fungo 3 em testes de difusão em ágar. Como previsto, os ensaios indicaram que as amostras 8 e 26

apresentaram atividade fungicida enquanto a amostra 40 mostrou-se inativa (Figura 1.13). A amostra 26 mostrou-se mais ativa que a amostra 8 e por isso foi incorporada ao meio de cultivo. Esse ensaio indicou que o crescimento do Fungo 3 foi fortemente inibido pelo extrato 26 (Figura 1.14).

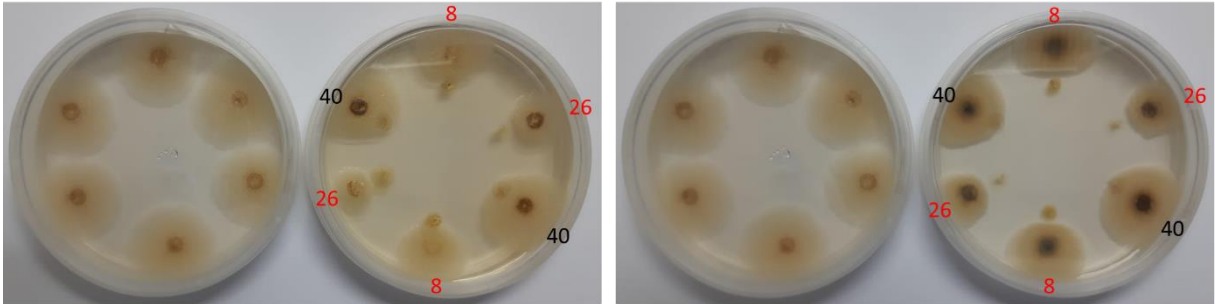


FIGURA 1.13 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 8, 26 e 40 contra o Fungo 3. À esquerda, solvente foi usado como controle.

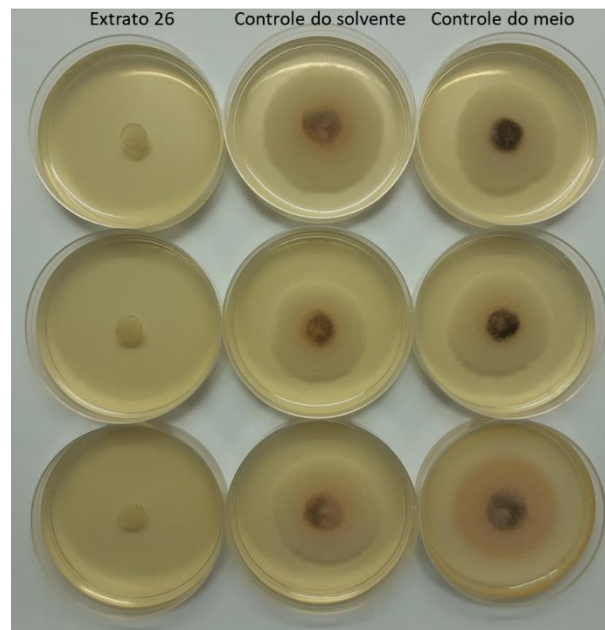


FIGURA 1.14 - Incorporação do extrato 26 em meio PDA contra o Fungo 3.

Não foi possível realizar os testes de difusão em ágar devido à dificuldade de obtenção de uma suspensão de micélio do Fungo 5. Por esta razão, os extratos 45 e 62 foram incorporados diretamente no meio de cultivo. O modelo previu corretamente que a amostra 45 teria atividade fungicida contra o Fungo 5 e que a amostra 62 seria inativa contra esse fungo (Figura 1.15).

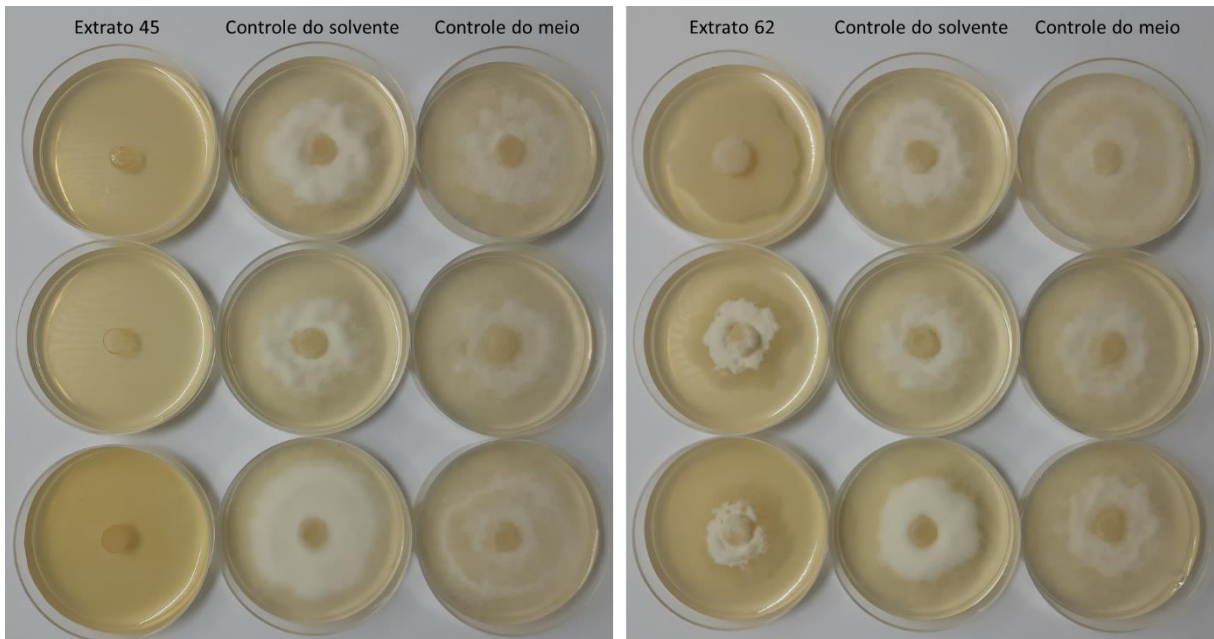


FIGURA 1.15 - Incorporação dos extratos 45 e 62 em meio PDA contra o Fungo 5.

As amostras 25, 46 e 54 foram ensaiadas contra o Fungo 6 no teste de difusão em ágar (Figura 1.16). Esperava-se que as amostras 25 e 46 fossem bioativas e a amostra 54 inativa. Novamente, o modelo fez a predição correta. Os ensaios evidenciaram que o extrato 46 inibiu fortemente o crescimento do Fungo 6 e essa constatação foi melhor observada no teste de incorporação em ágar utilizando esse extrato (Figura 1.17).

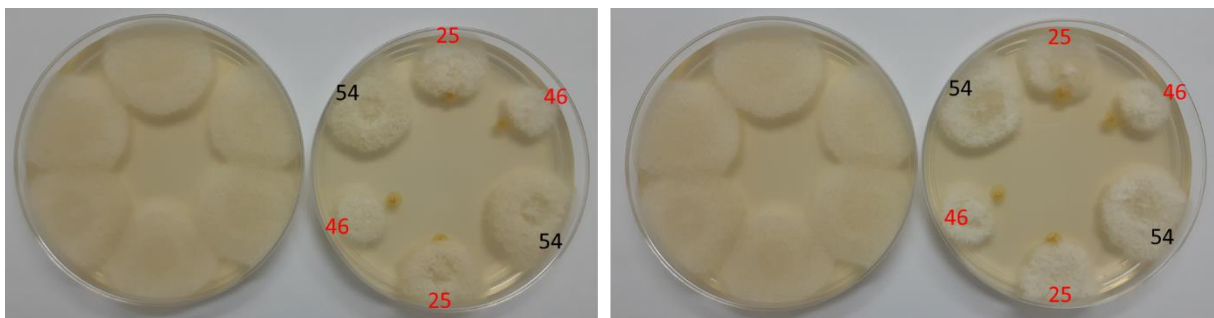


FIGURA 1.16 - Ensaio de difusão em ágar dos extratos 25, 46 e 54 contra o Fungo 6. À esquerda, solvente foi usado como controle.

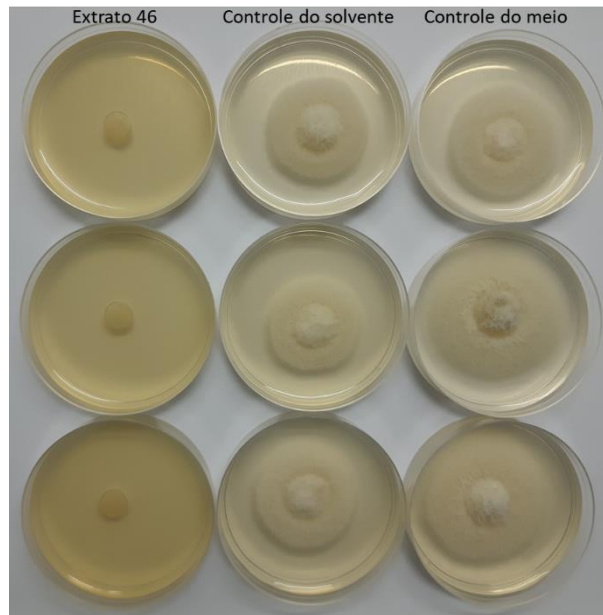


FIGURA 1.17 - Incorporação do extrato 46 em meio PDA contra o Fungo 6.

Desta forma, com o novo método proposto para determinar atividade fungicida utilizando experimentos de co-cultivo bem como espectroscopia de RMN de ^1H associada à PCA, foi possível prever a bioatividade de sete diferentes extratos contra quatro diferentes fungos, confirmando que este método é uma ferramenta extremamente útil na busca de novas substâncias fungicidas utilizando-se uma abordagem rápida e holística. É importante mencionar que todas as amostras bioativas eram co-cultivos que continham o Fungo 1, reafirmando a hipótese de que essa espécie predomina sobre as demais.

1.4.4. Considerações sobre o método desenvolvido

O método desenvolvido é um modelo simples que prediz, a partir das análises dos perfis químicos de experimentos de co-cultivo e seus cultivos axênicos, quanto uma espécie fúngica é prejudicial às demais dentro de uma coleção. A ideia central que sustenta o modelo é que se uma espécie fúngica predomina sobre as demais haverá convergência entre o perfil químico do experimento de co-cultivo e o perfil químico do cultivo axênico dessa espécie e quanto maior essa convergência maior é o potencial antagônico desse microrganismo sobre os demais. Assim, essa hipótese é sobre convergência, divergência e probabilidade: quanto maior a divergência entre o perfil químico de um experimento de co-cultivo e o perfil químico do cultivo axênico de uma espécie fúngica que compõe esse co-cultivo maior a

probabilidade dessa amostra, proveniente do experimento de co-cultivo, possuir atividade fungicida contra a referida cultura axênica.

Stephen Hawking, no seu livro “A Brief History of Time” (HAWKING, 2005), considera que um bom modelo é aquele que possui poucos elementos arbitrários, poucas condições de contorno e excelente capacidade preditiva. Neste caso, consideramos que o método apresentado é um bom modelo uma vez que a única condição de contorno imposta é que os microrganismos tenham, aproximadamente, a mesma cinética de crescimento e que sejam inoculados simultaneamente. Em relação à capacidade preditiva, esta talvez seja o seu maior trunfo, uma vez que o modelo previu corretamente sete amostras bioativas contra quatro fungos de gêneros diferentes. Em termos probabilísticos, a chance de se escolher, ao acaso, quatro amostras bioativas em uma coleção com 63 contra 4 fungos diferentes é extremamente baixa.

A aplicação deste método é feita, portanto, seguindo esses 4 passos:

- 1) Fazer os cultivos axênicos e os co-cultivos, em meio líquido, de todas as combinações possíveis sob as mesmas condições;
- 2) Obter os extratos de (1) através de procedimento de extração líquido-líquido e seus espectros de RMN de ^1H ;
- 3) Criar subconjuntos que contenham os perfis químicos de um cultivo axênico e todas as suas combinações de co-cultivo;
- 4) Realizar as PCAs com os dados de espectros de RMN de ^1H de cada subconjunto a fim de encontrar o extrato mais ativo (o extrato mais distante da cultura axênica no gráfico de PCA) dentro de cada subconjunto.

Finalmente, é importante mencionar que a ideia central desse trabalho pode ser estendida na busca de outros compostos antimicrobianos além de antifúngicos, tal como em investigações utilizando-se bactérias.

1.4.5. Conclusão

Este trabalho propõe a realização de experimentos de co-cultivo, a aquisição dos seus perfis químicos por uma técnica analítica e o uso de quimiometria para auxiliar na predição do antagonismo entre espécies fúngicas e, principalmente, da atividade antifúngica sem a necessidade da condução de ensaios antifúngicos tradicionais *in vitro*. Para uma coleção de 63 extratos provenientes de 6 fungos foi possível prever e confirmar que sete extratos foram ativos contra quatro fungos de diferentes gêneros, evidenciando que a capacidade preditiva do método desenvolvido é alta, o que faz desses resultados uma estratégia importante na busca por novos agentes antifúngicos, uma vez que representam uma alternativa rápida e prática em relação aos testes de triagem antifúngica tradicionais.

Os resultados dessa pesquisa foram publicados no artigo “A new approach for identifying antagonism among fungi species and antifungal activity”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 179, p. 112960, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112960>.

Capítulo 2

2. Co-cultivo fúngico em placa de Petri: estudo da fração volátil

2.1. Introdução

Antracnose é uma doença fúngica, cujos sintomas são o desenvolvimento de lesões necróticas escuras e profundas nas folhas, flores e frutos, bem como apodrecimento da raiz e do caule (SHARMA e KULSHRESTHA, 2015). Várias culturas são suscetíveis a antracnose (SARKAR, 2016), incluindo grãos e leguminosas. É considerada uma das doenças de frutas tropicais e subtropicais mais prejudiciais economicamente devido a sua variabilidade fitopatogênica (BORDOH et al., 2020; CANNON et al., 2012), infectando maçã, abacate, banana, mirtilo, caju, citrus, café, pitáia, uva, goiaba, manga, mamão, maracujá, pêsego, abacaxi, romã, morando e vários tipos de vegetais (BORDOH et al., 2020; SARKAR, 2016). Antracnose é diferente de outras doenças fitopatogênicas porque pode ocorrer de maneira muito agressiva mesmo após a colheita (KUMAR et al., 2020; MADANI et al., 2014), resultando em perdas significantes na produção e na economia (DAMASCENO et al., 2019).

Vários gêneros de fungos são capazes de causar antracnose, incluindo *Apiognomonina* sp (BORÓN et al., 2019), *Diplocarpon* sp (NEU et al., 2019), *Elsinoë* sp (SANTOS et al., 2018), *Kabatiella* sp (GUERRET et al., 2016), *Ophiognomonina* (MOORE et al., 2015) e, notavelmente, espécies de *Colletotrichum* (DE SILVA et al., 2017; JOSHI, 2018; SARKAR, 2016).

Colletotrichum foi considerado o oitavo grupo de fungo fitopatogênico mais importante no mundo (DEAN et al., 2012), sendo capaz de atacar mais de 3200 espécies de mono e dicotiledôneas (O'CONNEL et al., 2012) que incluem muitas culturas de cereais, frutas, vegetais, plantas ornamentais e medicinais (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2010). O gênero *Colletotrichum* pode exceder mais de 100 espécies (HYDE et al., 2009) que estão organizadas em complexos (DE SILVA et al., 2017) destacando-se, entre os mais prejudiciais, *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. gigasporum*, *C. orbiculare*, *C. siamense*, *C. destructivum* e *C. gloeosporioides* (DAMM et al., 2014; DAMM et al. 2013; DAMM et al. 2012a; DAMM et al. 2012b; LIU et al., 2014; SHARMA et al. 2015; WEIR et al., 2012).

C. gloeosporioides é um complexo de fungos que contém 22 espécies (DAMM et al., 2012a; WEIR et al., 2012) sendo o principal patógeno de planta e um dos fitopatógenos mais estudados no mundo (RABARI et al., 2018), infectando aproximadamente 470 gêneros diferentes de mono e dicotiledôneas hospedeiras (SHARMA e KULSHRESTHA, 2015). Virtualmente, todas as culturas economicamente importantes são suscetíveis a uma ou mais espécies deste complexo de fungos (JOSHI, 2018) que é o mais comum e mais distribuído no mundo (CANNON et al., 2012). Antracnose causada por essa espécie de fungo pode afetar uma variedade de frutas: maçã, café-arábica, abacate, banana, caju, citrus, pitaia, uva, manga, mamão, maracujá, pimenta, caqui, morango e noz (SHARMA e KULSHRESTHA, 2015).

Em culturas de mamão, perdas na produção podem alcançar 50% (ZAHID et al., 2012). Em relação aos danos causados ao mamão, o complexo fúngico composto por *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, *C. gloeosporioides* e *Phoma caricae-papayae* (DE LIMA et al., 2009; GALSUCKER et al., 2018; NERY-SILVA et al., 2007) é responsável pela podridão preta, a principal doença pós colheita que causa enormes perdas comerciais (TERAO et al., 2019). Entre os fitopatógenos relacionados a esta doença, *C. gloeosporioides* aparentemente tem a mais alta incidência seguida por *Phoma caricae-papayae* (NERY-SILVA et al., 2007).

C. horii é um importante patógeno dentro do complexo *C. gloeosporioides* (WEIR et al., 2010). Culturas de caqui são severamente atacadas por esse fitopatógeno (XIE et al., 2010) causando imensas perdas pré e pós colheita (KWON et al., 2013). Por isto, *C. horii* é o principal problema na indústria do caqui no Japão, Coreia do Sul e China, principais líderes mundiais na produção deste fruto (ZHANG et al., 2008). Na Coreia do Sul, antracnose em pomares de caqui doce resultou em perdas 46,25 % nos frutos doentes (KWON et al., 2013). No Brasil houve relatos de perdas de produtividade ao redor de 80% em algumas regiões, enquanto produtores do estado do Paraná registraram perda total das suas plantações (BLOOD et al., 2015).

Aplicação de pesticidas sintéticos, cultivo de variedades resistentes e rotação de culturas (MA et al., 2015) são estratégias comumente usadas no controle de doenças fúngicas em colheitas. A prática de controle mais amplamente utilizada ainda é o uso de pesticidas (GAO et al., 2017), que pode resultar em sérios problemas ambientais tais como salinização do solo, alterações na biodiversidade da microbiota

do solo, resistência pelo fitopatógeno, poluição ambiental, entre outros problemas (MOEBIUS-CLUNE et al., 2011; SINGH et al., 2011). Desta forma, o controle biológico de doenças fúngicas tem se tornado uma excelente alternativa, uma vez que os danos ambientais podem ser minimizados (ou mesmo suprimidos) e a exportação de frutos sem resíduos de fungicidas é facilitada pelas agências reguladoras (HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015) porque há um aumento na demanda mundial de alimentos livres de pesticidas cuja produção tenha sido ambientalmente pouco agressiva (WANG et al., 2015).

Embora substâncias fungicidas não-voláteis tenham sido extensivamente estudadas, investigações utilizando substâncias orgânica voláteis (VOCs) provenientes do metabolismo secundário fúngico têm sido pouco exploradas (GAO et al., 2017). Substâncias orgânicas voláteis microbianas podem inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (LI et al., 2012; RAZA et al., 2015), induzir o crescimento de plantas (PARK et al., 2015), mediar importantes relações ecológicas tais como interação e comunicação entre microrganismos que compõe a microbiota de uma planta (EFFMERT et al., 2012) bem como induzir sua resistência sistêmica (ZAMIOUDIS et al., 2015).

No intuito de investigar alternativas ambientalmente amigáveis no controle de doenças causadas por antracnose e podridão preta no mamão este trabalho avaliou o perfil químico de substâncias orgânicas voláteis produzidas pelo fungo *F. guttiforme* na presença dos fungos *C. horii*, *C. gloeosporioides* e *P. caricae-papayae* bem como sua relação em um provável mecanismo de ação à longa distância do crescimento micelial desses fungos.

2.2. Experimental

2.2.1. Linhagens fúngicas

Todas as linhagens fúngicas utilizadas (*Fusarium guttiforme*, *Phoma caricae-papayae*, *Colletotrichum horii* e *C. gloeosporioides*) foram obtidas da coleção microbiana do Instituto Biológico do Estado de São Paulo. Essas culturas axênicas foram preservadas seguindo o método de Castellani (CASTELLANI, 1963).

Um inóculo de 5 mm de diâmetro de cada uma das quatro espécies fúngicas foi transferido dos seus respectivos estoques para o centro de uma placa de Petri contendo meio estéril de batata, dextrose e ágar (PDA, Acumedia®, Neogen

Corp., Michigan, USA) autoclavado a 121 °C por 25 minutos. Essas placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C em DBO (Solab SL-200) com fotoperíodos de 12 h. Três transferências sucessivas foram feitas dessas placas e cada novo repique foi incubado nas mesmas condições que o repique anterior para garantir homogeneidade no crescimento micelial do fungo. Desta forma, cada isolado fúngico tinha sete dias de crescimento antes do seu uso em testes de atividade fungicida por substâncias orgânicas voláteis.

2.2.2. Teste de co-cultivo usado na avaliação da atividade fungicida por substâncias orgânicas voláteis

Um experimento de co-cultivo (DENNIS et al., 1971), nomeado “teste de duas bases de placas seladas” (GAO et al., 2017) ou simplesmente teste de confronto, foi usado para avaliar a atividade fungicida de substâncias orgânicas voláteis (VOCs) produzidos pelo *F. guttiforme* na presença dos fungos *P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides*.

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro de cada uma das espécies fúngicas provenientes das placas homogêneas com 7 dias de crescimento (item 2.2.1) foram transferidos para o centro de placas de Petri de vidro (100 mm diâmetro x 17 mm altura, Sigma-Aldrich®) contendo 25 mL de meio de batata, dextrose e ágar (PDA, Acumedia®, Neogen Corp., Michigan, USA) previamente esterilizadas. As placas foram incubadas por 2 dias a 25 °C em DBO com fotoperíodos de 12 h. Passado o tempo de incubação, as bases das placas de Petri contendo o fungo *F. guttiforme* foram reunidas com as bases das placas de Petri que continha cada um dos outros fungos estudados (*P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides*).

Estes sistemas constituídos pelas duas bases das placas de cada um dos fungos foram cuidadosamente selados com Parafilm® M seguida de filme plástico (PVC) em excesso e incubadas por 12 dias a 25 °C em DBO com fotoperíodos de 12 h. Os experimentos foram conduzidos em 6 replicatas. As culturas axênicas de cada um dos fungos foram usadas como experimentos controle e foram obtidas ao mesmo tempo e exatamente sob as mesmas condições dos experimentos de co-cultivo.

2.2.3. Experimento de co-cultivo utilizado na curva diária de produção de substâncias orgânicas voláteis

Este experimento foi conduzido em condições similares ao descrito na subseção 2.2.2, mas com algumas modificações necessárias. As bordas das bases das placas de Petri usadas no crescimento do fungo *F. guttiforme* foram adaptadas com um corte pequeno e estreito suficiente para a introdução de uma agulha de SPME. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Cada replicata foi feita com uma diferença de 1 h 15 min. Os perfis químicos das substâncias orgânicas voláteis produzidas nos experimentos de co-cultivo, nas culturas axênicas (experimentos controle) e no branco do meio de cultivo foram adquiridos por GC-MS em triplicata a cada 24 horas por quatro dias.

2.2.4. Análises das substâncias orgânicas voláteis por SPME e GC-MS

Procedimento de extração por SPME: substâncias orgânicas voláteis foram extraídas utilizando-se fibra de SPME StableFlex™ DVB/CAR/PDMS (2 cm, 50/30 µm) da Supelco (Bellefonte, PA). Antes de cada extração a fibra foi condicionada por 30 min a 250 °C. Depois disto a fibra foi inserida e exposta por 1 h na placa de Petri de vidro adaptada onde cada experimento foi conduzido. Por fim, os analitos adsorvidos na fibra foram termicamente dessorvidos por 5 min a 250 °C no injetor do cromatógrafo a gás.

Condições cromatográficas: análises por GC-MS foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 8010 Plus acoplado com coluna cromatográfica capilar Rtx-5MS MS (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm, Restek) e *liner* específico para SPME (Shimadzu 17A com injetor SPL-17; 95 mm × 5.0 mm × 0.75 mm), análise manual. Análises foram feitas em modo de injeção *splitless*, utilizando-se hélio como gás carreador a uma vazão de 1,5 mL/min. A temperatura do forno foi mantida, inicialmente, a 50 °C durante 5 min seguida por um aumento de 3 °C/min até a temperatura final de 180 °C, mantida por 10 min.

Condições do detector de massas: um detector Shimadzu GCMS QT8040 foi usado com ionização por elétron, fonte de ionização na temperatura de 250 °C e 70 eV para ionização da amostra. A faixa espectral de identificação de massas foi de 50-500 Da

com uma taxa de aquisição de 0,200 *scan/s*. As análises foram realizadas em modo *full-scan*. Substâncias foram identificadas pela comparação direta com espectros de massas da base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST 11).

2.2.5. Aquisição da área micelial

A área micelial de cada experimento de co-cultivo foi adquirida pela digitalização das placas a 600 dpi de resolução. Depois, cada imagem foi convertida em valores de área usando o software ImageJ, de acordo com o método por ABRÀMOFF et al. (2004).

2.2.6. Análise estatística

Dados do crescimento micelial de cada experimento de co-cultivo (item 2.2.5) foram comparadas com os seus respectivos controle e sujeitos a análise de variância. Diferenças entre experimento e controle foram discriminadas pelo teste de significância honesta de Tukey a 95% de probabilidade.

2.3. Resultados e discussão

Os testes de confronto (item 2.2.2) usados para avaliar a atividade fungicida dos voláteis produzidos por *F. guttiforme* mostraram que os fungos *P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides* tiveram seus crescimentos severamente inibidos na presença dessas substâncias produzidas por este microrganismo (Figuras 2.1-2.3).

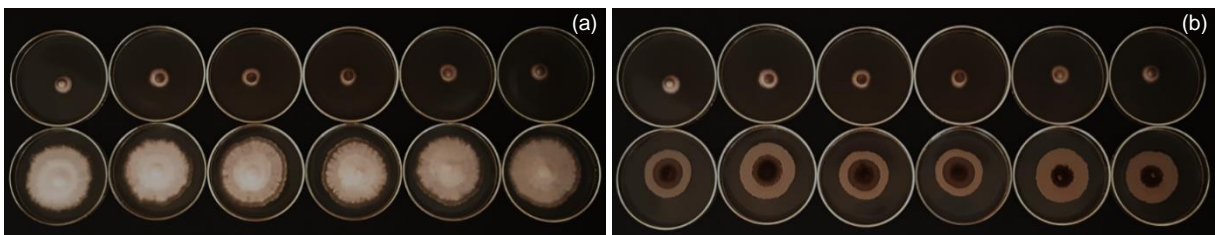


FIGURA 2.1 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre *P. caricae-papayae* (acima) e *F. guttiforme* (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de *P. caricae-papayae* no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.

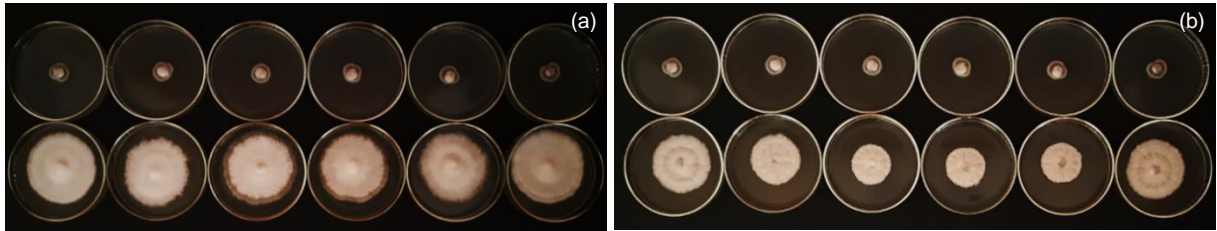


FIGURA 2.2 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre *C. horii* (acima) e *F. guttiforme* (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de *C. horii* no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.

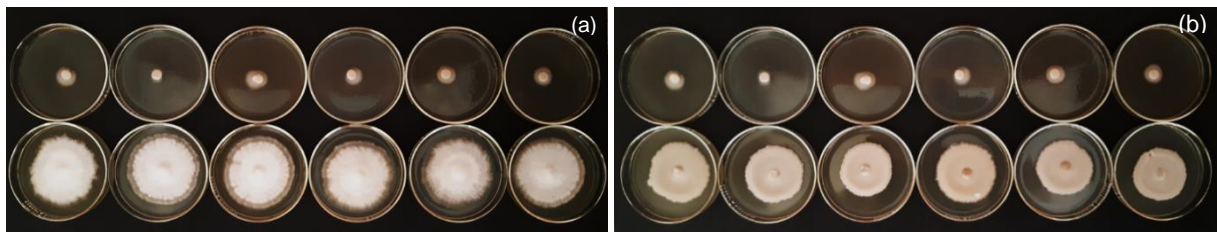


FIGURA 2.3 - (a) Placas de Petri após os experimentos de co-cultivo entre *C. gloeosporioides* (acima) e *F. guttiforme* (abaixo). (b) Comparação entre o crescimento radial de *C. gloeosporioides* no experimento de co-cultivo (acima) e sua cultura axênica (experimento controle, abaixo). Ambos os experimentos, co-cultivo e o cultivo axênico, têm o mesmo tempo, 12 dias.

Medidas da área de crescimento micelial dos cultivos axênicos (controle) e dos co-cultivos após 12 dias de experimento mostraram que houve inibição de 92.5% do *P. caricae-papayae*, 91.7% do *C. Horii* e 93.7% do *C. gloeosporioides* (Figura 2.4). Esses resultados indicam que os voláteis produzidos por *F. guttiforme* afetam diretamente o desenvolvimento dos três fungos estudados. Em contraste, medidas do crescimento micelial do *F. guttiforme* após 12 dias de co-cultivo mostrou que nenhum dos fungos estudados inibiram significativamente o seu crescimento comparado ao seu controle (Figura 2.4). Pode-se inferir que este fungo tem o seu crescimento conservado ao mesmo tempo que produz substâncias orgânicas voláteis capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Essas constatações também permitiram inferir que a relação ecológica existente entre os quatro microrganismos é de predominância do *F. guttiforme* sobre os demais.

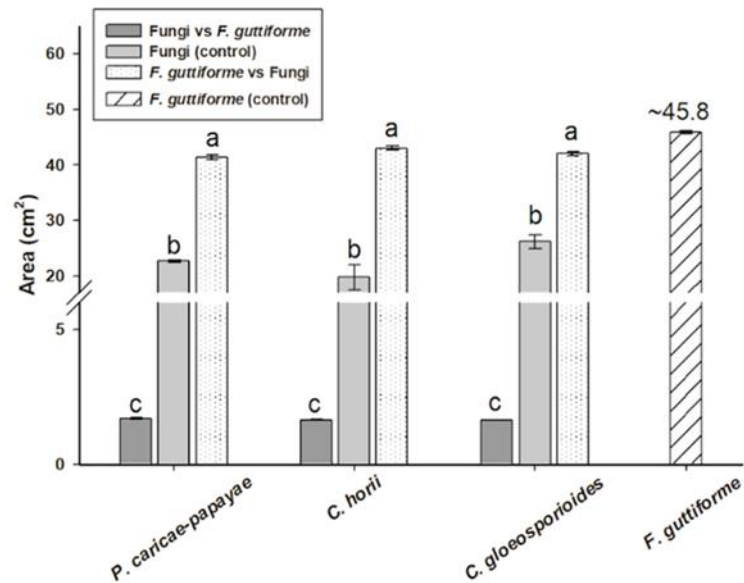


FIGURA 2.4 - Inibição do crescimento dos fitopatógenos *P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides* por voláteis produzidos pelo *F. guttiforme*. Inibição do crescimento é expresso como percentual de inibição comparado com o seu controle. Barras de erro indicam o desvio padrão das seis replicatas.

Os perfis químicos dos voláteis adquiridos a cada 24 h (itens 2.2.3 e 2.2.4), obtidos dos experimentos de co-cultivo (Figuras 2.5-2.7), mostraram picos com tempos de retenção em 53 min e 55 min que apresentaram uma tendência interessante e que pode estar associada à defesa do *F. guttiforme*.

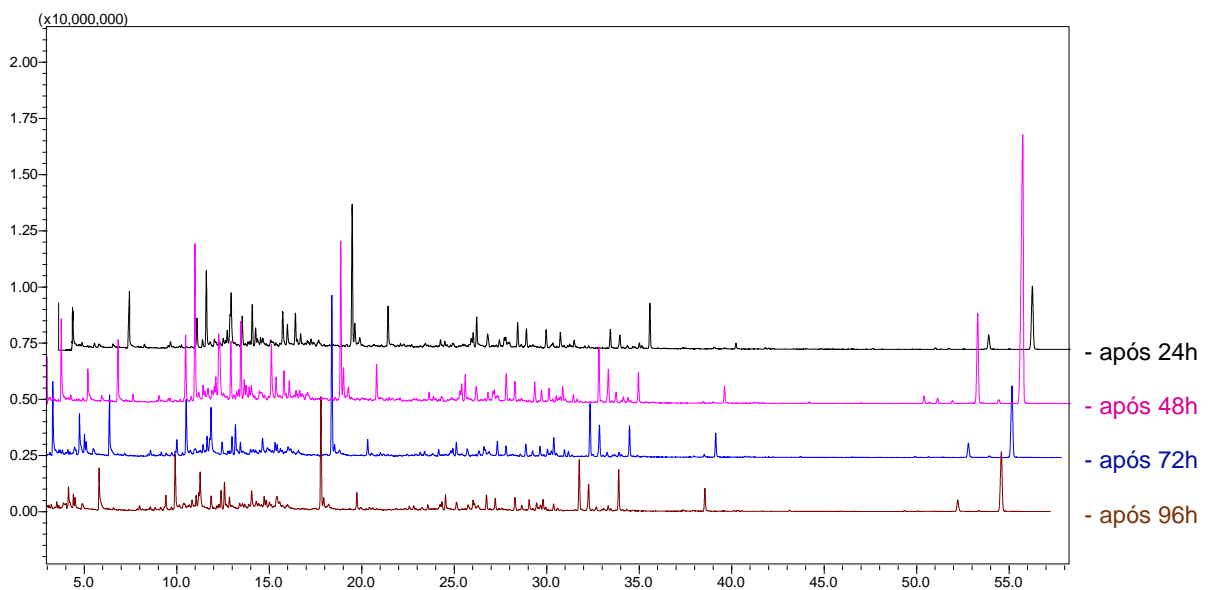


FIGURA 2.5 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre *P. caricae-papayae* e *F. guttiforme*. Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.

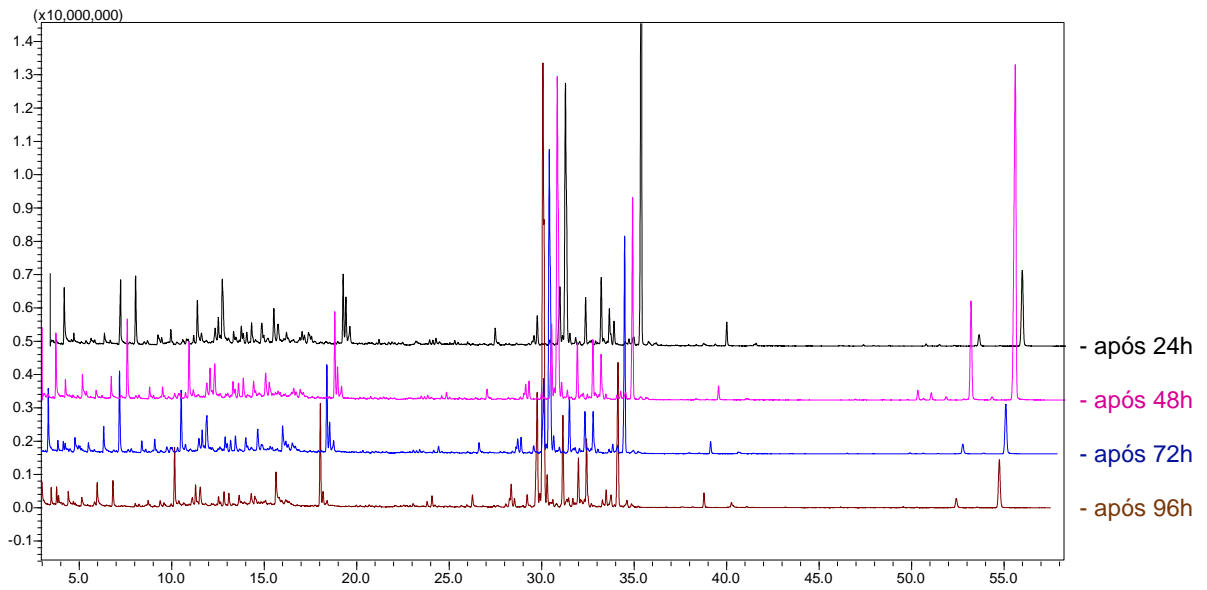


FIGURA 2.6 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre *C. horii* e *F. guttiforme*. Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.

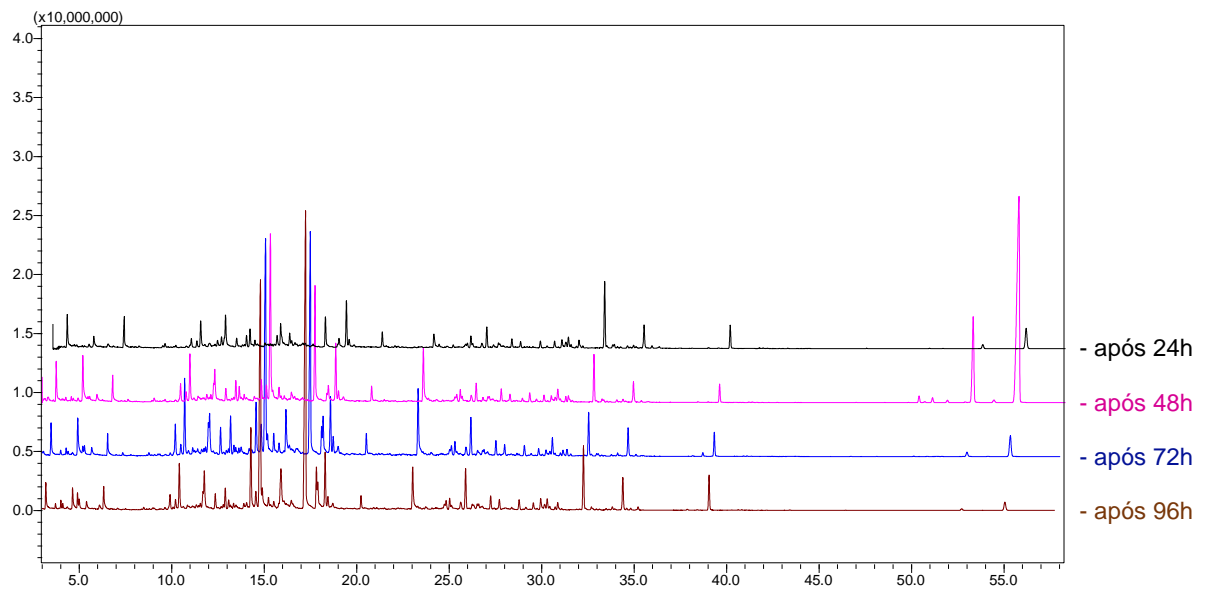


FIGURA 2.7 - Perfis químicos dos voláteis produzidos nos experimentos de co-cultivo entre *C. gloeosporioides* e *F. guttiforme*. Análises foram feitas por GC-MS a cada 24 h durante 4 dias.

Essas substâncias foram identificadas como sendo os diterpenos kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**) (Figura 2.8), respectivamente. Note que nas primeiras 24 h de interação entre os fungos a concentração de ambas as substâncias era baixa. Contudo, passadas 48 h, essas substâncias foram superexpressas atingindo um máximo relativo, decaindo com o tempo, com uma tendência de estabilização a partir de 72 h.

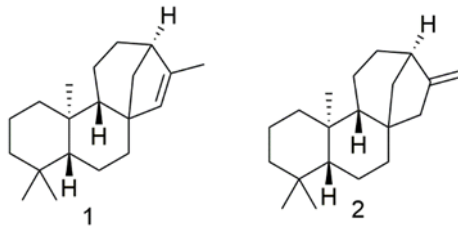
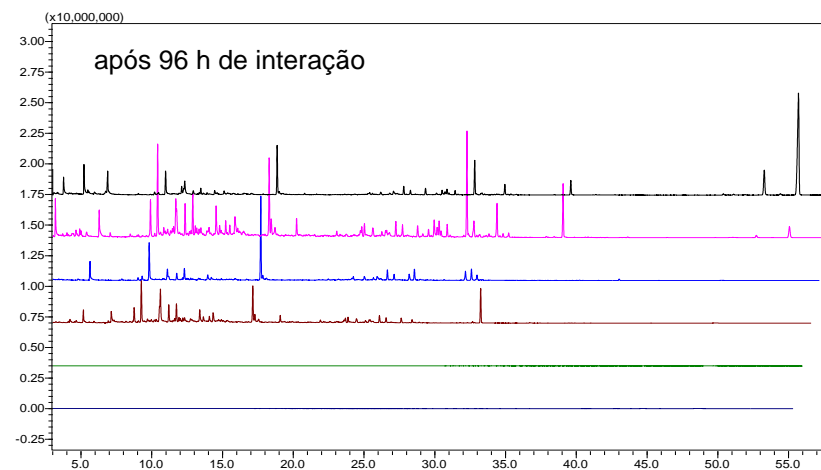
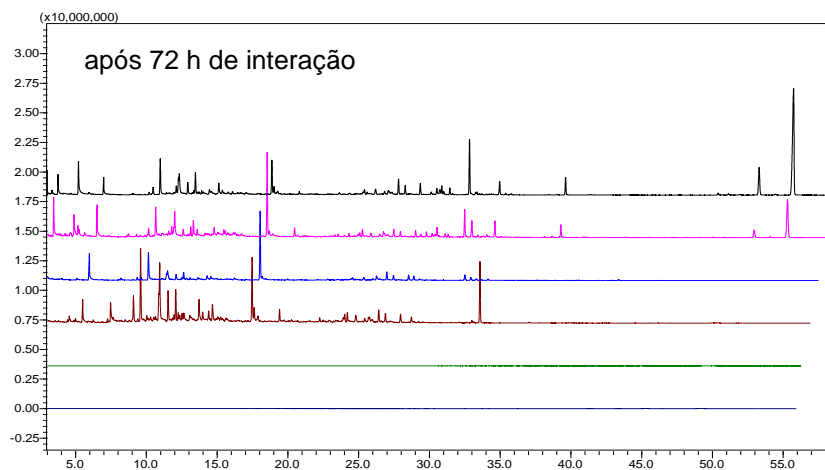
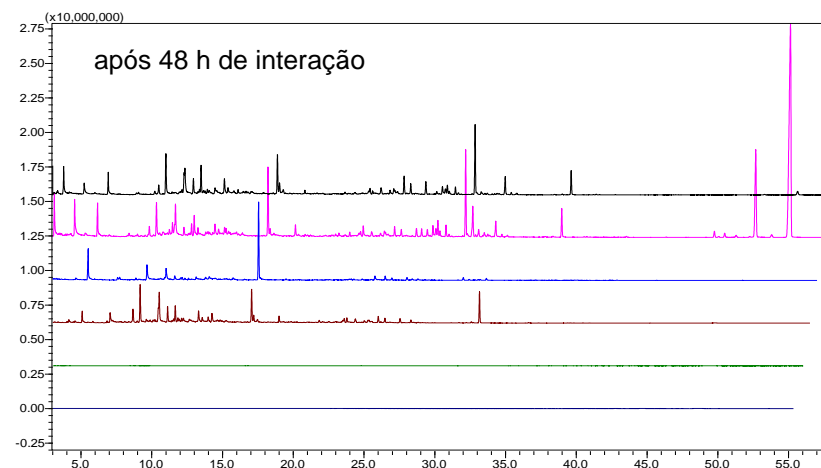
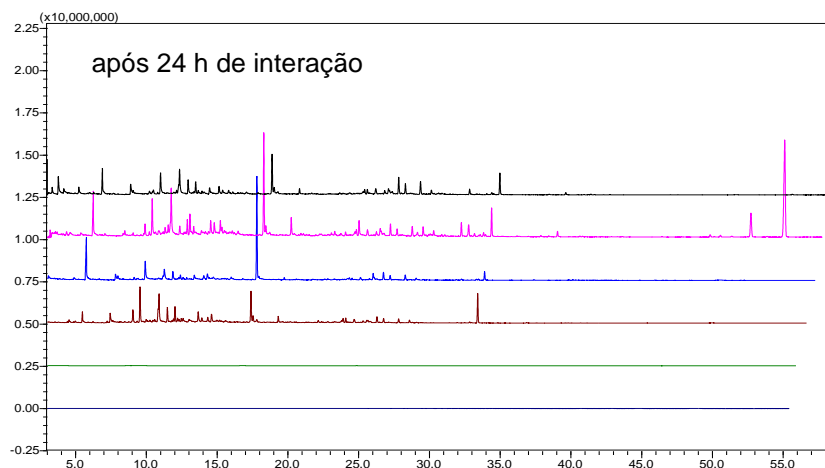


FIGURA 2.8 - Estruturas químicas dos diterpenos kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**).

Essa tendência na produção desses diterpenos produzidos pelo *F. guttiforme* pode estar associado um mecanismo antagonístico de ação direta a longa distância: uma possível defesa em resposta a uma situação hostil. Uma interpretação coerente da distribuição dessas substâncias com o tempo e que explica a inibição dos diferentes fungos seria que, nas primeiras 24 h de experimento de co-cultivo, o fungo *F. guttiforme* identificou a presença dos outros microrganismos, neste caso, *P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides* e, por isto, seu metabolismo superexpressou a produção do kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**) em resposta a presença de uma possível ameaça. A sinalização de inibição do crescimento desses fungos ocorreu nas primeiras 48 h de interação entre os microrganismos. Após 72 h a produção dos diterpenos diminuiu e se estabilizou. Pode-se inferir que, uma vez superada a ameaça, *F. guttiforme* diminuiu a produção das substâncias kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**) direcionando então sua atividade metabólica em função do seu crescimento micelial. Essas inferências são consistentes com os cromatogramas das Figuras 2.9-2.11 que comparam a produção dos voláteis produzidos por cada cultura axênica, o co-cultivo entre elas e o branco do meio de cultivo, confirmando que os diterpenos kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**) foram produzidos pelo *F. guttiforme*.

F. guttiforme produziu os diterpenos em ambos os experimentos, tanto no cultivo axênico quanto nos experimentos de co-cultivo, mas sua produção máxima ocorreu em tempo mais curto no experimento de co-cultivo em comparação com o

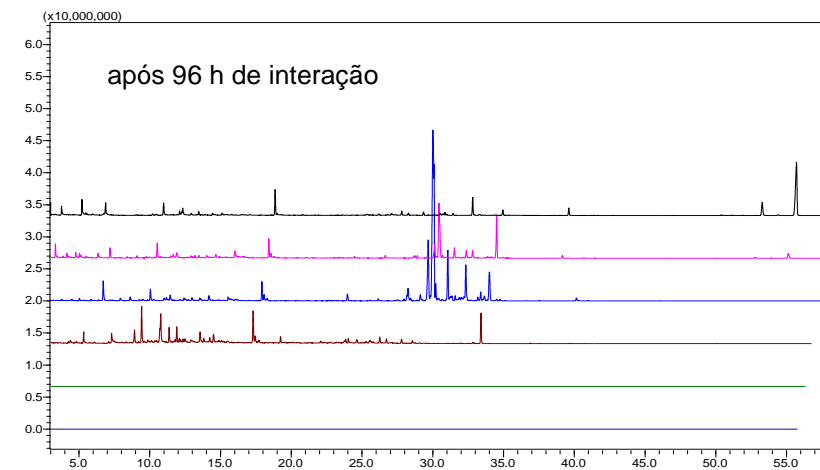
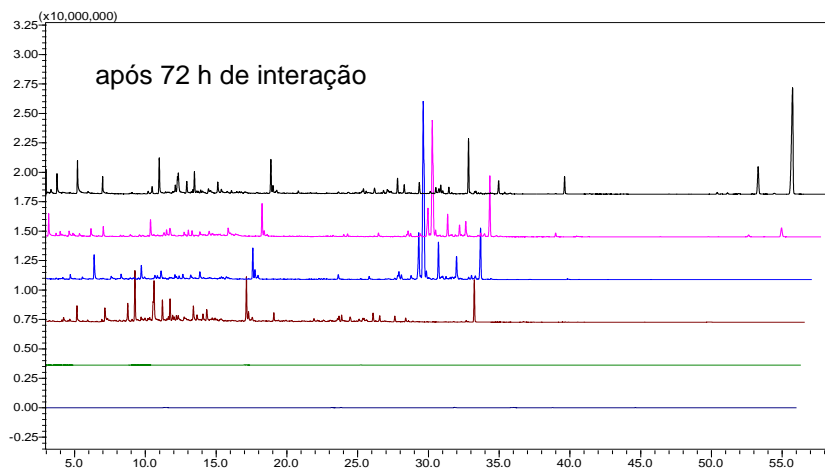
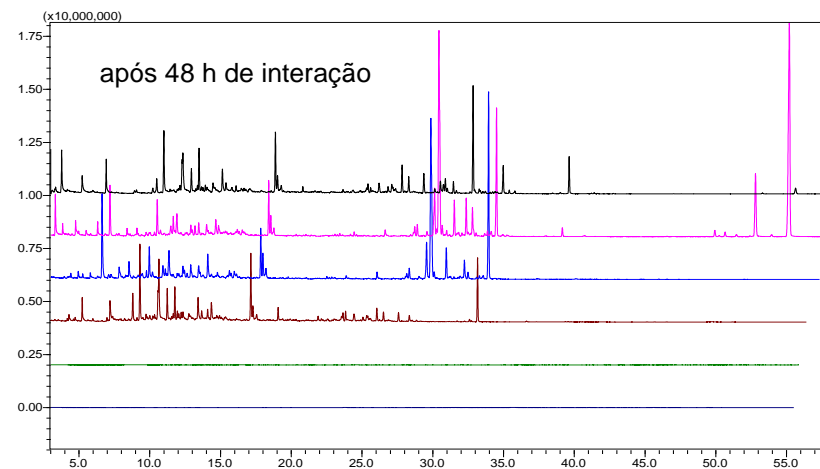
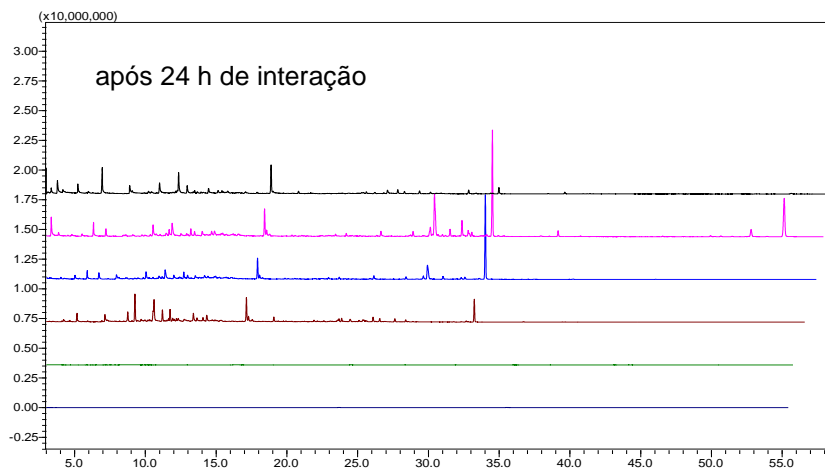
cultivo axênico. Além disso, a produção dos kaurenos no cultivo axênico mostrou uma tendência de crescimento no tempo enquanto que nos experimentos de co-cultivo a produção dessas substâncias diminuiu e se estabilizou após 48 h. Claramente o padrão de produção dessas substâncias é diferente nos experimentos de confronto e no cultivo axênico, o que nos permitiu inferir que esses diterpenos podem estar mediando relações ecológicas importantes entre os fungos.



- *F. guttiforme*
- Co-cultivo entre *F. guttiforme* e *P. caricae-papayae*
- *P. caricae-papayae*

- branco do meio de cultivo
- branco da fibra
- branco da coluna

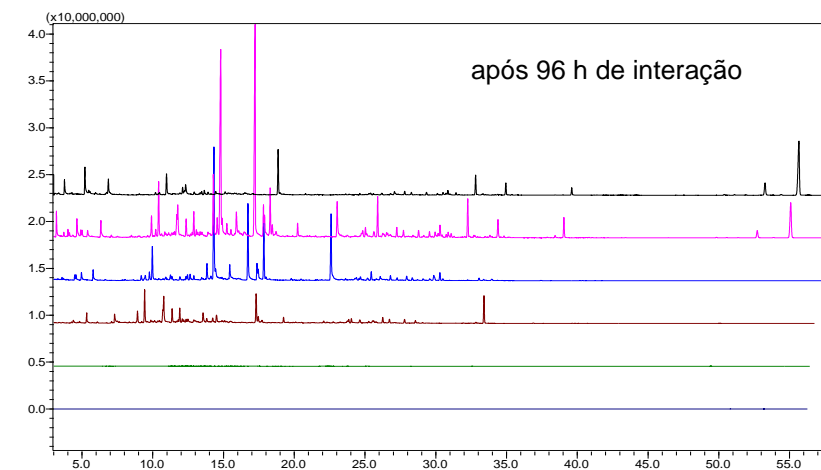
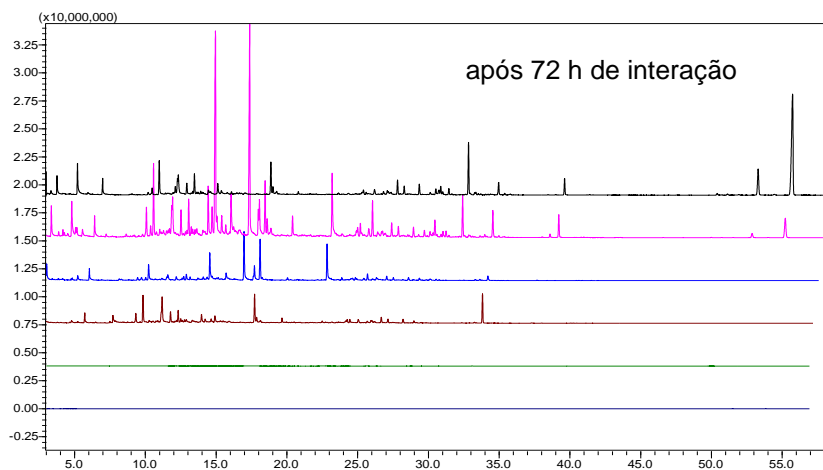
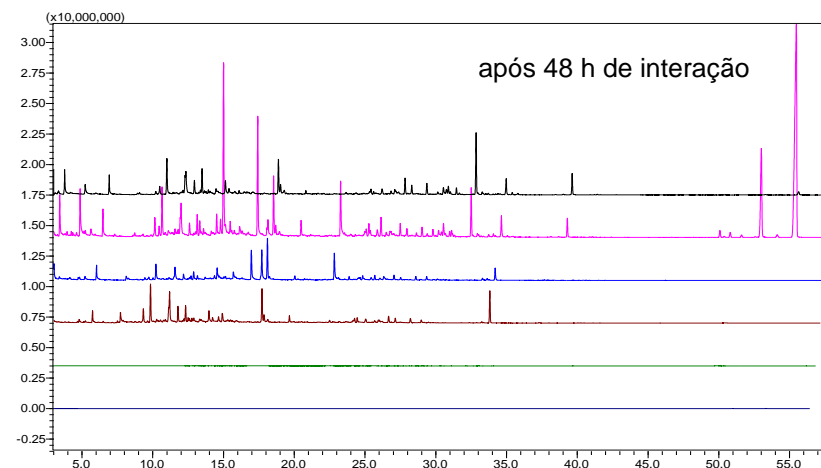
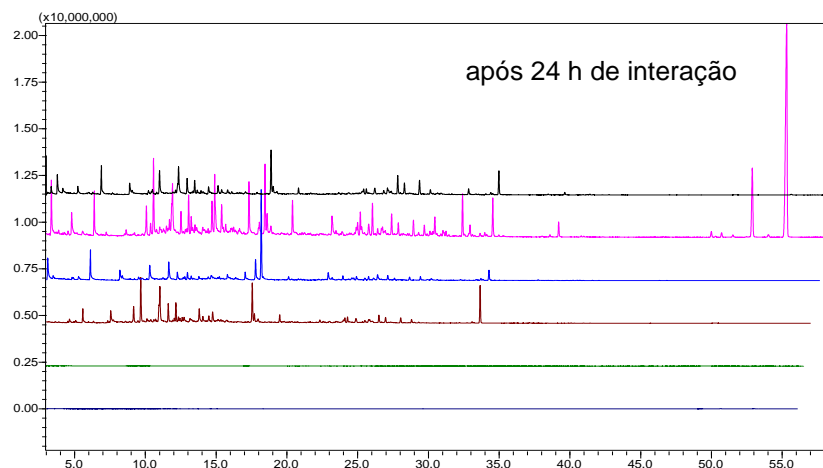
FIGURA 2.9 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por *F. guttiforme*, *P. caricae-papayae* e pela interação entre eles.



- *F. guttiforme*
- Co-cultivo entre *F. guttiforme* e *C. horii*
- *C. horii*

- branco do meio de cultivo
- branco da fibra
- branco da coluna

FIGURA 2.10 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por *F. guttiforme*, *C. horii* e pela interação entre eles.



- *F. guttiforme*
- Co-cultivo entre *F. guttiforme* e *C. gloeosporioides*
- *C. gloeosporioides*

- branco do meio de cultivo
- branco da fibra
- branco da coluna

FIGURA 2.11 - Perfis químicos dos voláteis produzidos por *F. guttiforme*, *C. gloeosporioides* e pela interação entre eles.

Diterpenos constituem uma ampla classe de produtos naturais sendo várias as atividades antifúngicas relacionadas a essa classe de substâncias. CHENG et al. (2005) investigaram a atividade fungicida de óleos essenciais extraídos de diferentes partes do cedro japonês (*Cryptomeria japonica*, coletada em Taiwan). Do óleo essencial extraído das folhas, o diterpeno kau-16-eno (**2**) foi identificado como sendo o componente majoritário e esta amostra apresentou 86,7% de atividade fungicida contra *Fusarium solani* e atividade fungicida significativa contra *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* (investigado nesse trabalho). LEE et al. (2009) investigou a atividade fungicida do óleo essencial das folhas de cedro japonês (*Cryptomeria japonica*, coletado na Coreia do Sul) contra outras espécies de fungo, comprovando alta atividade fungicida a 0,5 mg/mL contra várias espécies de *Candida*. Contudo, o resultado mais expressivo foi contra *Cryptococcus neoformans*. DEMIRCI et al. (2006) identificou o diterpeno kaur-16-eno (**2**) como composto minoritário (0,1%) na composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação das partes aéreas de *Haplopappus greenii*. Esta amostra mostrou atividade fungicida contra três espécies de *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae* e, notavelmente, *C. gloeosporioides*. Não foi possível identificar a substância responsável pela atividade biológica uma vez que os testes antifúngicos com os componentes majoritários daquela amostra não apresentaram atividade fungicida contra nenhuma das espécies de *Colletotrichum*. Contudo, como a atividade fungicida já havia sido relatada ao diterpeno kaur-16-eno (**2**) em outros trabalhos, pode-se inferir que esta substância pode ser responsável pela atividade biológica observada por DEMIRCI et al. (2006) mesmo a concentrações tão baixas.

Os estudos de atividade fungicida desses kaurenos relatados em trabalhos anteriores e as evidências contidas no trabalho atual permitiu-nos inferir, de maneira coerente e consistente, que kaur-15-eno (**1**) e kaur-16-eno (**2**) podem estar associados ao mecanismo de defesa à longa distância do *F. guttiforme* em uma situação antagonística frente a uma ameaça. Também, ZHANG et al. (2015) conduziu o mesmo teste de antagonismo feito nesse trabalho para avaliar atividade fungicida de substâncias orgânicas voláteis produzidas por microrganismos em um co-cultivo, mostrando que VOCs produzidos por *F. oxysporum* inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno *Verticillium dahliae*, causador da murcha-de-verticílio, principal doença em tomateiros (SMALLI et al. 2017), oliveiras (OSTOS et al. 2020) sendo também a principal ameaça ao crescimento e produtividade de uma variedade imensa de

culturas economicamente importantes em todo o mundo (HOLLENSTEINER et al. 2017). MULERO-APARICIO et al. (2019) mostrou que uma linhagem não patogênica do *F. oxysporum* é um agente promissor no biocontrole desse patógeno.

Outra conclusão importante das análises das Figuras 2.9-2.11 é que a atividade biológica dos voláteis produzidos pelo *F. guttiforme* é fungistática comprometendo apenas o crescimento micelial dos fungos estudados (*P. caricae-papayae*, *C. horii* e *C. gloeosporioides*) mas não sua produção metabólica.

2.4. Conclusão

As substâncias orgânicas voláteis produzidas pelo fungo *F. guttiforme* inibiram, significativamente, o crescimento micelial dos fitopatógenos *C. horii*, *C. gloeosporioides* e *P. caricae-papayae* com percentuais de inibição de 91.7%, 93.7% e 92.5% respectivamente. A excelente atividade fungistática observada pode estar associada à presença dos diterpenos kaur-15-ene (**1**) e kaur-16-ene (**2**). Essas substâncias também podem estar associadas com um mecanismo antagonístico de defesa à longa distância de *F. guttiforme* em resposta à uma situação hostil.

Desta forma, os resultados indicam que esses diterpenos produzidos pelo *F. guttiforme* podem ser usados como agentes de biocontrole contra os fitopatógenos *C. horii*, *C. gloeosporioides* e *P. caricae-papayae*, espécies extremamente lesivas a culturas de frutas tropicais. Contudo, investigações mais detalhadas precisam ser conduzidas sob condições de campo para garantir sua efetividade e seletividade no biocontrole específico dos fitopatógenos estudados bem como sua influência nas outras comunidades microbianas que não causam antracnose ou podridão preta e que podem mediar relações ecológicas importantes, benéficas as plantas estudadas.

Os resultados desse trabalho foram organizados em formato de artigo e estão em processo de submissão.

3. Referências

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J. & RAM, S. J. "Image processing with ImageJ". *Biophotonics Intern.*, **11**: 36-42, 2004.

ADACHI, W.; KAWAMOTO, S.; OHNO, I.; NISHIDA, K.; KINOSHITA, S.; MATSUBARA, K. & OKUBO, K. "Isolation and characterization of human cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**(10):1789-96, 1998.

AGGARWAL, N.; SLOANE, B. F. "Cathepsin B: multiple roles in cancer". *Proteom. Clin. Appl.*, **8**(5-6): 427-437, 2014.

ALLCOCK, S.; YOUNG, E. H.; HOLMES, M.; GURDASANI, D.; DOUGAN, G.; SANDHU, M. S.; SOLOMON, L. & TÖRÖK, M. E. "Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities". *Glob. Health Epidemiol. Genom.*, **2**, 2017.

ALY, A. H.; DEBBAB, A. & PROKSCH, P. "Fifty years of drug discovery from fungi". *Fungal Divers.*, **50**(1): 3, 2011.

AZZOLLINI, A.; BOGGIA, L.; BOCCARD, J.; SGORBINI, B.; LECOULTRE, N.; ALLARD, P. M.; RUBIOLO, P.; RUDAZ, S.; GINDRO, K.; BICCHI, C. & WOLFENDER, J. L. "Dynamics of metabolite induction in fungal co-cultures by metabolomics at both volatile and non-volatile levels". *Front. Microbiol.*, **9**: 72, 2018.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. & HINTON, A. Jr. "Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species". *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 185-194, 2006.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P. & LESLIE, J. F. "Production of fusaric acid by *Fusarium* species". *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4039-4043, 1996.

BALL, A. M.; ASHBY, A. M.; DANIELS, M. J.; INGRAM, D. S. & JOHNSTONE, K. "Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape". *Physiol. Mol. Plant. Path.*, **38**(2): 147-161, 1991.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review". *J. Pharm. Anal.*, **6**: 71-79, 2016.

BARRET, A. J.; KEMHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAIT, M. & HANADAT, K. "L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L". *Biochem. J.*, **201**: 189-198, 1982.

BENES, P.; VETVICKA, V.; FUSEK, M. "Cathepsin D - many functions of one aspartic protease". *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, **68**(1): 12-28, 2008.

BERCHEM, G.; GLONDU, M.; GLEIZES, M.; BROUILLET, J. P.; VIGNON, F.; GARCIA, M. & LIAUDET-COOPMAN, E. "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogeneses and apoptosis". *Oncogene*, **21**(38): 5951-5955, 2002.

- BERDOWSKA, I. "Cysteine proteases as disease markers". *Clin. Chim. Acta*, 342(1): 41-69, 2004.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K. & WOLFENDER, J. L. "Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery". *Biotechnol. Adv.*, **32**: 1180-1204, 2014.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M.; GINDRO, K. & WOLFENDER, J. L. "Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting". *J. Chromatogr. A*, **1292**: 219-228, 2013.
- BLOOD, R. R. Y.; ROZWALKA, L. C. & DE MIO, L. L. M. "Antracnose do caquizeiro causada por *Colletotrichum horii*: incidência em ramos, folhas, flores e frutos em campo". *Rev. Bras. Frutic.*, **37**: 335-345, 2015.
- BORDOH, P. K.; ALI, A.; DICKINSON, M.; SIDDIQUI, Y. & ROMANAZZI, G. "A review on the management of postharvest anthracnose in dragon fruits caused by *Colletotrichum* spp". *Crop Prot.*, **130**: 105067, 2020.
- BORÓN, P.; GRAD, B.; NAWROT-CHORABIK, K. & KOWALSKI, T. "The genetic relationships within *Apiognomonia errabunda* and related species". *Mycologia*, **111**: 541-550, 2019.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A. & JEMAL, A. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA Cancer J. Clin.*, **68**: 394-424, 2018.
- BRÖMME, D.; LI, Z.; BARNES, M. & MEHLER, E. "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization". *Biochem.* 38(8): 2377-2385, 1999.
- BRZIN, J.; ROGELJ, B.; POPOVIC, T.; STRUKELJ, B.; RITONJA, A. "Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*". *J. Biol. Chem.*, **275**: 20104-20109, 2000.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R. & WEIR, B. S. "*Colletotrichum* - current status and future directions". *Stud. Mycol.*, **73**: 181-213, 2012.
- CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; CUTIGNANO, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C. "Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygama*". *Phytochemistry*, **41**: 1035-1039, 1996.
- CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; DORRESTEIN, P. C. & PUPO, M. T. "Molecular inter-kingdom interactions of endophytes isolated from *Lychnophora ericoides*". *Sci. Rep.*, **7**: 5373, 2017.
- CASTELLANI, A. "The 'water cultivation' of pathogenic fungi". *J. Trop. Med. Hyg.*, **66**: 283-284, 1963.

Centers for Disease Control and Prevention (2017). "The Global Fight Against Chagas Disease". Disponível em: <<https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/malaria-parasitic-diseases/the-global-fight-against-chagas-disease.htm>>. Acesso em 21/11/2020.

CHAGAS, F. O. Utilização de Culturas Mistas como Estratégia para Estimular a Biossíntese de Produtos Naturais por Fungos Endofíticos. Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – FFCLRP-USP, 2010. Dissertação de mestrado, 168 p.

CHENG, S. S.; LIN, H. Y. & CHANG, S. T. "Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*)". J. Agric. Food Chem., **53**: 614-619, 2005.

CHWIERALSKI, C. E.; WELTE, T. & BÜHLING, F. "Cathepsin-regulated apoptosis". Apoptosis, 11(2): 143-149, 2006.

CLSI. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For bacteria that grow aerobically. Approved standard, 10th Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. "Natural products: a continuing source of novel drug leads". Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj., 1830(6): 3670-3695, 2013.

DAMASCENO, C. L.; DUARTE, E. A. A.; DOS SANTOS, L. B. P. R.; DE OLIVEIRA, T. A. S.; DE JESUS, F. N.; DE OLIVEIRA, L. M.; GÓES-NETO, A. & SOARES, A. C. F. "Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil". Biol. Control, **137**: 104016, 2019.

DAMM, U.; BARONCELLI, R.; CAI, L.; KUBO, Y.; O'CONNELL, R.; WEIR, B.; YOSHINO, K. & CANNON, P. F. "*Colletotrichum*: species, ecology and interactions". IMA fungus, **1**: 161-165, 2010.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F.; BARRETO, R. W.; GUATIMOSIM, E. & CROUS, P. W. "The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds". Fungal Divers, **61**: 29-59, 2013.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P. & CROUS, P.W. "The *Colletotrichum boninense* species complex". Stud. Mycol., **73**: 1-36, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C. & CROUS, P. W. "The *Colletotrichum acutatum* species complex". Stud. Mycol., **73**: 37-113, 2012b.

DAMM, U.; O'CONNELL, R. J.; GROENEWALD, J. Z. & CROUS, P. W. "The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops". Stud. Mycol. **79**: 49-84, 2014.

- DE LIMA, L. M.; DE MORAIS, P. L. D.; DE MEDEIROS, É. V.; MENDONÇA, V.; XAVIER, I. F. & LEITE, G. A. "Qualidade pós-colheita do mamão formosa 'Tainung 01' comercializados em diferentes estabelecimentos no Município de Mossoró-RN". *Rev. Bras. Frutic.*, **31**: 902-906, 2009.
- DE SILVA, D. D.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D. & TAYLOR, P. W. J. "Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity". *Fungal Biol. Rev.*, **31**: 155-168, 2017.
- DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J. & FOSTER, G. D. "The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology". *Mol. Plant Pathol.*, **13**: 414-430, 2012.
- DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C.; TABANCA, N. & WEDGE, D. E. "Characterization of volatile constituents of *Haplopappus greenei* and studies on the antifungal activity against phytopathogens". *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 3146-3150, 2006.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. "Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **57**: 41-48, 1971.
- DONG, Y.; LIN, J.; LU, X.; ZHENG, Z.; REN, X.; ZHANG, H.; HE, J. & YANG, J. "Cathepsin B inhibitory tetraene lactones from the fungus *Talaromyces wortmannii*". *Helv. Chim. Acta*, **92**: 567-574, 2009.
- DRENKARD, E. "Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *Microbes Infect.*, **5**: 1213-1219, 2003.
- EDWARDS, D. R. & MURPHY, G. "Cancer: proteases-invasion and more". *Nature*, **394**(6693): 527-528, 1998.
- EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R. & PIECHULLA, B. "Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil". *J. Chem. Ecol.*, **38**: 665-703, 2012.
- FARAHAT, A. M. & EL-BATAWY, O. I. "Proteolytic activity and some properties of stirred fruit yoghurt made using some fruits containing proteolytic enzymes". *World J. Dairy Food Sci.*, **1**(8): 38-44, 2013.
- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A. & BRAY, F. "Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods". *Int. J. Cancer*. **144**(8):1941-1953, 2019.
- FERREIRA, R. A. A.; PAULI, I.; SAMPAIO, T. S.; DE SOUZA, M. L.; FERREIRA, L. L. G.; MAGALHÃES, L. G.; REZENDE, JR. C. O.; FERREIRA, R.S.; KROGH, R.; DIAS, L.C.; ANDRICOPULO, A. D. "Structure-based and molecular modeling studies for the discovery of cyclic imides as reversible cruzain inhibitors with ootent anti-*Trypanosoma cruzi* activity". *Front. Chem.*, **7**: 798, 2019.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (2017). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i7829e.pdf>>. Acesso em 21/11/2020.

GALSUCKER, O.; DISKIN, S.; MAURER, D.; FEYGENBERG, O. & ALKAN, N. "Fruit stem-end rot". *Hortic.*, **4**: 1-16, 2018.

GAO, Z.; ZHANG, B.; LIU, H.; HAN, J. & ZHANG, Y. "Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*". *Biol. Control*, **105**: 27-39, 2017.

GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. & BROWN, D. P. Control of phytophagous insect pests using serine proteinase inhibitors. In: MICHAUD, D. (Ed.). *Recombinant protease inhibitors in plants*. Georgetown: Eureka.com, 2000. Chap. 2, p. 9-26.

GOLDING, N.; WILSON, A. L.; MOYES, C. L.; CANO, J.; PIGOTT, D. M.; VELAYUDHAN, R.; BROOKER, S. J.; SMITH, D. L.; HAY, S. I. & LINDSAY, S. W. "Integrating vector control across diseases". *BMC Med.*, **13**: 249, 2015.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. del C. "Production of plant proteases in vivo and in vitro - a review". *Biotechnol. Adv.*, **29**(6): 983-996, 2011.

GRIFFITH, M.; POSTELNICK, M. & SCHEETZ, M. "Antimicrobial stewardship programs: methods of operation and suggested outcomes". *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, **10**(1):63-73, 2012.

GUERRET, M. G. L.; BARBETTI, M. J.; YOU, M. P. & JONES, R. A. C. "Effects of temperature on disease severity in plants of subterranean clover infected singly or in mixed infection with *Bean yellow mosaic virus* and *Kabatiella caulivora*". *J Phytopathol.*, **164**: 608-619, 2016.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P. & PUPO, M. T. "Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **52**: 134-144, 2008.

GUPTA, S. "Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery". *Indian J. Med. Res.* **133**: 27-39, 2011.

HAQUE, A.; BANIK, N. L. & RAY, S. K. "New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics". *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **7**(3): 270-277, 2008.

HAWKING, S. W. *A Brief History of Time*, Bantam Books, New York, 2005.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. I.; LA CRUZ, H. R. -DE; VALENCIA-CANTERO, E. & SANTOYO, G. "Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains". *Biol. Control.*, **81**: 83-92, 2015.

HERTWECK, C. "Hidden biosynthetic treasures brought to light". *Nat. Chem. Biol.*, **5**(7): 450-452, 2009.

HOFER, U. "The cost of antimicrobial resistance". *Nat. Rev. Microbiol.*, 17(3), 2019.

HOLLENSTEINER, J.; WEMHEUER, F.; HARTING, R.; KOLARZYK, A. M.; VALERIO, D.; STEFANI, M. & BRAUS, G. H. "*Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species". *Front. Microbiol.*, 7: 2171, 2017.

HOOK, V.; HOOK, G. & KINDY, M. "Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce β -amyloid related to Alzheimer's disease". *J. Biol. Chem.*, 391: 861-872, 2010.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L. & ZHANG, J. Z. "*Colletotrichum* - names in current use". *Fungal Divers.*, 39: 147-182, 2009.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A.; SHUJA, S.; CAI, J.; PENG, P. & MURNAME, M. J. "Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression". *J. Biol. Chem.*, 272(46): 29190-29199, 1997.

IDRIS, A. E.; ABOUZEID, M. A.; BOARI, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. "Identification of phytotoxic metabolites of a new *Fusarium* sp. inhibiting germination of *Striga hermonthica* seeds". *Phytopathol. Mediterr.* 42: 65-70, 2003.

ISSHIKI, K.; ASAI, Y.; TANAKA, S.; NISHIO, M.; UCHIDA, T.; OKUDA, T.; KOMATSUBARA, S.; SAKURAI, N. "Aurantiamide acetate, a selective cathepsin inhibitor, produced by *Aspergillus penicilloides*". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 1195-119, 2001.

JOSHI, R. "A review on *Colletotrichum* spp. Virulence mechanism against host plant defensive factors". *J. Med. Plants Stud.*, 6: 64-67, 2018.

KASSCHAU, M. R.; ROBINSON, D. C. & DREDEN, M. H. "*Schistosoma mansoni*: activation of hemolytic activity in homogenates from live adult worms". *Exp. Parasitol.*, 62(3): 442-449, 1986.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S. & GADHWE, S. "The biology and chemistry of antifungal agents: a review". *Bioorg. Med. Chem.* 20: 5678-5698, 2012.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A. & LUMYONG, S. "Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production". *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 649-655, 2009.

KUMAR, A. & KUDACHIKAR, V. "Efficacy of aroma compounds for postharvest management of mango anthracnose". *J Plant Dis Prot.*, 127: 245-256, 2020.

- KWON, J. -H.; KIM, J.; CHOI, O.; GANG, G. -H.; HAN, S. & KWAK, Y. -S. "Anthracnose caused by *Colletotrichum horii* on sweet persimmon in Korea: Dissemination of conidia and disease development". J. Phytopathol., **161**: 497-502, 2013.
- LANKELMA, J. M.; VOOREND, D. M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; SPEK, A. H. V.; DE PORTO, A. P. N. A.; ROOIJEN, G. V. & NOORDEN, C. J. F. V. "Cathepsin L, target in cancer treatment?". Life Sci., 86(7): 225-233, 2010.
- LECAILLE, F.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". Chem. Rev., 102(12): 4459-4488, 2002.
- LEE, J. H.; LEE, B. K.; KIM, J. H.; LEE, S. H. & HONG, S. K. "Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*". J. Microbiol. Biotechn., **19**: 391-396, 2009.
- LETO, G.; SEPPORTA, M. V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C. & TUMMINELLO, F. M. "Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications". Biol. Chem., 391(6): 655-664, 2010.
- LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G. & HSIANG, T. "Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit". Biol. Control, **61**: 113-120, 2012.
- LIU, F.; CAI, L.; CROUS, P. W. & DAMM, U. "The *Colletotrichum gigasporum* species complex". Persoonia, **33**: 83-97, 2014.
- LOSET, J. R.; BRUN, R.; WENZLER, T.; KAISER, M. & YARDLEY, V. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases. A Training Manual for Screening in Neglected Diseases; 2009.
- MA, X.; WANG, X.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y. & WANG, W. "Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato". Biol. Control, **90**: 34-41, 2015.
- MACABEO-ONG, M.; SHIBOSKI, C.; SILVERMAN, S.; GINZINGER, D. G.; DEKKER, N.; WONG, D. T. W. & JORDAN, R. C. K. "Quantitative analysis of cathepsin L mRNA and protein expression during oral cancer progression". Oral Oncol., 39(7): 638-647, 2003.
- MADANI, B.; MOHAMED, M. T. M.; BIGGS, A. R.; KADIR, J.; AWANG, Y.; TAYEBIMEIGOONI, A. & SHOJAEI, T. R. "Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya". Crop Prot., **55**: 55-60, 2014.
- MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN, W.; WANG, B. & PROKSCH, P. "Co-cultivation - a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. Mar. drugs, 12(2): 1043-1065, 2014.
- MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K. & SÁNCHEZ, S. "Endophytes as sources of antibiotics". Biochem. Pharmacol., **134**: 1-17, 2017.

MAY, H. D.; WU, Q. & BLAKE, C. K. "Effects of the *Fusarium* spp. mycotoxins fusaric acid and deoxynivalenol on the growth of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter ruminantium*". Can. J. Microbiol., **46**: 692-699, 2000.

MAYNADIER, M.; VEZENKOV, L. L.; AMBLARD, M.; MARTIN, V.; GANDREUIL, C.; VAILLANT, O.; GARY-BOBO, M.; BASILE, I.; HERNANDEZ, J. F.; GARCIA, M. & MARTINEZ, J. "Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of cathepsin D inhibitors: a potential target for cancer therapy". J. Control. Release, **171**(2): 251-257, 2013.

McGRATH, M. E. "The lysosomal cysteine proteases". Annu. Rev. Bioph. Biom., **28**(1): 181-204, 1999.

MIKUS, J. & STEVERDING, D. "A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue". Parasitol. Int., **48**: 265-269, 2000.

MOEBIUS-CLUNE, B. N.; VAN ES, H. M.; IDOWU, O. J.; SCHINDELBECK, R. R.; KIMETU, J. M.; NGOZE, S.; LEHMANN, J. & KINYANGI, J. M. "Long-term soil quality degradation along a cultivation chronosequence in western Kenya". Agric. Ecosyst. Environ., **141**: 86-99, 2011.

MOHAMED, M. M. & SLOANE, B. F. "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer". Nat. Rev. Cancer., **6**(10): 764-775, 2006.

MOODY, S. C. "Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials". Future Microbiol., **9**(5), 575-578, 2014.

MOORE, M. J.; OSTRY, M. E.; HEGEMAN, A. D. & MARTIN, A. C. "Inhibition of *Ophiognomonium clavignenti-juglandacearum* by *Juglans* species bark extracts". Plant Dis. **99**: 401-408, 2015.

MOVAHEDI, S. & HEALE, J. B. "The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex Pers". Physiol Mol Plant Path, **36**(4): 303-324, 1990.

MULERO-APARICIO, A.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; VARO, Á.; LÓPEZ-ESCUADERO, F. J. & TRAPERO, A. "A non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* as a potential biocontrol agent against *Verticillium wilt* of olive". Biol. Control, **139**: 104045, 2019.

MUNITA, J. M. & ARIAS, C. A. "Mechanisms of antibiotic resistance". Microbiol. Spectr., **4**(2), 2016.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. DA C.; DE RESENDE, M. L. V. & LIMA, L. C. DE O. "Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão". Cienc. Agrotec., **31**: 1374-1379, 2007.

NEU, E. & DEBENER, T. "Prediction of the *Diplocarpon rosae* secretome reveals candidate genes for effectors and virulence factors". Fungal Biol., **123**: 231-239, 2019.

NEWMAN, D. J., & CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019". *J. Nat. Prod.*, 83(3), 770-803, 2020.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMÜLLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, J. A.; DUVICK, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, D.; HENRISSAT, B.; HOWARD, R. J.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y.; LAW, A. D.; LEBRUN, M.; LEE, Y.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTRÖM, K.; PANACCIONE, D. G.; PANSTRUGA, R.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J. A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STÜBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; VAN DER DOES, H. C.; VOLL, L. M.; WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; VAN THEMAAT, E. V. L.; MA, L. & VAILLANCOURT, L. J. "Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses". *Nat. Genet.*, **44**: 1060-1065, 2012.

OLA, A. R. B.; THOMY, D.; LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; PROKSCH, P. "Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*". *J. Nat. Prod.* 76(11): 2094-2099, 2013.

OSTOS, E.; GARCIA-LOPEZ, M. T.; PORRAS, R.; LOPEZ-ESCUADERO, F. J.; TRAPERO-CASAS, A.; MICHAILIDES, T. J. & MORAL, J. "Effect of cultivar resistance and soil management on spatial-temporal development of *Verticillium* Wilt of olive: a long-term study". *Front. Plant Sci.*, **11**: 584496, 2020.

PALERMO, C. & JOYCE, J. A. "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer". *Trends Pharmacol. Sci.*, 29(1) 22-28, 2008.

PARIS, R. & LAMATTINA, L. "*Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato". *Eur. J. Plant Pathol.*, 105(8): 753-760, 1999.

PARK, Y. -S.; DUTTA, S.; ANN, M.; RAAIJMAKERS, J. M. & PARK, K. "Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **461**: 361-365, 2015.

PRUSTY, R.; GRISAFI, P. & FINK, G. R. "The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**: 4153-4157, 2004.

RABARI, V. P.; CHUDASHAMA, K. S. & THAKER, V. S. "*In vitro* screening of 75 essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides*: a causal agent of anthracnose disease of mango". *Int. J. Fruit Sci.*, **18**: 1-13, 2018.

RAPPUOLI, R.; BLOOM, D. E. & BLACK, S. "Deploy vaccines to fight superbugs". *Nature*, **552**: 163-167, 2017.

RAZA, W.; YUAN, J.; LING, N.; HUANG, Q. & SHEN, Q. "Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root

exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*". Biol. Control, **80**: 89-95, 2015.

REYGAERT, W. C. "An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria". AIMS microbiol., 4(3): 482, 2018.

ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P.A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A. & ZANI, C. L. "Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil". Braz. J. Microbiol., **41**: 420-430, 2010.

SABOTIC, J. & KOS, J. "Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications". Appl. Microbiol. Biotechnol., **93**: 1351-1375, 2012.

SALAS, C. E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M. & LOPES, M. T. P. "Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity". Phytochemistry, 69(12): 2263-2269, 2008.

SANTAMARÍA, I.; VELASCO, G.; CAZORLA, M.; FUEYO, A.; CAMPO, E. & LÓPEZ-OTÍN, C. "Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas". Cancer Res., 58(8), 1624-1630, 1998.

SANTOS, R. F.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; AMORIM, L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. & SPÓSITO, M. B. "Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil". Plant Pathol., **67**: 692-706, 2018.

SARKAR, A. K. "Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants". J. Med. Plants Stud., **4**: 233-236, 2016.

SARRIA, A. L. F.; SILVA, T. L.; DE OLIVEIRA, J. M.; DE OLIVEIRA, M. A. R.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; VENANCIO, T.; ALVES FILHO, E. G.; BATISTA JR, J. M.; GUIDO, R. V. C. "Dimeric chalcones derivatives from *Myracrodruon urundeuva* act as cathepsin V inhibitors". Phytochemistry, **154**: 31-38, 2018.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R. & GLIENKE, C. "Brazilian plants: an unexplored source of endophytes as producers of active metabolites". Planta Med., 85(08), 619-636, 2019.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D. & VIEIRA, P. C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V". Bioorg. Med. Chem., **19**: 1477-1481, 2011.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K. & SHENOY, B. D. "Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using *ApMat* marker". Fungal Divers, **71**: 247-264, 2015.

SHARMA, M. & KULSHRESTHA, S. "*Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables". Biosci. Biotechnol. Res. Asia, **12**: 1233-1246, 2015.

SILVA, T. L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; CONSOLARO, H. N.; DE SOUSA, L. R. F. & VIEIRA, P. C. "New cathepsin V inhibitor from stems of *Bowdichia virgilioides*". Rev. Bras. Farmacogn., **29**: 491-494, 2019.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C. & SINGH, D. P. "Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development". Agric. Ecosyst. Environ., **140**: 339-353, 2011.

SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D. & HONN, K. V. "Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **83**(8): 2483-2487, 1986.

SMAILI, A.; MAZOIR, N.; RIFAI, L. A.; KOUSSA, T.; MAKROUM, K.; KABIL, EL M.; BENHARREF, A. & FAIZE, M. "Triterpene derivatives from *Euphorbia* enhance resistance against *Verticillium* wilt of tomato". Phytochemistry, **135**: 169-180, 2017.

SON, S. W.; KIM, H. Y.; CHOI, G. J.; LIM, H. K.; JANG, K. S.; LEE, S. O.; LEE, S.; SUNG, N. D.; KIM, J. C. "Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*". J. Appl. Microbiol., **104**: 692-698, 2008.

SONDERGAARD, T. E.; FREDBORG, M.; CHRISTENSEN, A. M. O.; DAMSGAARD, S. K.; KRAMER, N. F.; GIESE, H. & SORENSEN, J. L. "Fast screening of antibacterial compounds from *Fusaria*". Toxins (Basel), **8**: 354-362, 2016.

SZPADERSKA, A. M. & FRANKFATER, A. "An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer". Cancer Res., **61**(8): 3493-3500, 2001.

TEDESCO, D. & HARAGSIM, L. "Cyclosporine: a review". J. Transplant., **2012**: 2012.

TERAO, D.; NECHET, K. DE L.; FRIGHETTO, R. T. S. & SASAKI, F. F. C. "Ozonated water combined with heat treatment to control the stem-end rot of papaya". Sci. Hortic., **257**: 108722, 2019.

TOLOSA, E.; LI, W.; YASUDA, Y.; WIENHOLD, W.; DENZIN, L. K.; LAUTWEIN, A.; DRIESSEN, C.; SCHNORRER, P.; WEBER, E.; STEVANOVIC, S.; KUREK, R.; MELMS, A. & BRÖMME, D. "Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis". J. Clin. Investig., **112**(4): 517-526, 2003.

TROY, A. M.; SHEAHAN, K.; MULCAHY, H. E.; DUFFY, M. J.; HYLAND, J. M. P.; O'DONOGHUE, D. P. "Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression". Eur. J. Cancer, **40**(10): 1610-1616, 2004.

TUNG, T. T.; JAKOBSEN, T. H.; DAO, T. T.; FUGLSANG, A. T.; GIVSKOV, M.; CHRISTENSEN, S. B. & NIELSEN, J. "Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors". Eur. J. Med. Chem. **126**: 1011-1020, 2017.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. "Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms". Biochemistry (Moscow), **69**(11): 1305-1309, 2004.

VASILJEVA, O. & TURK, B. "Dual contrasting roles of cysteine cathepsin in cancer progression: apoptosis versus tumor invasion". *Biochimie*, 90(2): 380-386, 2008.

VICTOR, L. Yu. "Guidelines for hospital-acquired pneumonia and health-care-associated pneumonia: a vulnerability, a pitfall, and a fatal flaw". *Lancet Infect. Dis.*, 11(3): 248-252, 2011.

VIGNESHWARI, R.; ROOPAVATHI, A. S. & JAYAPRADHAA, R. "Co-cultivation - powerful tool for the production of secondary metabolites". *J. Chem. Pharm. Res.*, 7(5), 481-485, 2015.

VIKEN, M. K.; SOLLID, H. D.; JONER, G.; DAHL-JØRGENSEN, K.; RØNNINGEN, K. S.; UNDLIEN, D. E.; FLATØ, B.; SELVAAG, A. M.; FØRRE, Ø.; KVIEN, T. K.; THORSBY, E.; MELMS, A.; TOLOSA, E.; LIE, B. A. "Polymorphisms in the cathepsin L2 (CTSL2) gene show association with type 1 diabetes and early-onset myasthenia gravis". *Human immunology*, 68(9), 748-755, 2007.

WANG, J.; ZHAO, Y. & RUAN, Y. "Effects of bio-organic fertilizers produced by four *Bacillus amyloliquefaciens* strains on banana *Fusarium* wilt disease". *Compos. Sci. Util.*, **23**: 185-198, 2015.

WATSON, C. J. & KREUZALER, P. A. "The role of cathepsin in involution and breast cancer". *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 14(2): 171-179, 2009.

WEIR, B. S. & JOHNSTON, P. R. "Characterisation and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. Nov". *Mycotaxon*, **111**: 209-219, 2010.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R. & DAMM, U. "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex". *Stud. Mycol.*, **73**: 115-180, 2012.

World Health Organization (2018). Cancer. Key facts. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 25/12/2020.

World Health Organization (2020a). Antimicrobial resistance. Key Facts. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em 04/01/2021.

World Health Organization (2020b). "Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020". International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2020/12/pr292_E.pdf>. Acesso em 04/01/2021.

World Health Organization (2020c). International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN. <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em 04/01/2021.

World Health Organization (2020d). Leishmaniasis. Key facts. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 21/11/2020.

XIE, L.; ZHANG, J. -Z.; CAI, L. & HYDE, K. D. "Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose". *Mycology*, **1**: 242-253, 2010.

YASUDA, Y.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "The role of cathepsin in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(7): 973-993, 2005.

YU, C. M.; CURTIS, J. M.; WALTER, J. A.; WRIGHT, J. L. C.; AYER, S. W.; KALETA, J.; QUERENGESSER, L.; FATHI-AFSHAR, Z. R. "Potent inhibitors of cysteine proteases from the marine fungus *Microascus longirostris*". *J. Antibiot.*, **49**: 395-397, 1995.

ZAHID, N.; ALI, A.; MANICKAM, S.; SIDDIQUI, Y. & MAQBOOL, M. "Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage". *J. Appl. Microbiol.*, **113**: 925-933, 2012.

ZAMAN, S. B.; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V.; MAMUN, K. T. & HOSSAIN, N. "A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing". *Cureus*, 9(6), 2017.

ZAMIOUDIS, C.; KORTELAND, J.; VAN PELT, J. A.; VAN HAMERSVELD, M.; DOMBROWSKI, N.; BAI, Y.; HANSON, J.; VAN VERK, M. C.; LING, H. -Q.; SCHULZE-LEFERT, P.; PIETERSE, C. M. J. "Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses". *Plant J.*, **84**: 309-322, 2015.

ZHANG, J. -Z. "Anthracnose of persimmon caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China". *Asian Australas. J. Biosci. Biotechnol.*, **2**: 50-54, 2008.

ZHANG, Q.; YANG, L.; ZHANG, J.; WU, M.; CHEN, W.; JIANG, D. & LI, G. "Production of anti-fungal volatiles by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and its efficacy in suppression of *Verticillium* wilt of cotton". *Plant Soil*, **392**: 101-114, 2015.

Apêndice A

TABELA A.1 - Subconjuntos utilizados nas PCAs.

Subconjunto preliminar		Subconjunto do Fungo 2	
Experimento	Fungo	Experimento	Fungo
1	1	2	2
2	2	7	1 + 2
3	3	12	2 + 3
4	4	13	2 + 4
5	5	14	2 + 5
6	6	15	2 + 6
63	1+2+3+4+5+6	22	1 + 2 + 3
		23	1 + 2 + 4
		24	1 + 2 + 5
		25	1 + 2 + 6
		32	2 + 3 + 4
		33	2 + 3 + 5
		34	2 + 3 + 6
		35	2 + 4 + 5
		36	2 + 4 + 6
		37	2 + 5 + 6
		42	1 + 2 + 3 + 4
		43	1 + 2 + 3 + 5
		44	1 + 2 + 3 + 6
		45	1 + 2 + 4 + 5
		46	1 + 2 + 4 + 6
		47	1 + 2 + 5 + 6
		52	2 + 3 + 4 + 5
		53	2 + 3 + 4 + 6
		54	2 + 3 + 5 + 6
		55	2 + 4 + 5 + 6
		57	1 + 2 + 3 + 4 + 5
		58	1 + 2 + 3 + 4 + 6
		59	1 + 2 + 3 + 5 + 6
		60	1 + 2 + 4 + 5 + 6
		62	2 + 3 + 4 + 5 + 6
		63	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6

TABELA A.1 - Subconjuntos utilizados nas PCAs.

Subconjunto do Fungo 3		Subconjunto do Fungo 4	
Experimento	Fungo	Experimento	Fungo
3	3	4	4
8	1 + 3	9	1 + 4
12	2 + 3	13	2 + 4
16	3 + 4	16	3 + 4
17	3 + 5	19	4 + 5
18	3 + 6	20	4 + 6
22	1 + 2 + 3	23	1 + 2 + 4
26	1 + 3 + 4	26	1 + 3 + 4
27	1 + 3 + 5	29	1 + 4 + 5
28	1 + 3 + 6	30	1 + 4 + 6
32	2 + 3 + 4	32	2 + 3 + 4
33	2 + 3 + 5	35	2 + 4 + 5
34	2 + 3 + 6	36	2 + 4 + 6
38	3 + 4 + 5	38	3 + 4 + 5
39	3 + 4 + 6	39	3 + 4 + 6
40	3 + 5 + 6	41	4 + 5 + 6
42	1 + 2 + 3 + 4	42	1 + 2 + 3 + 4
43	1 + 2 + 3 + 5	45	1 + 2 + 4 + 5
44	1 + 2 + 3 + 6	46	1 + 2 + 4 + 6
48	1 + 3 + 4 + 5	48	1 + 3 + 4 + 5
49	1 + 3 + 4 + 6	49	1 + 3 + 4 + 6
50	1 + 3 + 5 + 6	51	1 + 4 + 5 + 6
52	2 + 3 + 4 + 5	52	2 + 3 + 4 + 5
53	2 + 3 + 4 + 6	53	2 + 3 + 4 + 6
54	2 + 3 + 5 + 6	55	2 + 4 + 5 + 6
56	3 + 4 + 5 + 6	56	3 + 4 + 5 + 6
57	1 + 2 + 3 + 4 + 5	57	1 + 2 + 3 + 4 + 5
58	1 + 2 + 3 + 4 + 6	58	1 + 2 + 3 + 4 + 6
59	1 + 2 + 3 + 5 + 6	60	1 + 2 + 4 + 5 + 6
61	1 + 3 + 4 + 5 + 6	61	1 + 3 + 4 + 5 + 6
62	2 + 3 + 4 + 5 + 6	62	2 + 3 + 4 + 5 + 6
63	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	63	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6

TABELA A.1 - Subconjuntos utilizados nas PCAs.

Subconjunto do Fungo 5		Subconjunto do Fungo 6	
Experimento	Fungo	Experimento	Fungo
5	5	6	6
10	1 + 5	11	1 + 6
14	2 + 5	15	2 + 6
17	3 + 5	18	3 + 6
19	4 + 5	20	4 + 6
21	5 + 6	21	5 + 6
24	1 + 2 + 5	25	1 + 2 + 6
27	1 + 3 + 5	28	1 + 3 + 6
29	1 + 4 + 5	30	1 + 4 + 6
31	1 + 5 + 6	31	1 + 5 + 6
33	2 + 3 + 5	34	2 + 3 + 6
35	2 + 4 + 5	36	2 + 4 + 6
37	2 + 5 + 6	37	2 + 5 + 6
38	3 + 4 + 5	39	3 + 4 + 6
40	3 + 5 + 6	40	3 + 5 + 6
41	4 + 5 + 6	41	4 + 5 + 6
43	1 + 2 + 3 + 5	44	1 + 2 + 3 + 6
45	1 + 2 + 4 + 5	46	1 + 2 + 4 + 6
47	1 + 2 + 5 + 6	47	1 + 2 + 5 + 6
48	1 + 3 + 4 + 5	49	1 + 3 + 4 + 6
50	1 + 3 + 5 + 6	50	1 + 3 + 5 + 6
51	1 + 4 + 5 + 6	51	1 + 4 + 5 + 6
52	2 + 3 + 4 + 5	53	2 + 3 + 4 + 6
54	2 + 3 + 5 + 6	54	2 + 3 + 5 + 6
55	2 + 4 + 5 + 6	55	2 + 4 + 5 + 6
56	3 + 4 + 5 + 6	56	3 + 4 + 5 + 6
57	1 + 2 + 3 + 4 + 5	58	1 + 2 + 3 + 4 + 6
59	1 + 2 + 3 + 5 + 6	59	1 + 2 + 3 + 5 + 6
60	1 + 2 + 4 + 5 + 6	60	1 + 2 + 4 + 5 + 6
61	1 + 3 + 4 + 5 + 6	61	1 + 3 + 4 + 5 + 6
62	2 + 3 + 4 + 5 + 6	62	2 + 3 + 4 + 5 + 6
63	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	63	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6

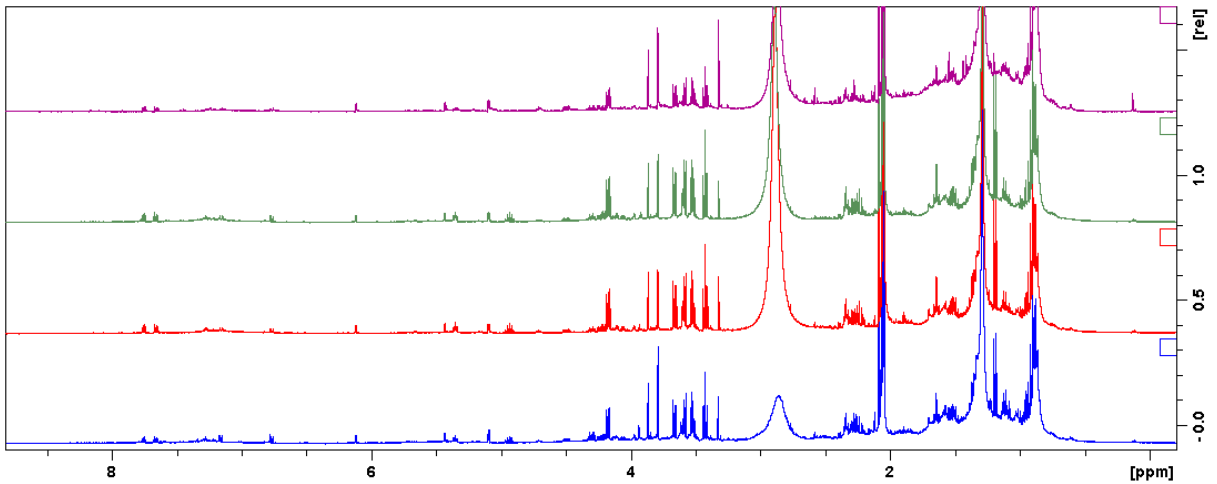


FIGURA A.1 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 2 (em violeta) e do experimento 37 (replicatas em verde, vermelho e azul).

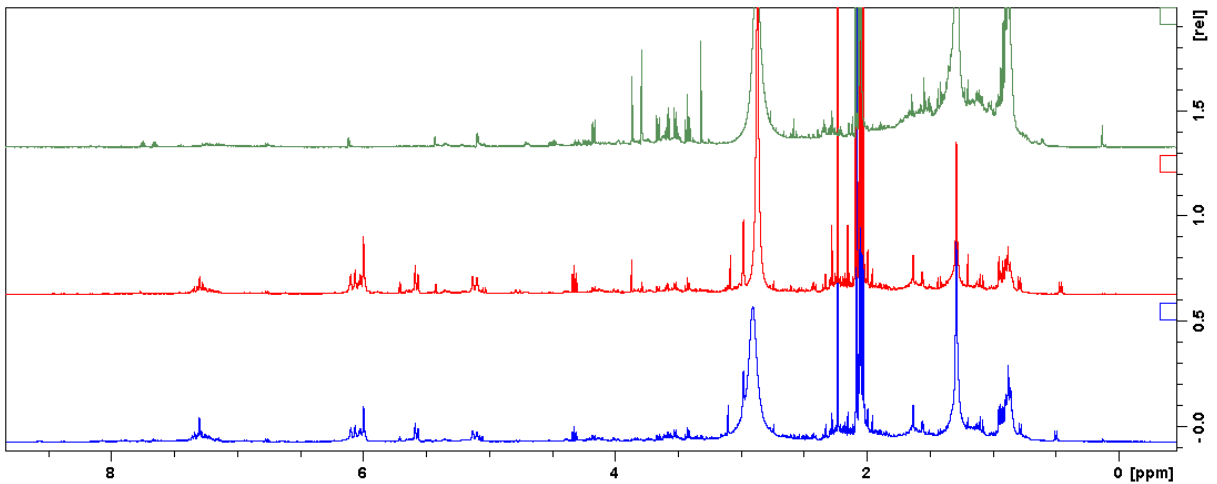


FIGURA A.2 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 2 (em verde), do co-cultivo 7 (em vermelho) e do cultivo axênico do Fungo 1 (espectro em azul).

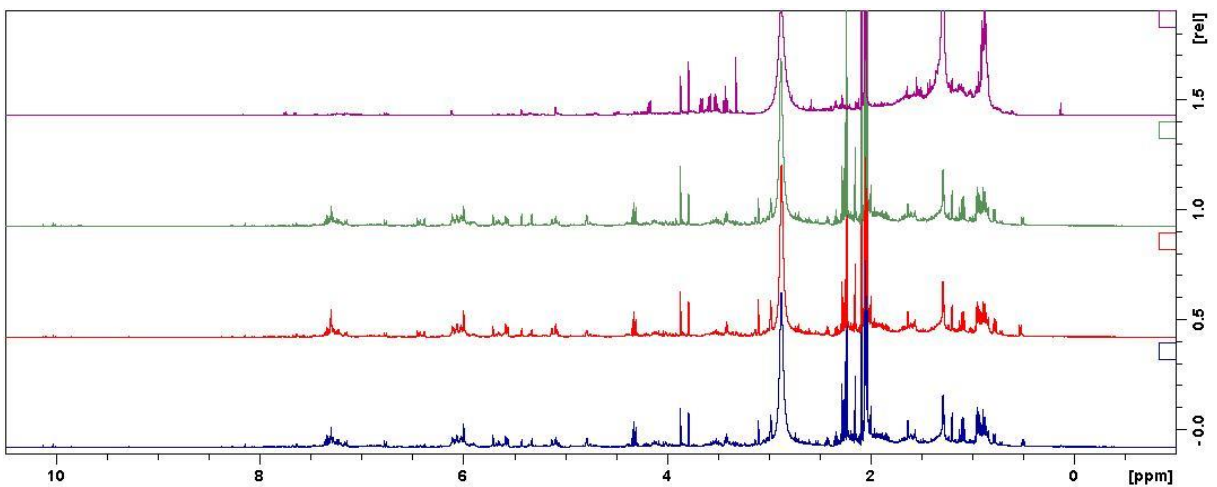


FIGURA A.3 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 2 (em violeta) e do experimento 22 (replicatas em verde, vermelho em azul).

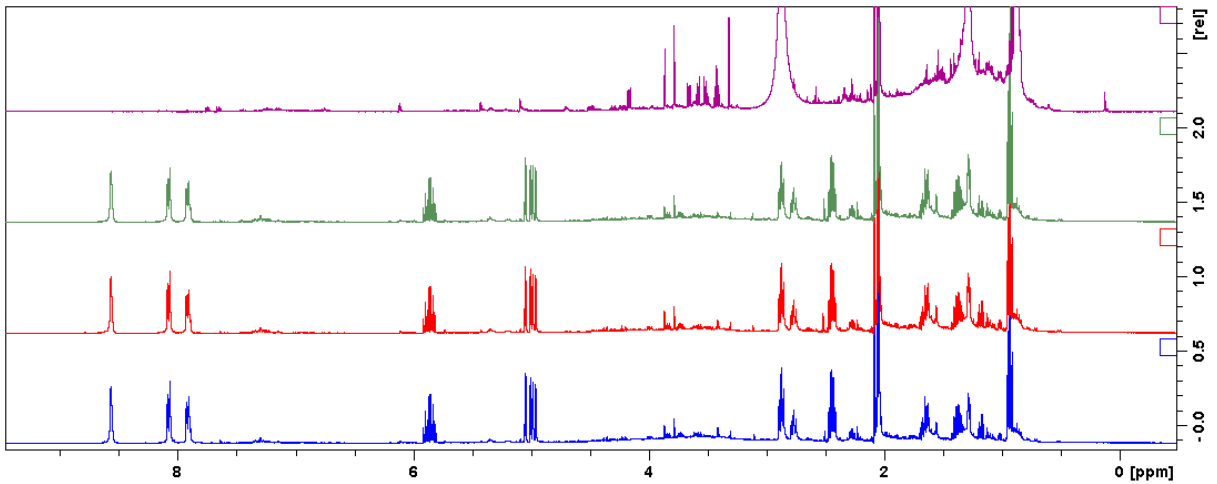


FIGURA A.4 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 2 (em violeta) e do experimento 45 (replicatas em verde, vermelho e azul).

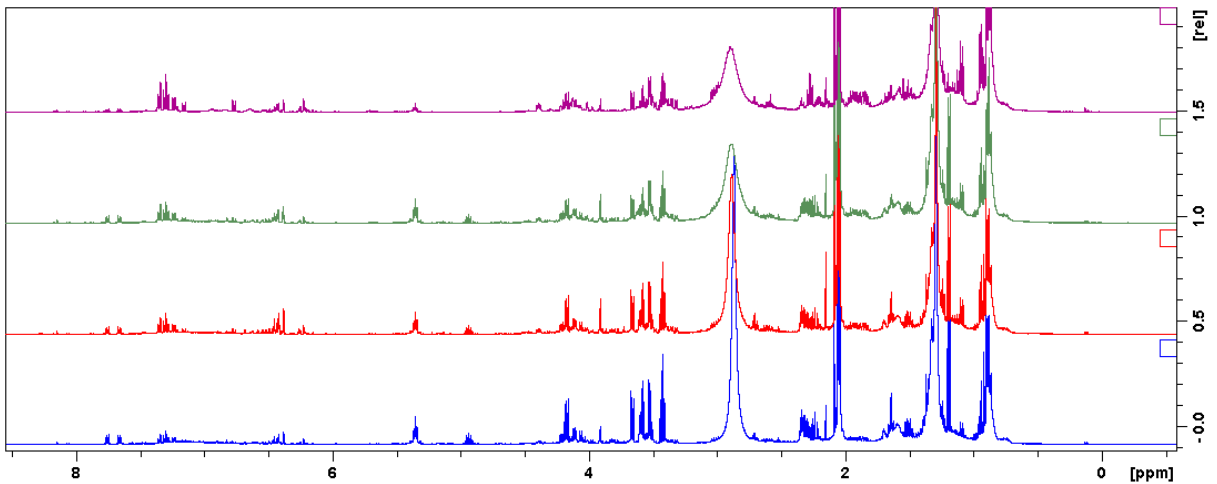


FIGURA A.5 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 3 (em violeta) e do experimento 40 (replicatas em verde, vermelho e azul).

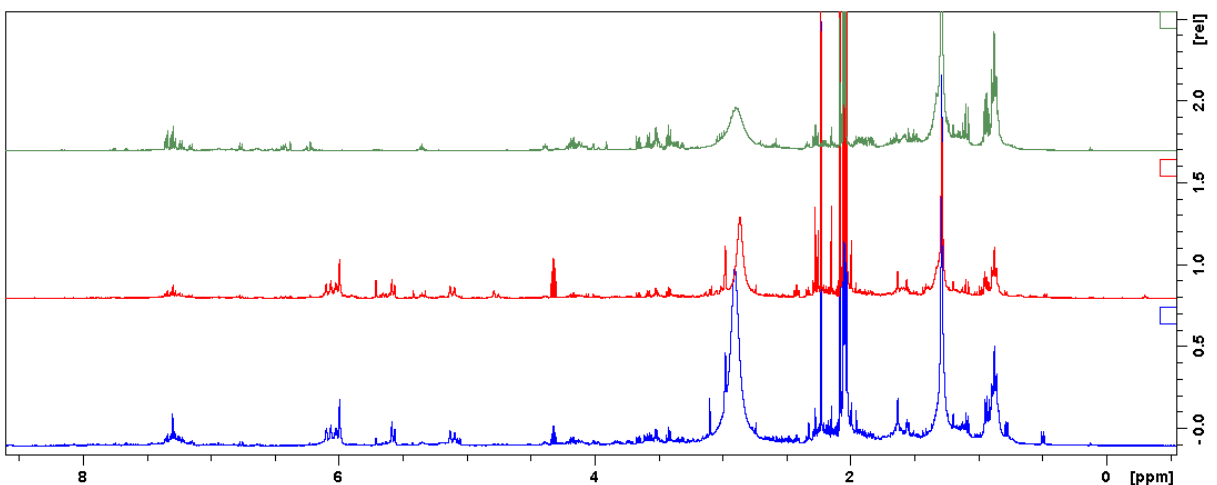


FIGURA A.6 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 3 (espectro em verde), do experimento 8 (em vermelho) e do cultivo axênico do Fungo 1 (em azul).

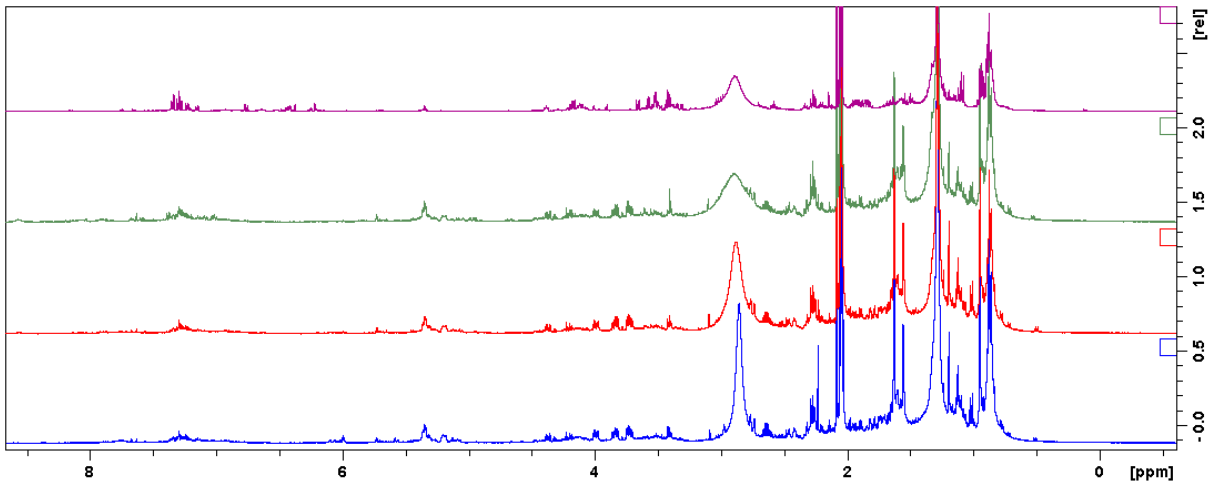


FIGURA A.7 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do cultivo axênico do Fungo 3 (em violeta) e do experimento 26 (replicatas em verde, vermelho e azul).

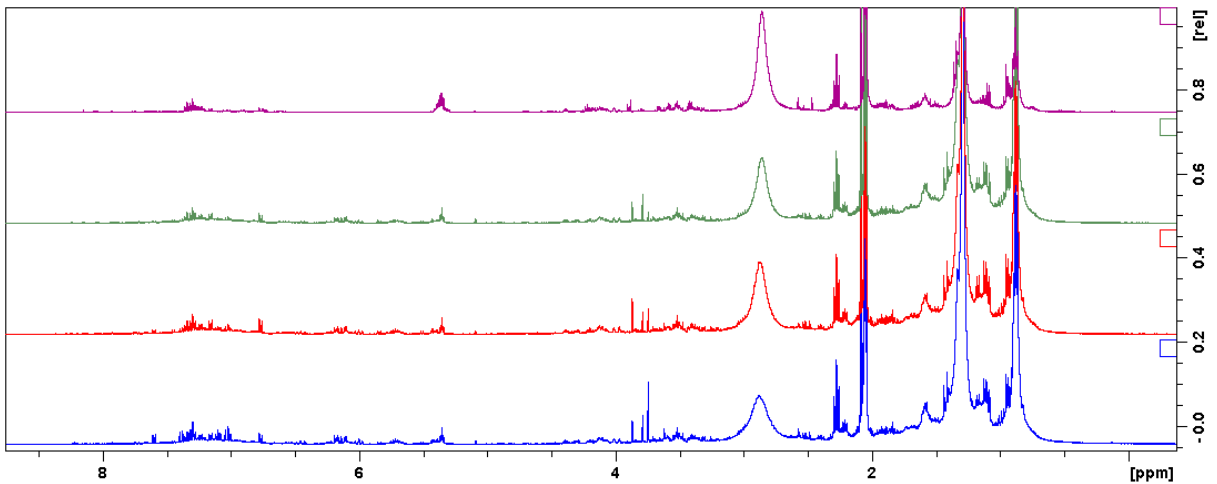


FIGURA A.8 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do cultivo axênico do Fungo 5 (em violeta) e do experimento 62 (replicatas em verde, vermelho e azul).

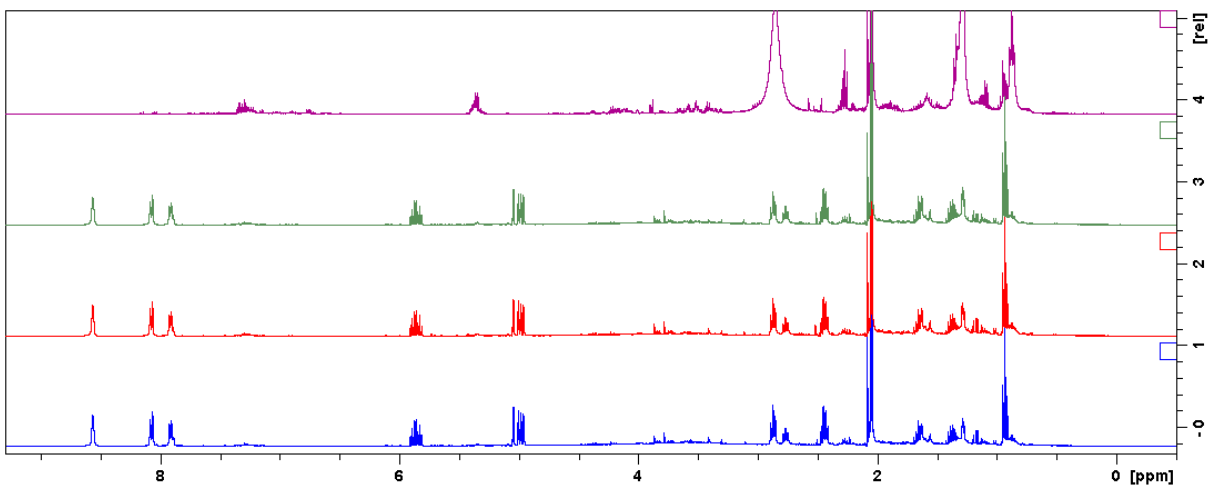


FIGURA A.9 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do cultivo axênico do Fungo 5 (em violeta) e do experimento 45 (replicatas em verde, vermelho e azul).

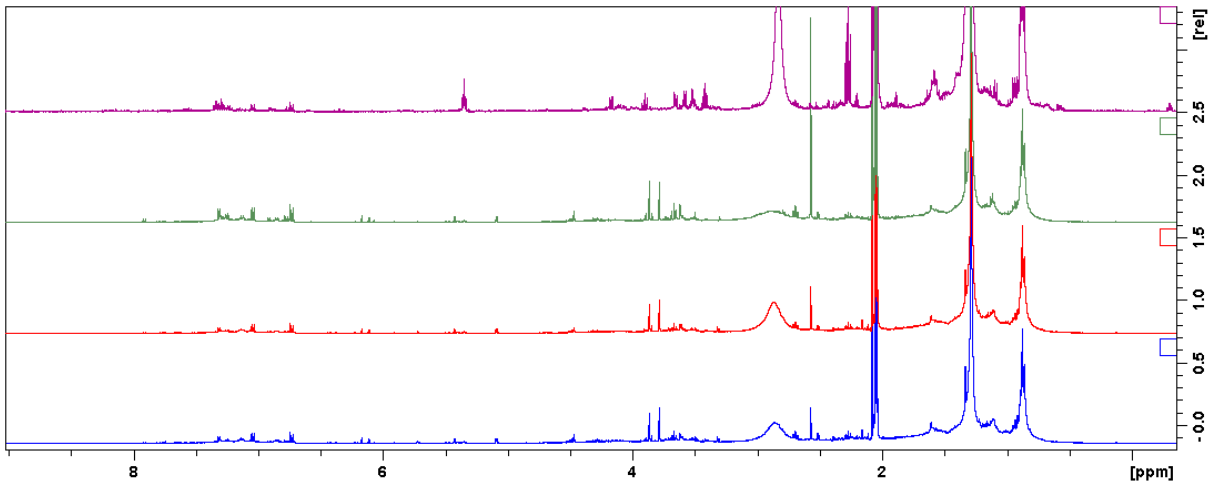


FIGURA A.10 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 6 (em violeta) e do experimento 54 (replicatas em verde, vermelho e azul).

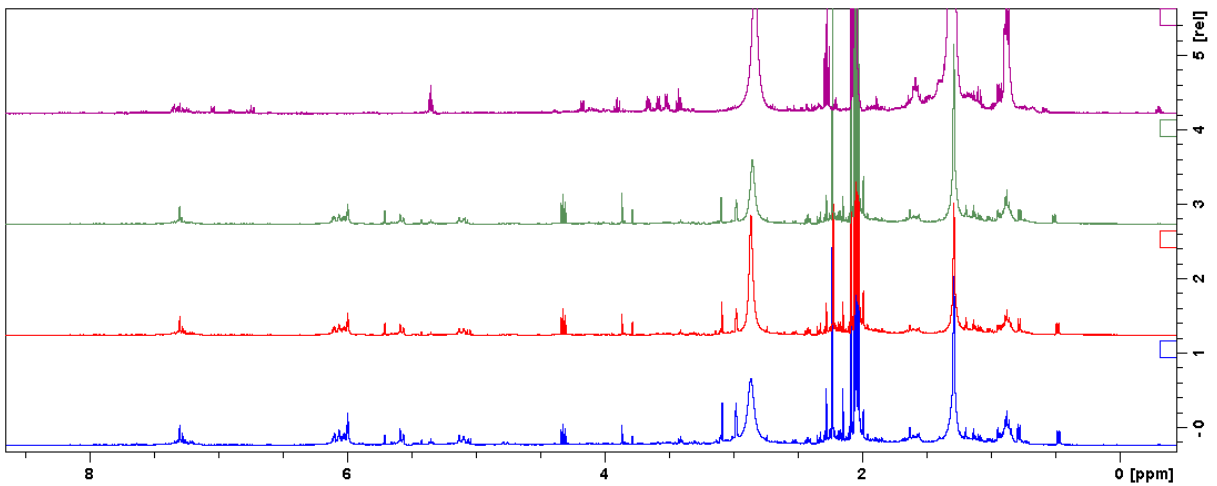


FIGURA A.11 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 6 (em violeta) e do experimento 25 (replicatas em verde, vermelho e azul).

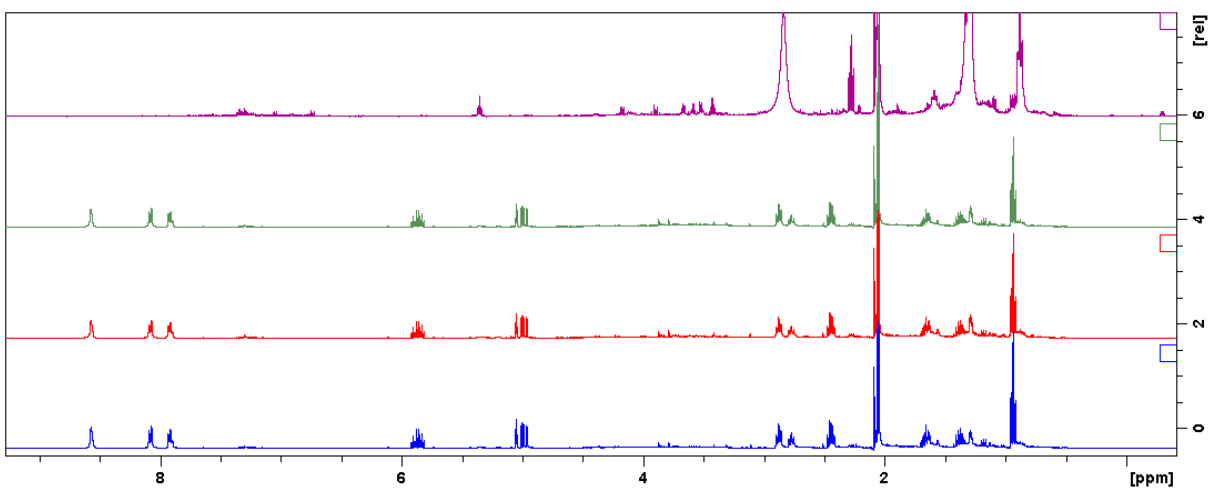


FIGURA A.12 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 6 (em violeta) e do experimento 46 (replicatas em verde, vermelho e azul).

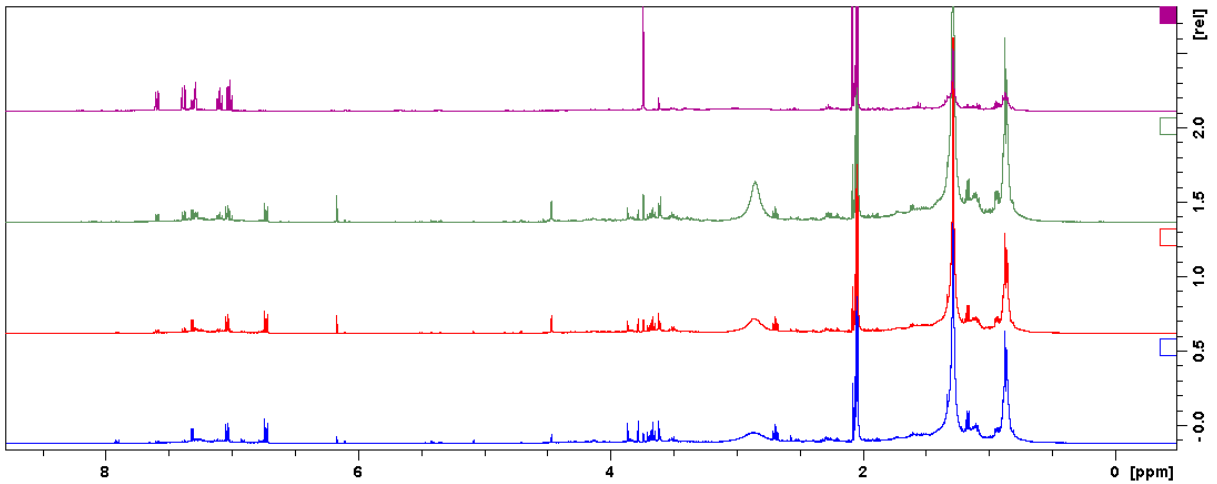


FIGURA A.13 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 4 (em violeta) e do experimento 32 (replicatas em verde, vermelho e azul).

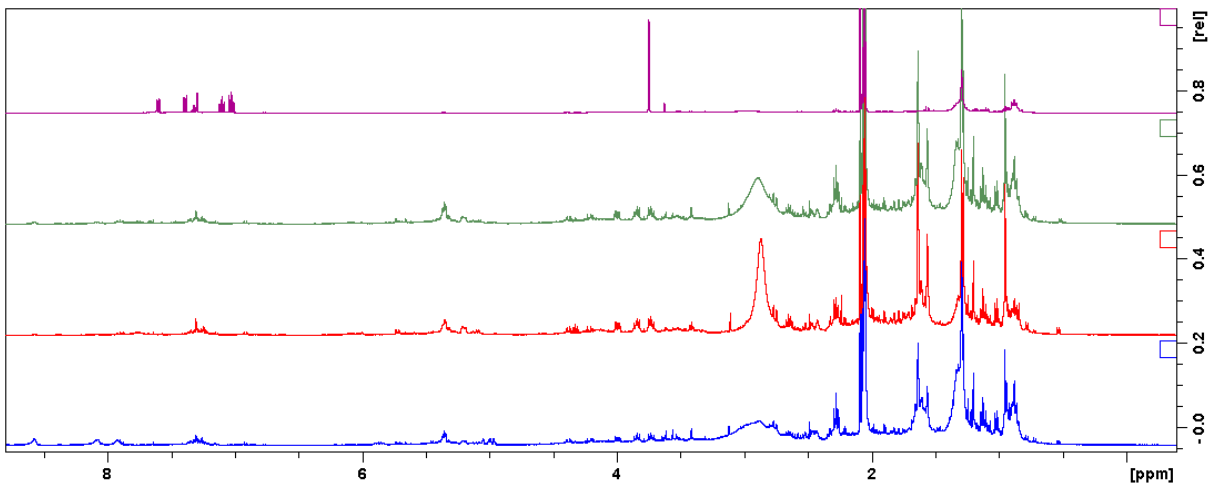


FIGURA A.14 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 4 (em violeta) e do experimento 29 (replicatas em verde, vermelho e azul).

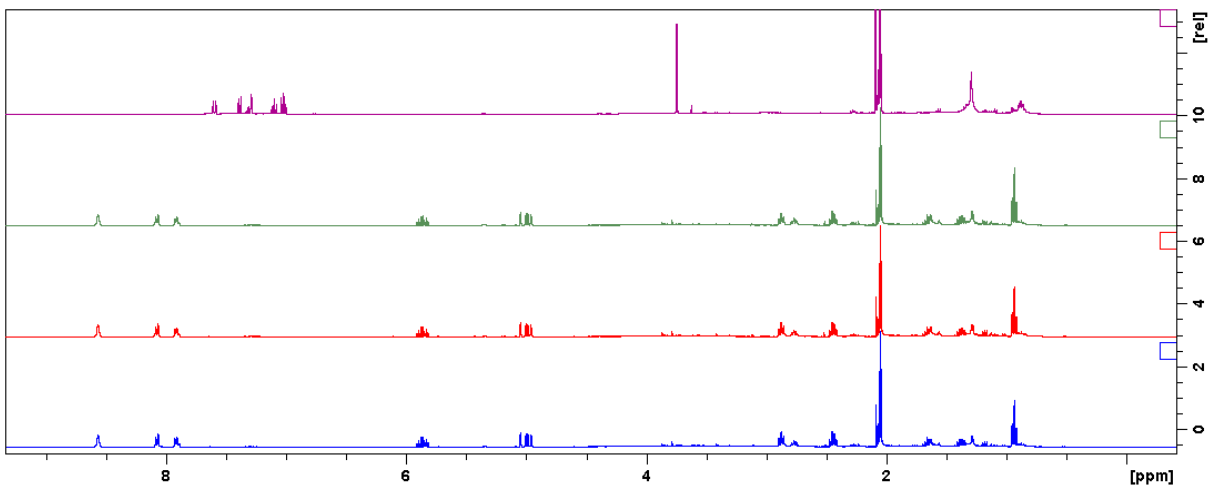
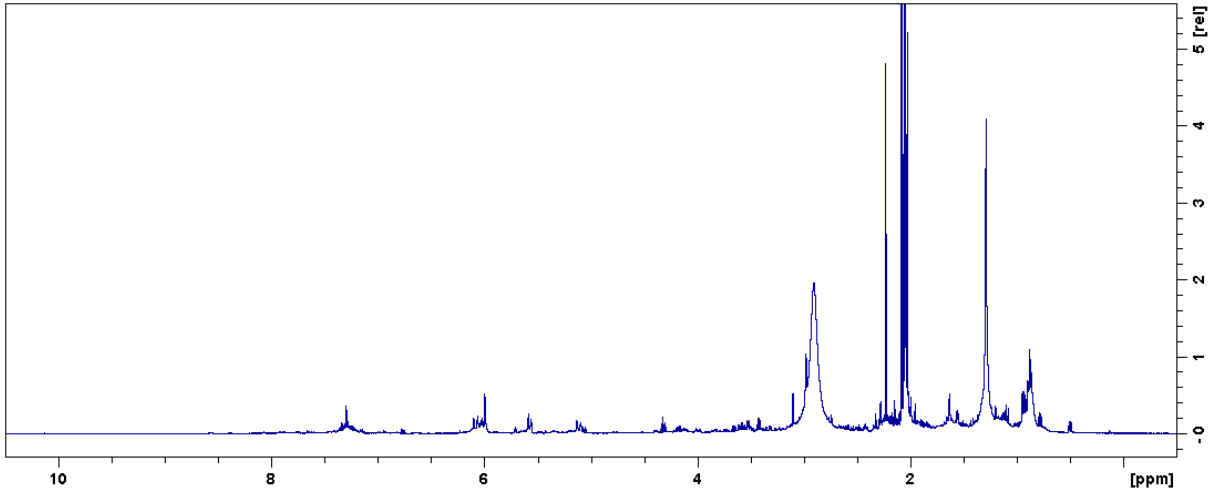
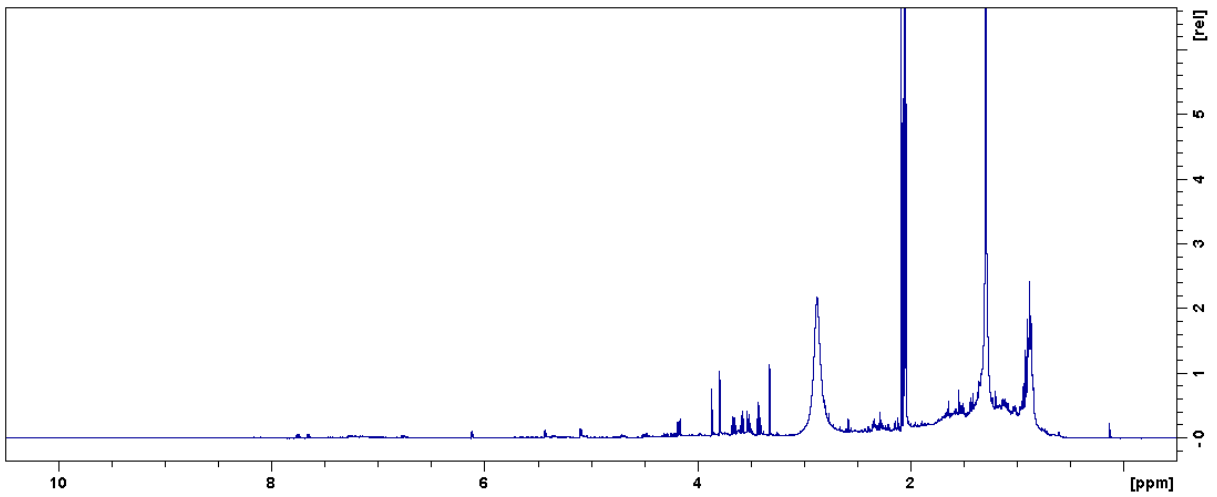
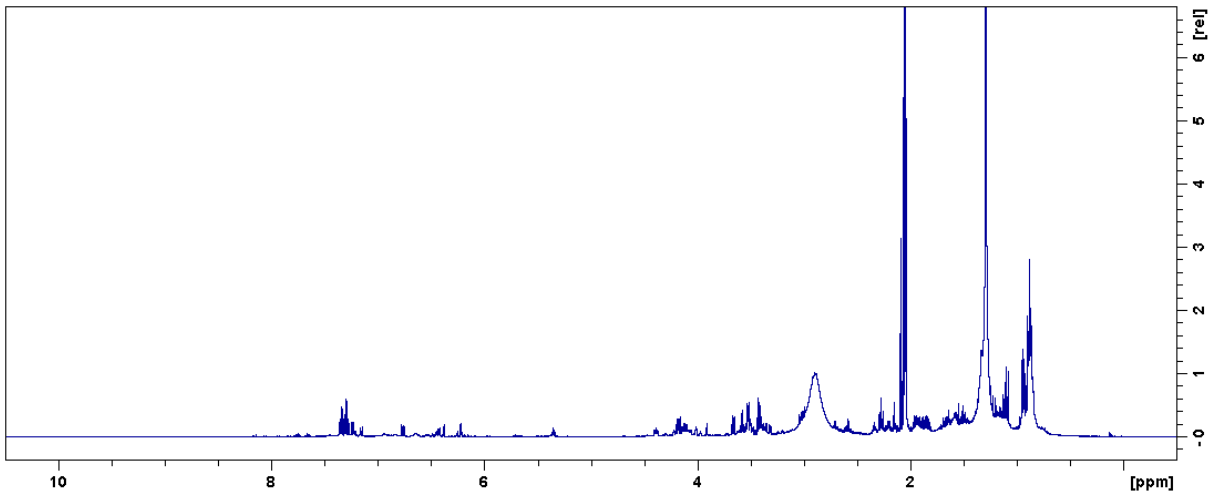


FIGURA A.15 - Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do cultivo axênico do Fungo 4 (em violeta) e do experimento 45 (replicatas em verde, vermelho e azul).

Apêndice B

FIGURA B.1 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 1.FIGURA B.2 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 2.FIGURA B.3 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 3.

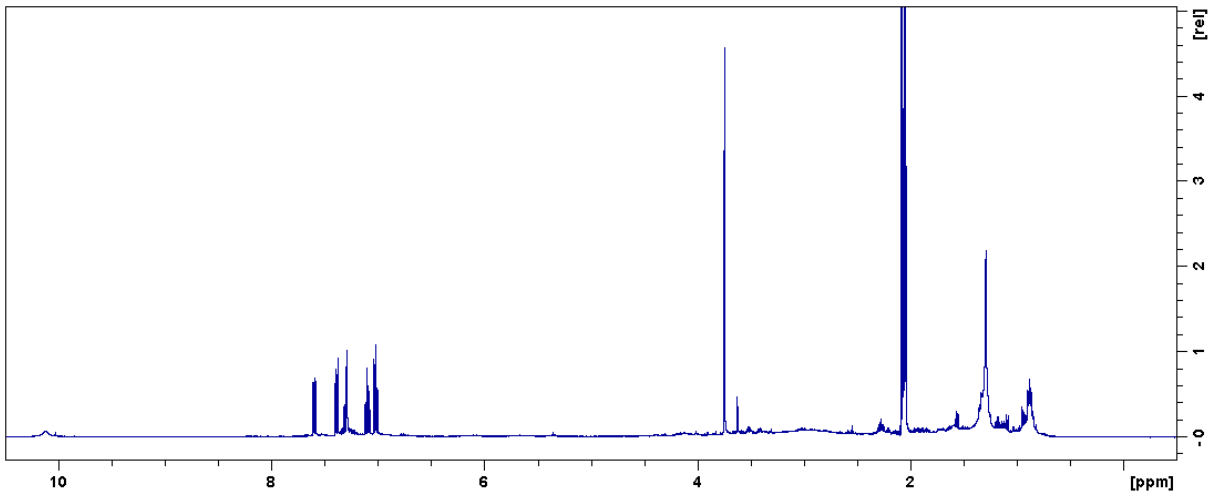


FIGURA B.4 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 4.

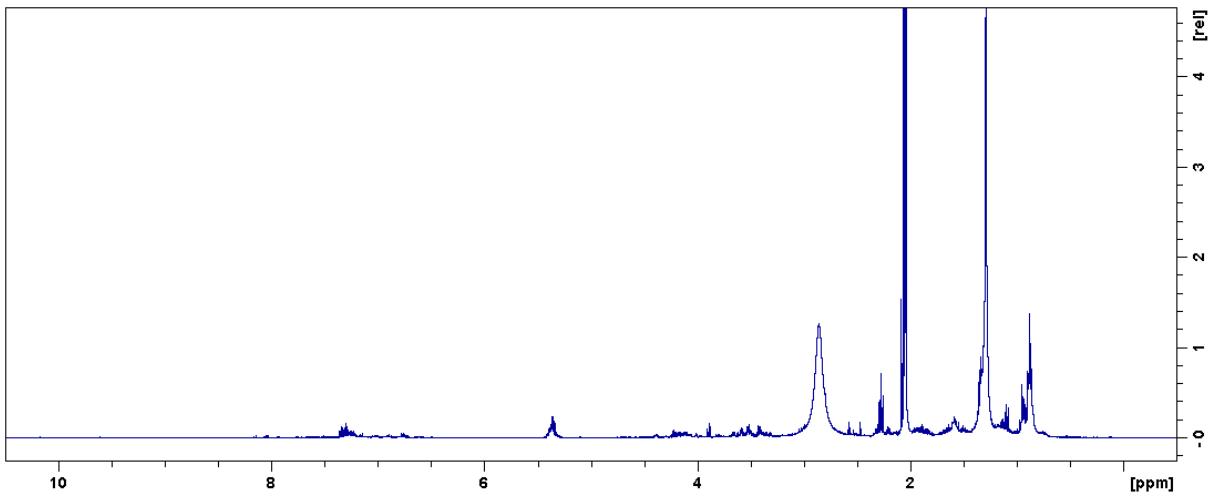


FIGURA B.5 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 5.

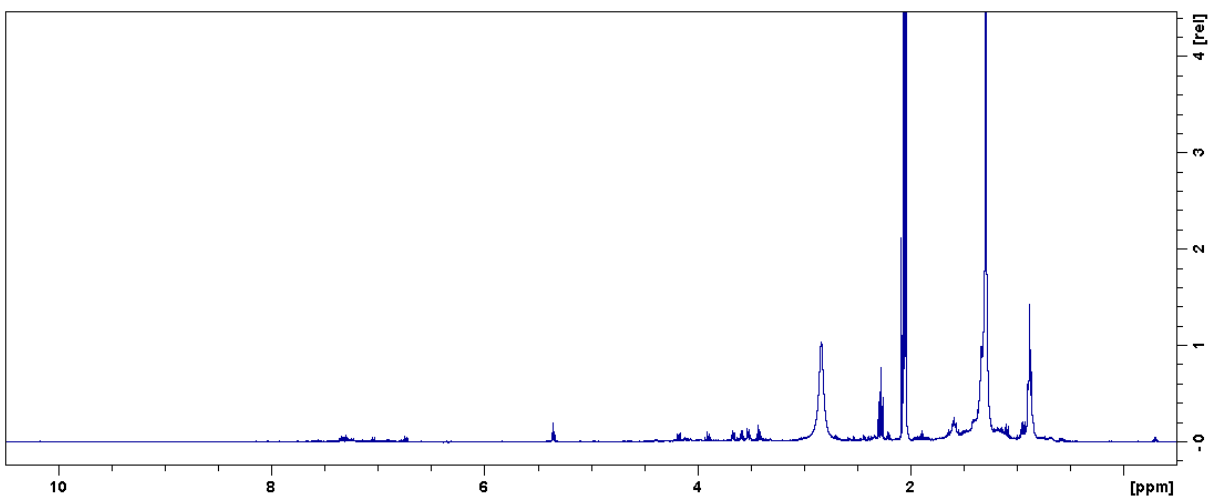


FIGURA B.6 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 6.

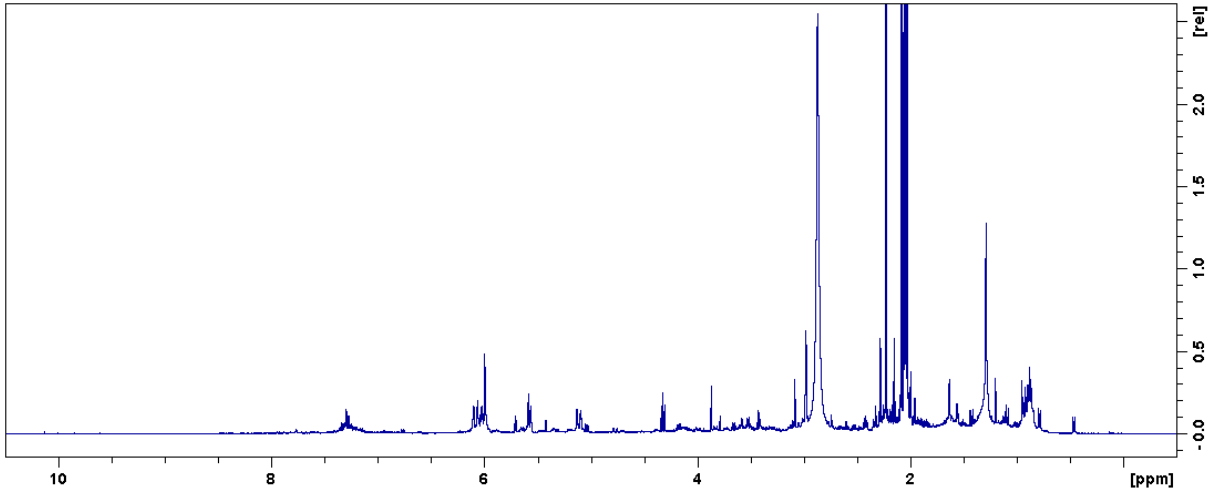


FIGURA B.7 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 7.

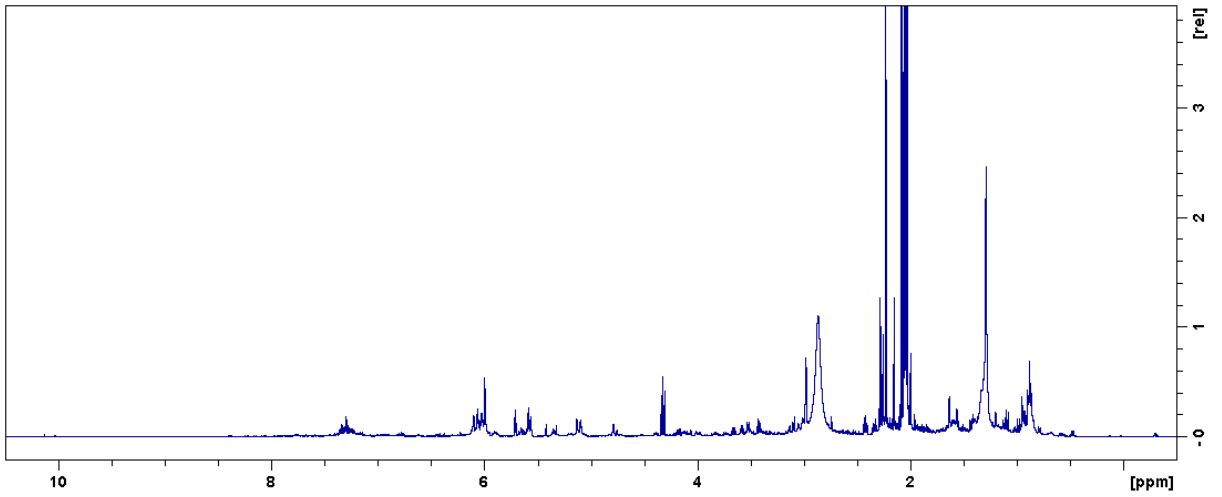


FIGURA B.8 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 8.

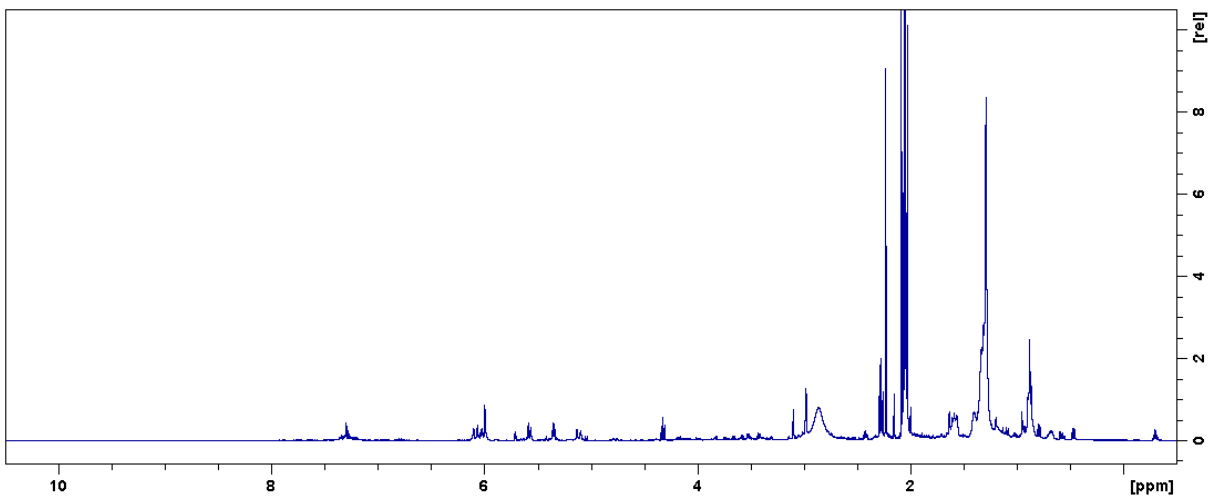


FIGURA B.9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 9.

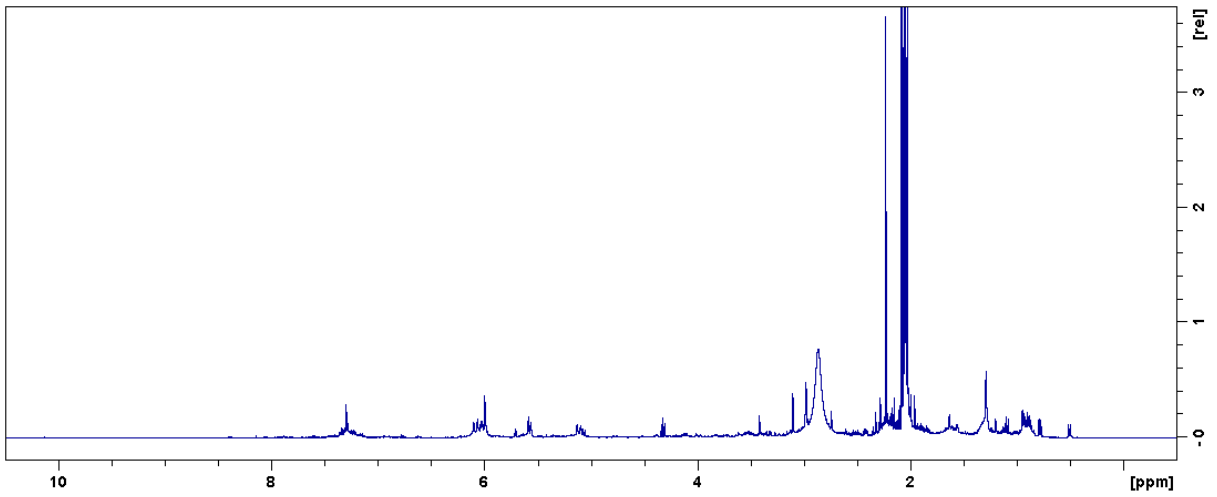


FIGURA B.10 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 10.

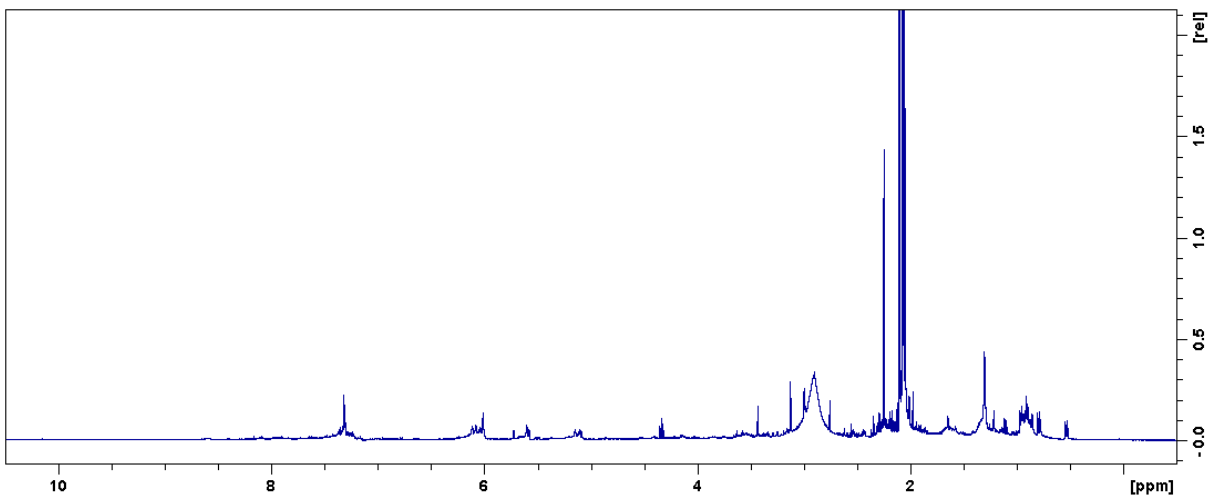


FIGURA B.11 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 11.

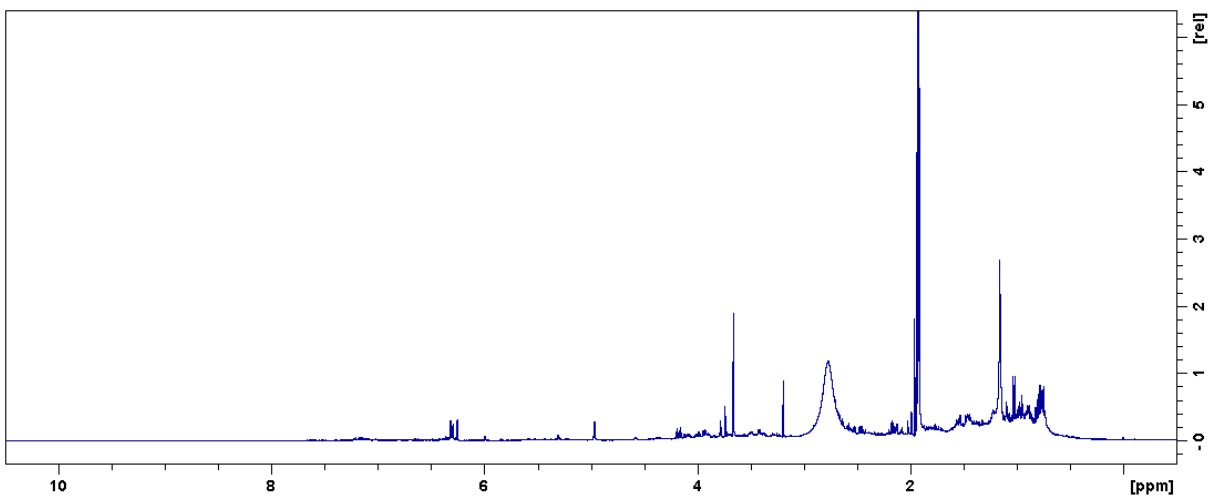


FIGURA B.12 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 12.

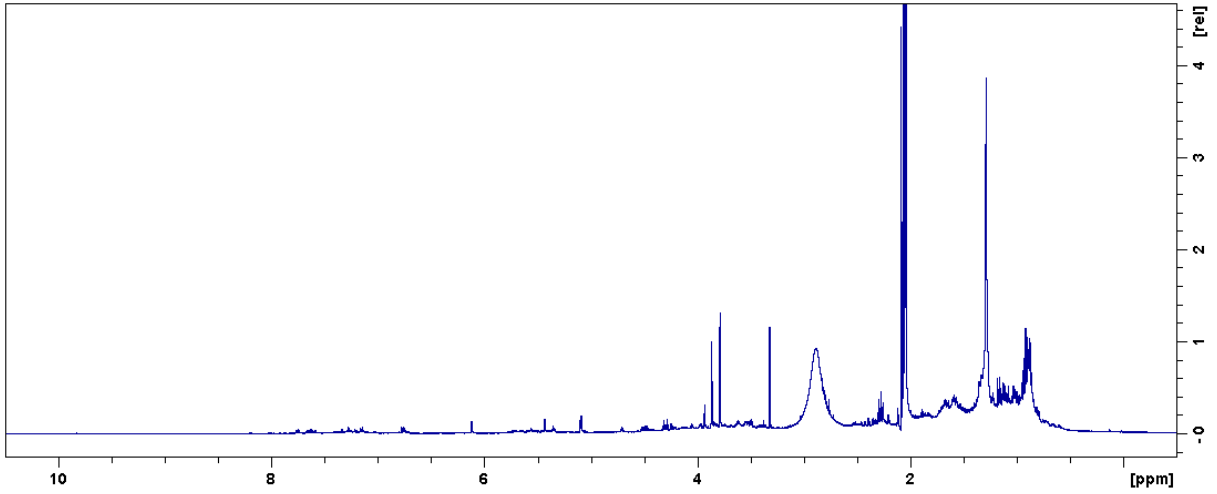


FIGURA B.13 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do extrato 13.

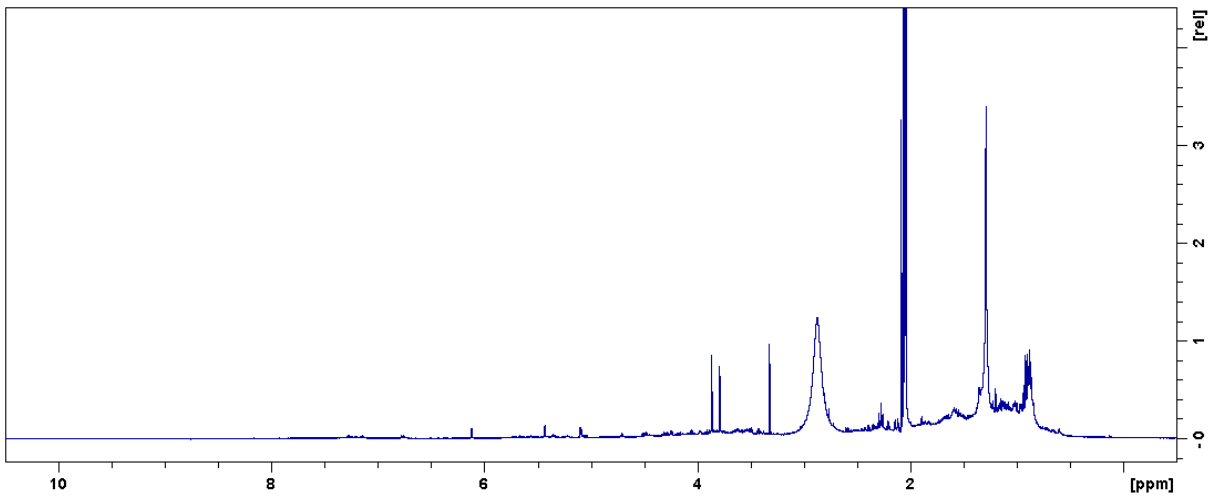


FIGURA B.14 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do extrato 14.

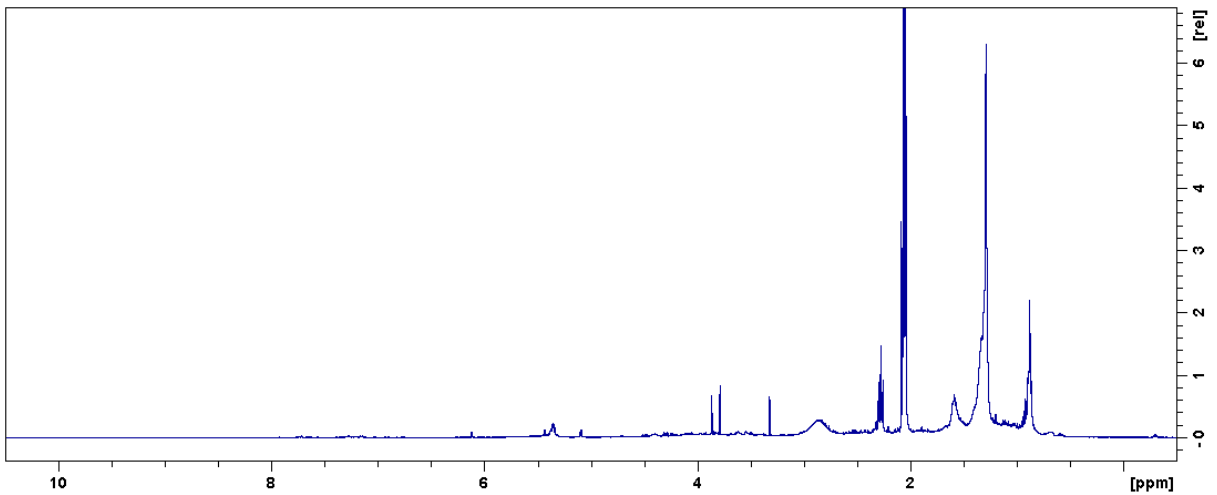


FIGURA B.15 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) do extrato 15.

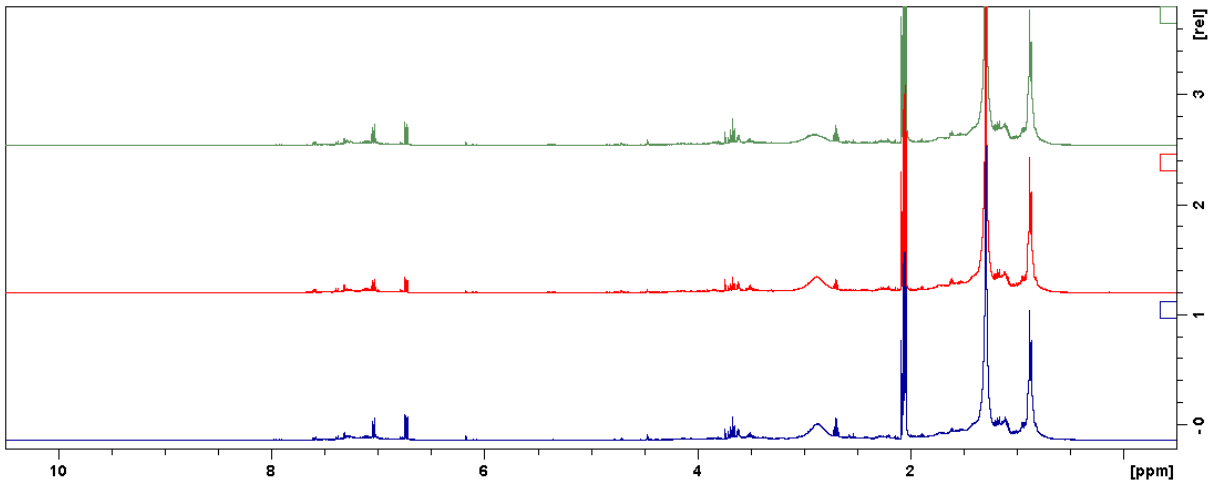


FIGURA B.16 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 16 (replicatas em azul, vermelho e verde).

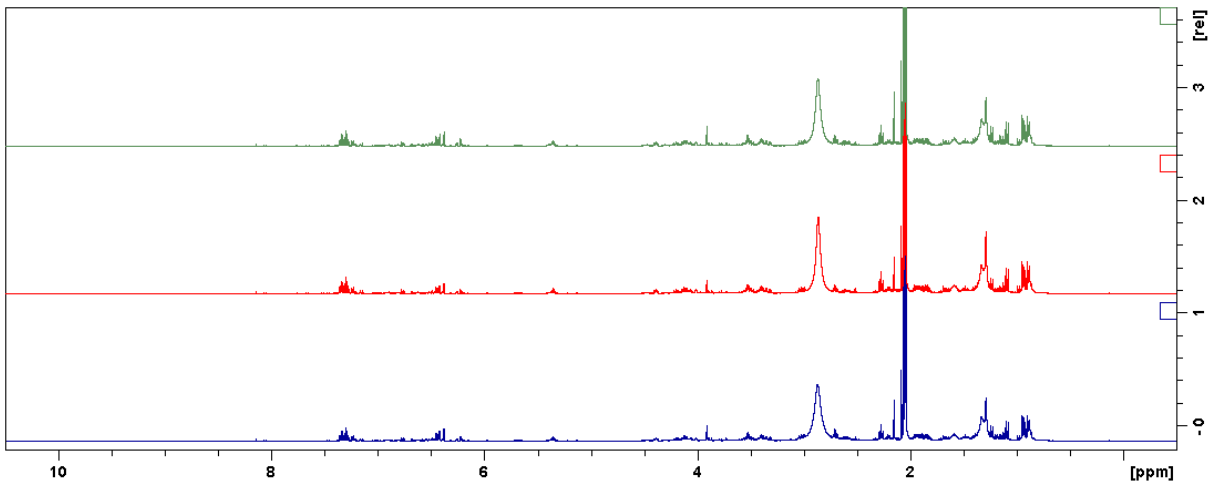


FIGURA B.17 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 17 (replicatas em azul, vermelho e verde).

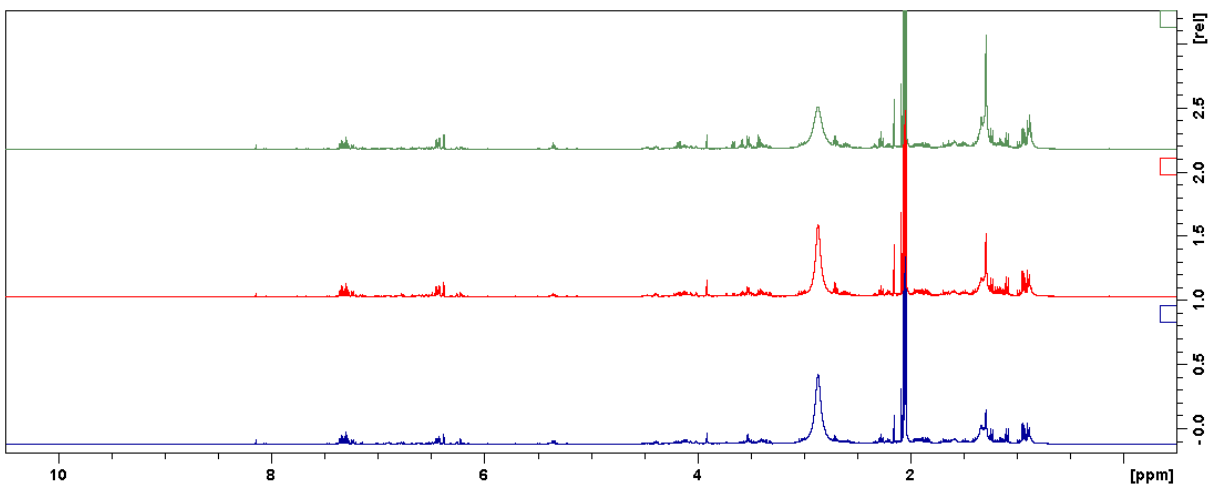


FIGURA B.18 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 18 (replicatas em azul, vermelho e verde).

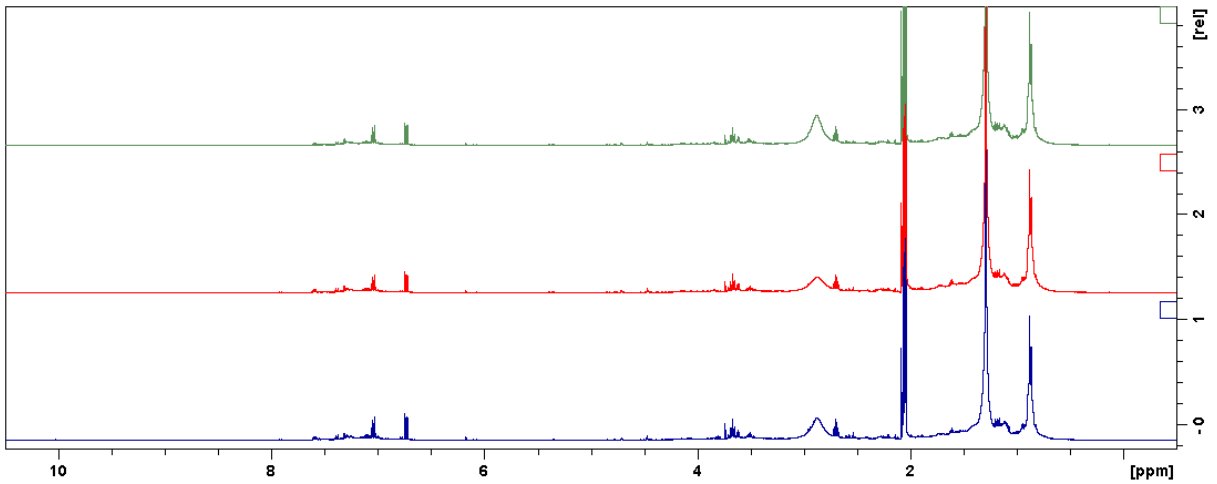


FIGURA B.19 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 19 (replicatas em azul, vermelho e verde).

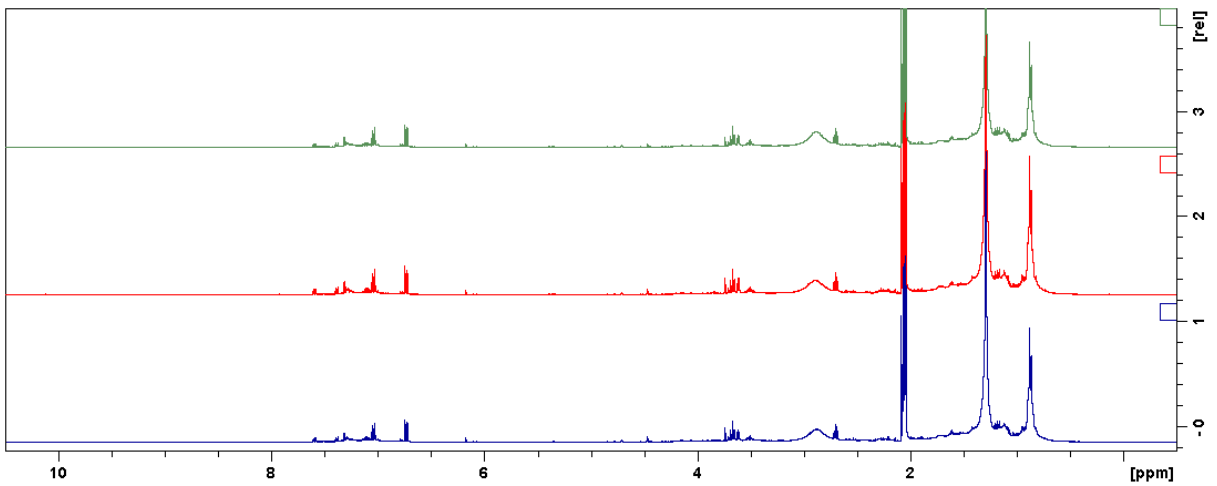


FIGURA B.20 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 20 (replicatas em azul, vermelho e verde).

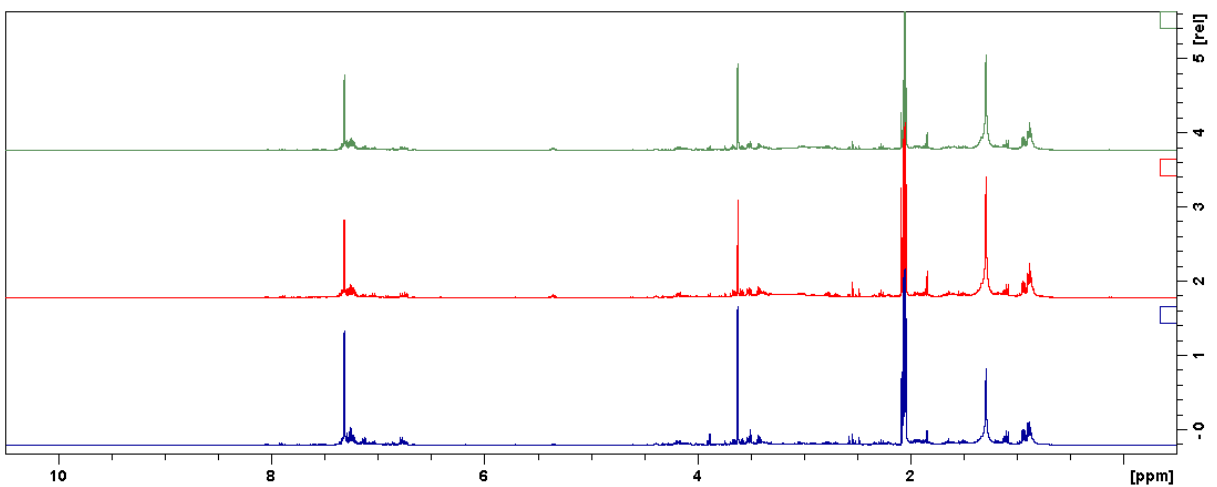


FIGURA B.21 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 21 (replicatas em azul, vermelho e verde).

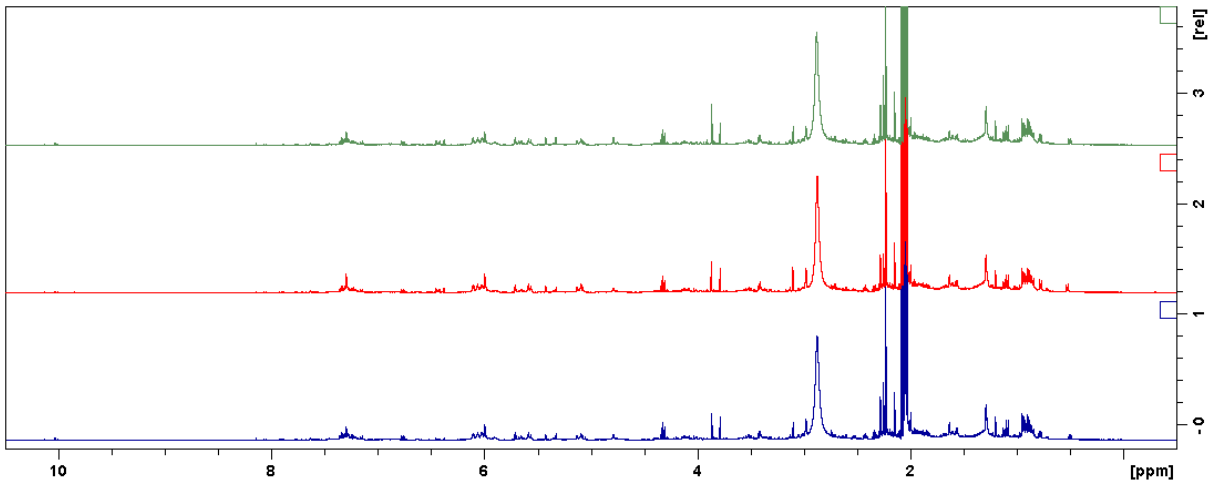


FIGURA B.22 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 22 (replicatas em azul, vermelho e verde).

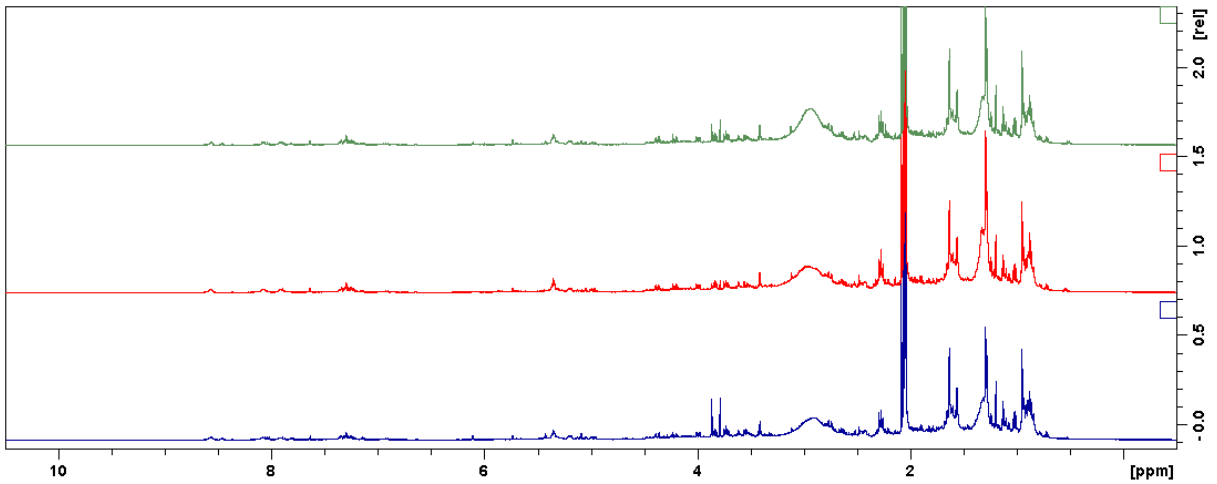


FIGURA B.23 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 23 (replicatas em azul, vermelho e verde).

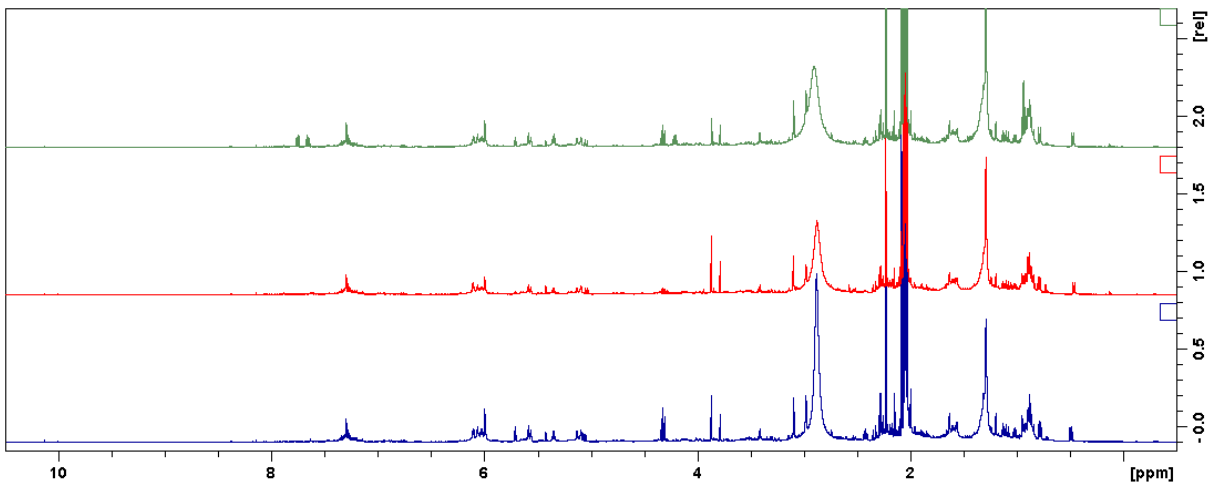


FIGURA B.24 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 24 (replicatas em azul, vermelho e verde).

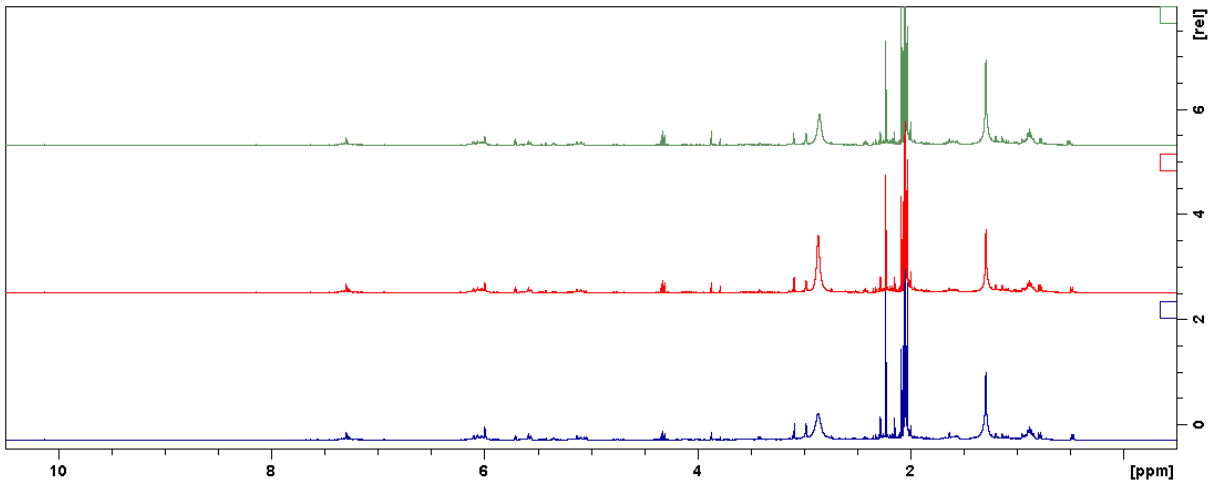


FIGURA B.25 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 25 (replicatas em azul, vermelho e verde).

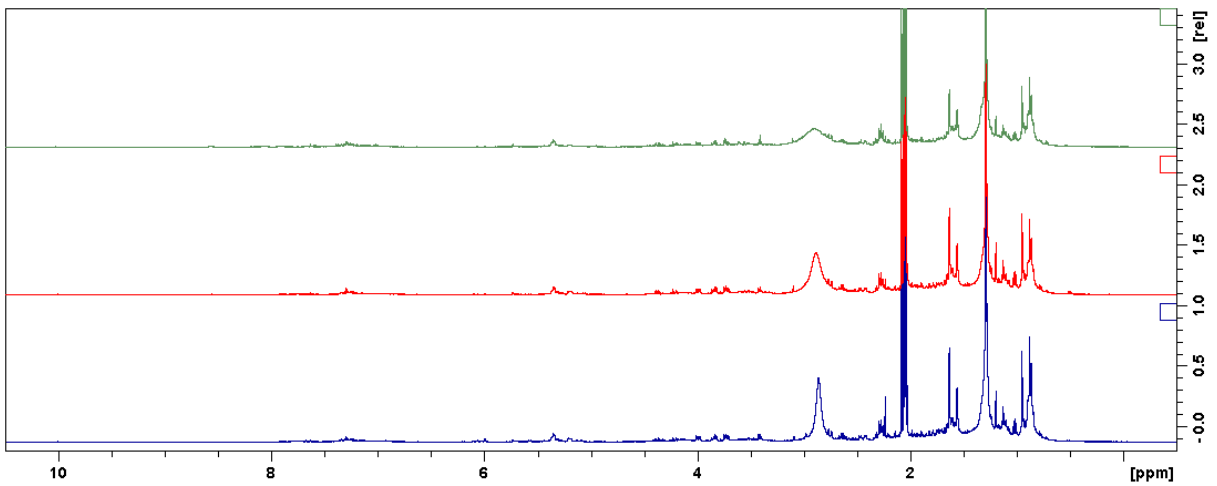


FIGURA B.26 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 26 (replicatas em azul, vermelho e verde).

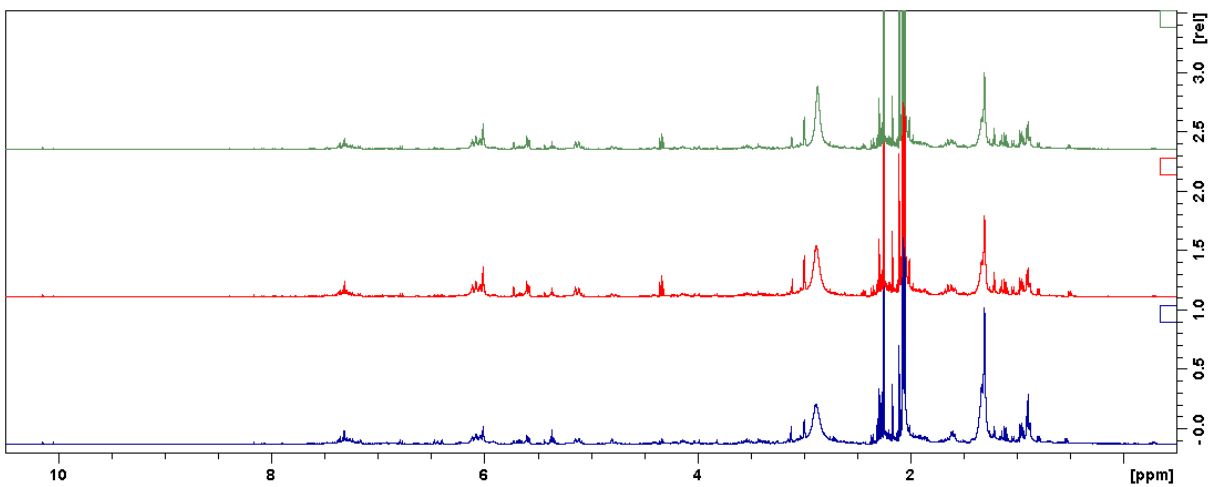


FIGURA B.27 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 27 (replicatas em azul, vermelho e verde).

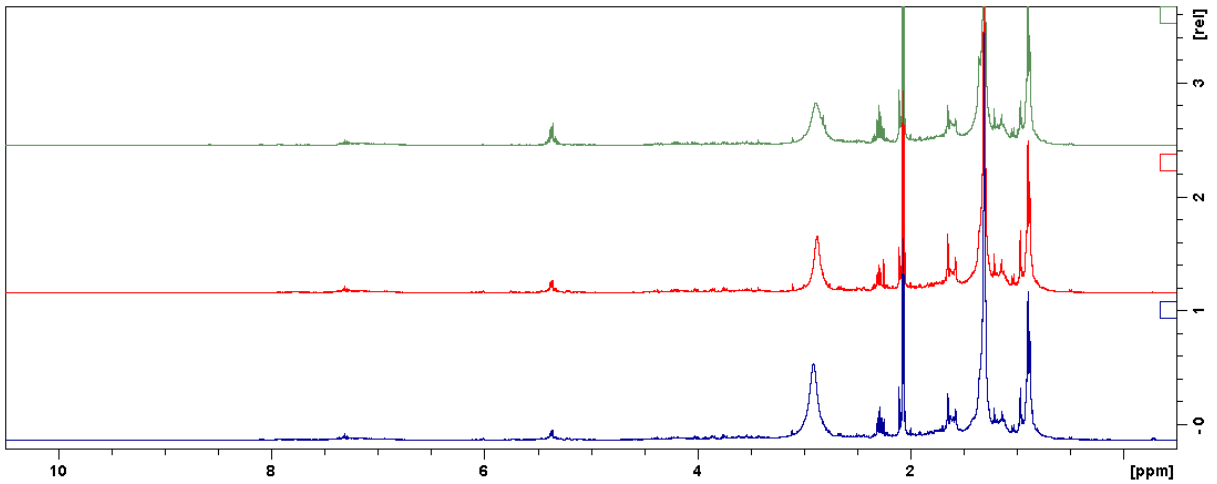


FIGURA B.28 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 28 (replicatas em azul, vermelho e verde).

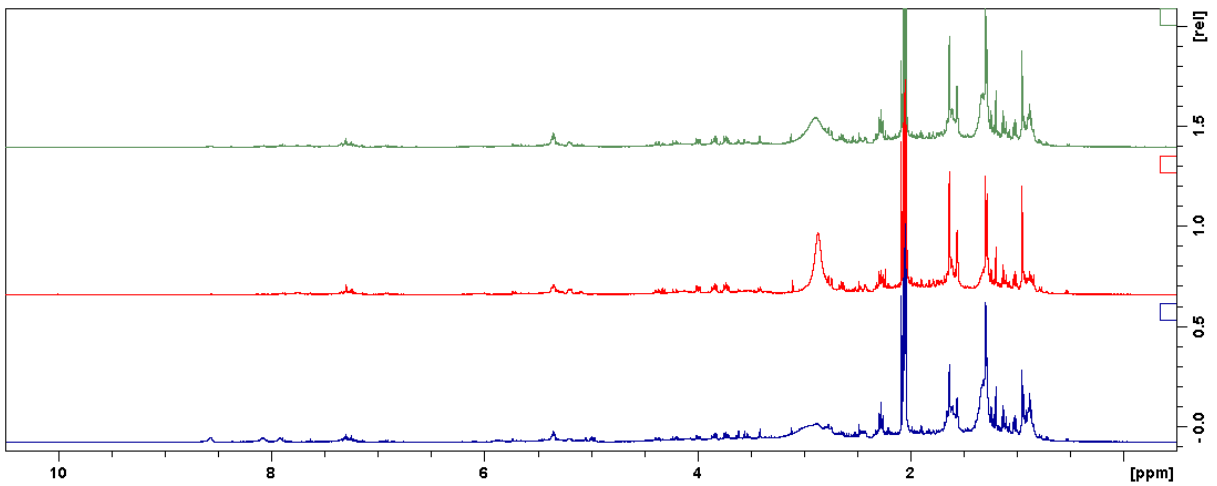


FIGURA B.29 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 29 (replicatas em azul, vermelho e verde).

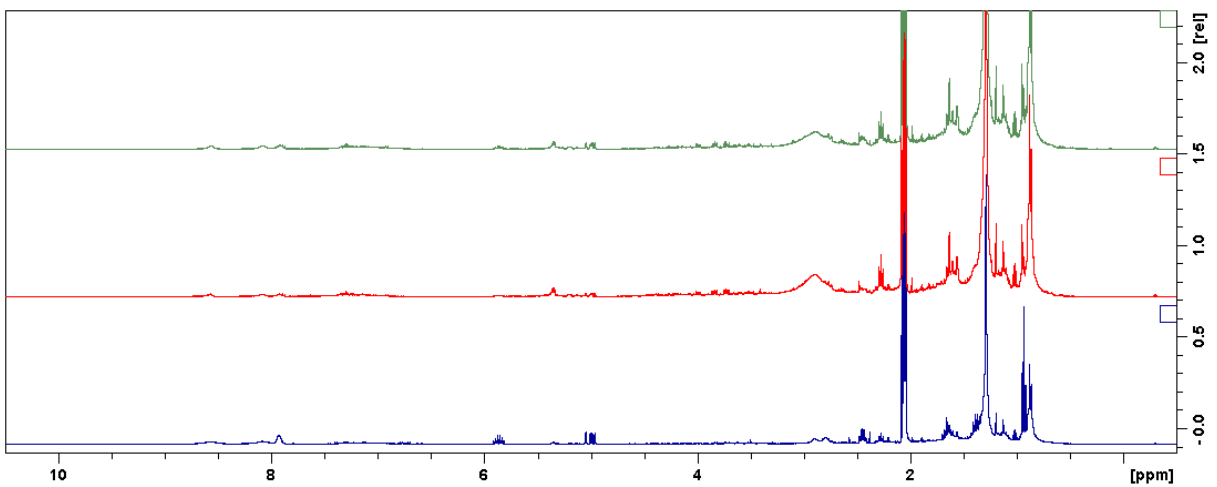


FIGURA B.30 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 30 (replicatas em azul, vermelho e verde).

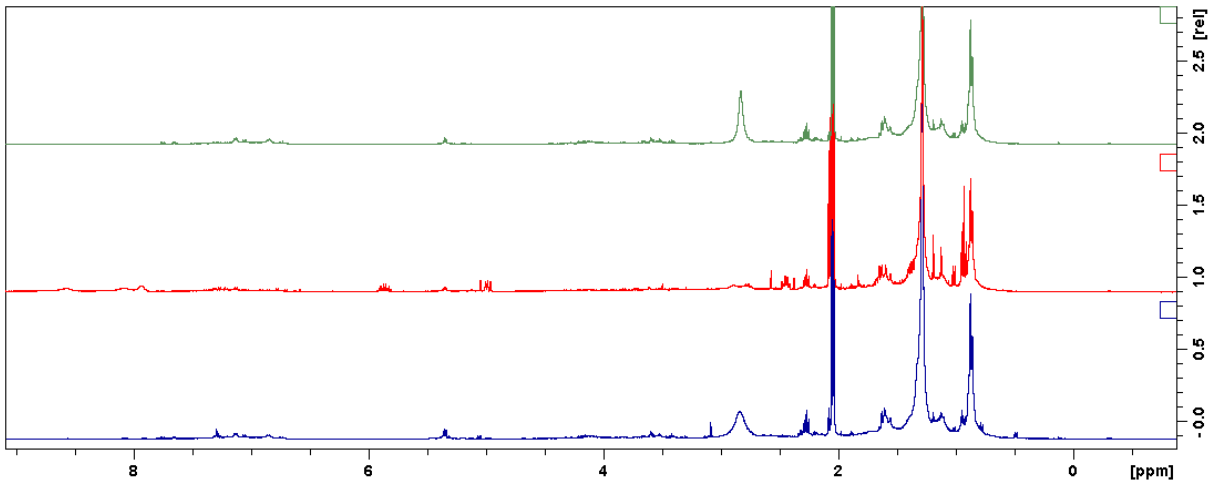


FIGURA B.31 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 31 (replicatas em azul, vermelho e verde).

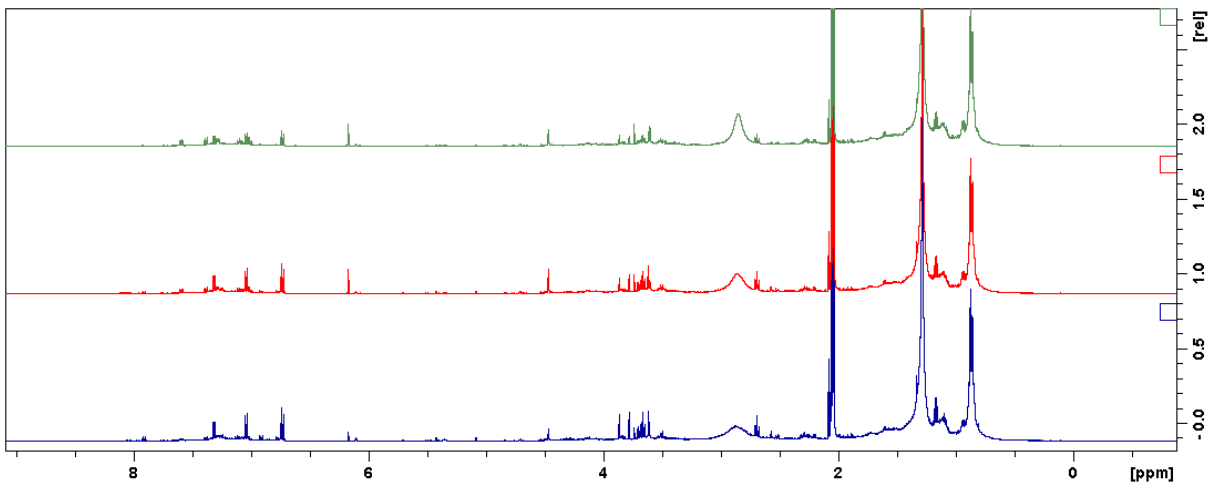


FIGURA B.32 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 32 (replicatas em azul, vermelho e verde).

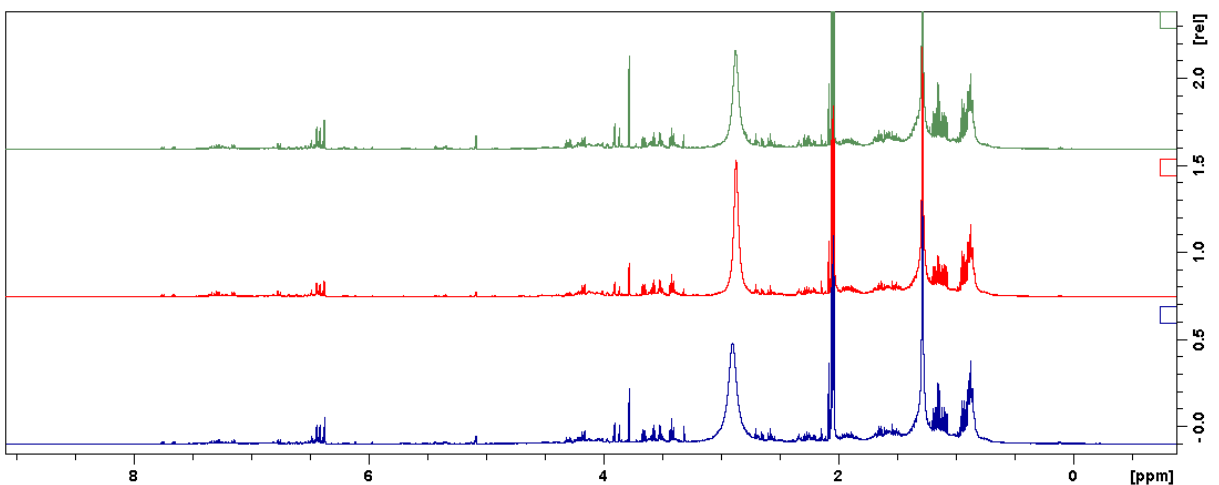


FIGURA B.33 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 33 (replicatas em azul, vermelho e verde).

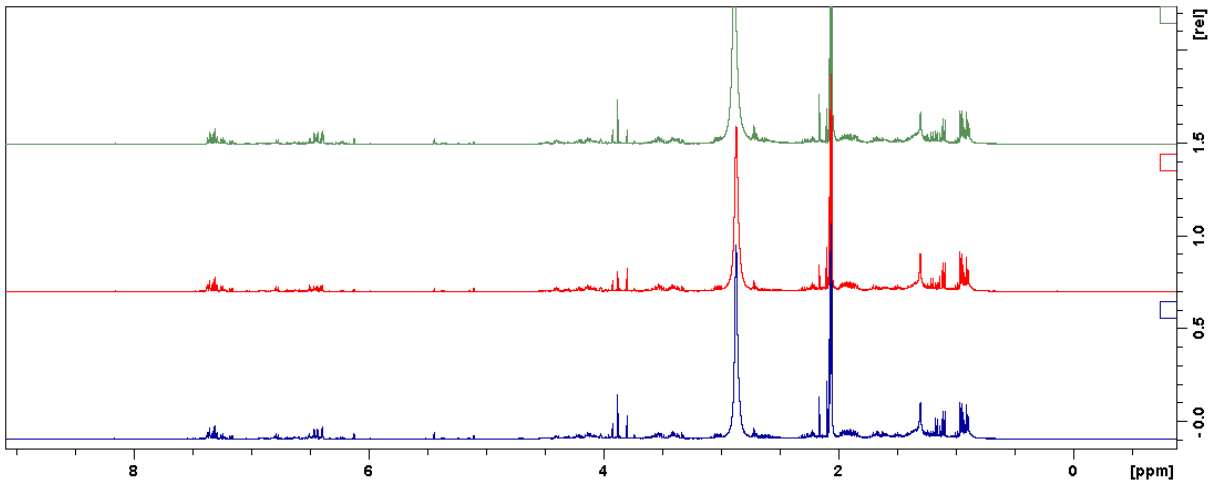


FIGURA B.34 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 34 (replicatas em azul, vermelho e verde).

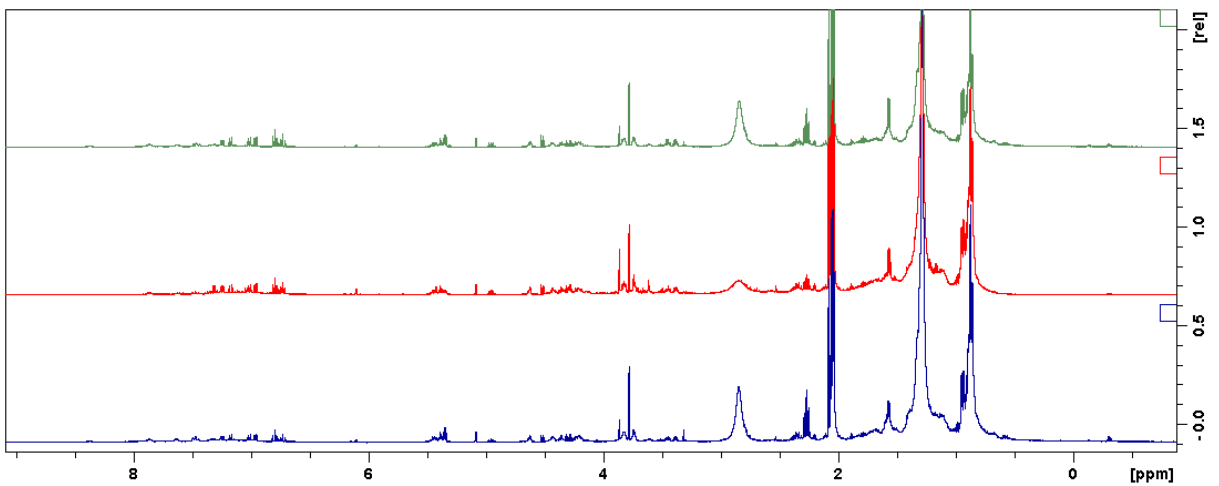


FIGURA B.35 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 35 (replicatas em azul, vermelho e verde).

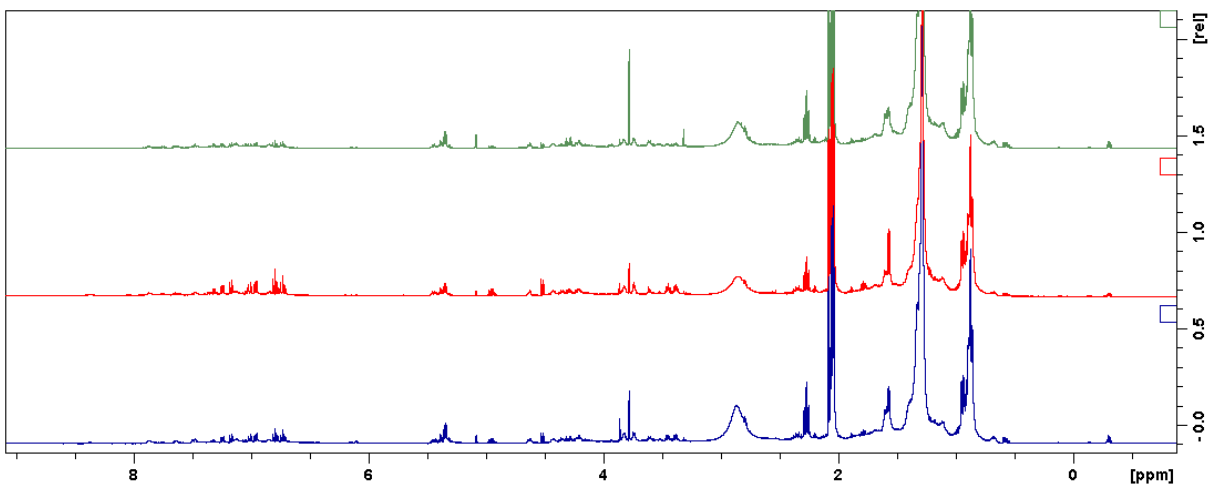


FIGURA B.36 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 36 (replicatas em azul, vermelho e verde).

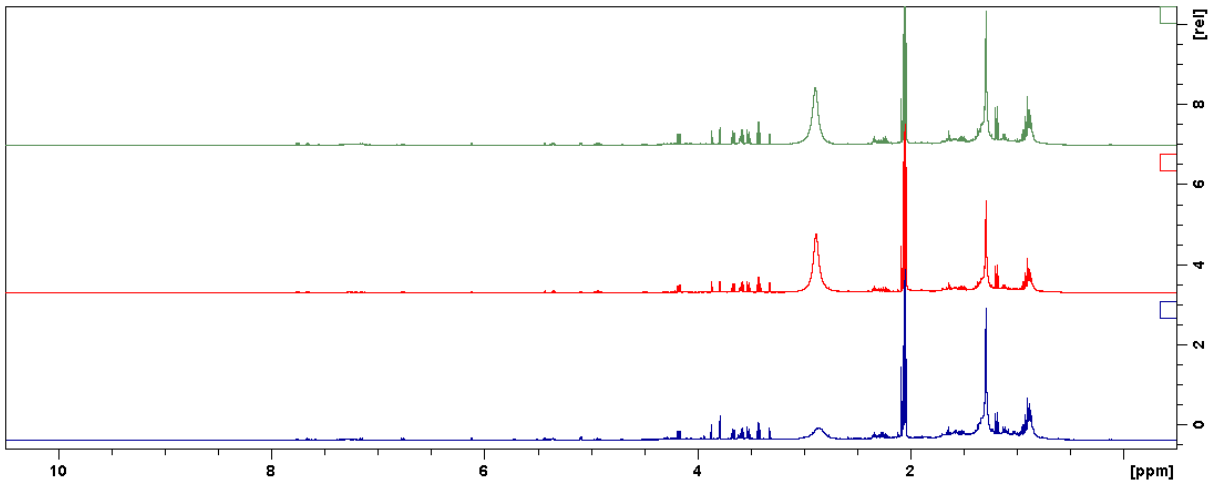


FIGURA B.37 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 37 (replicatas em azul, vermelho e verde).

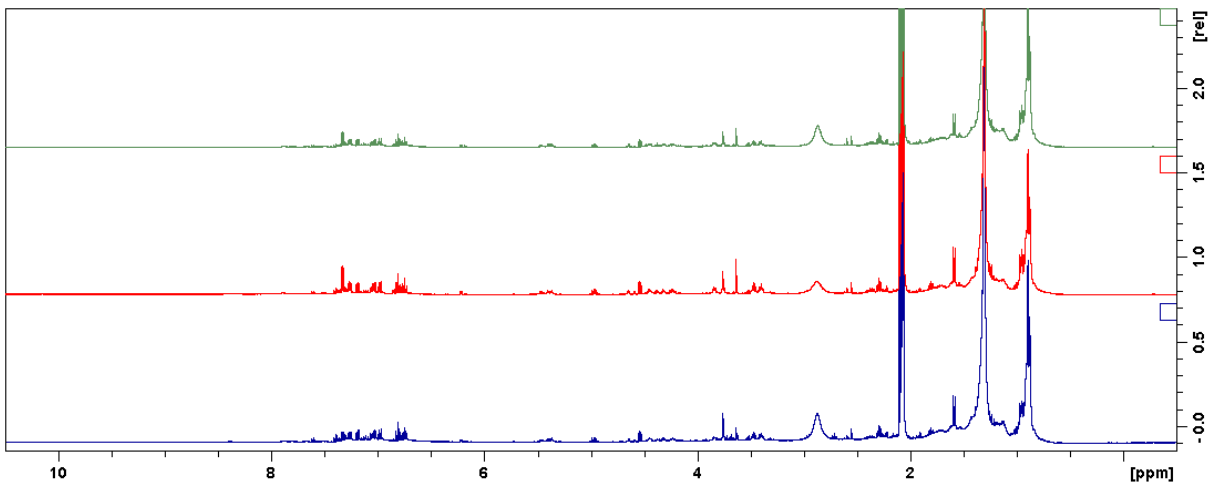


FIGURA B.38 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 38 (replicatas em azul, vermelho e verde).

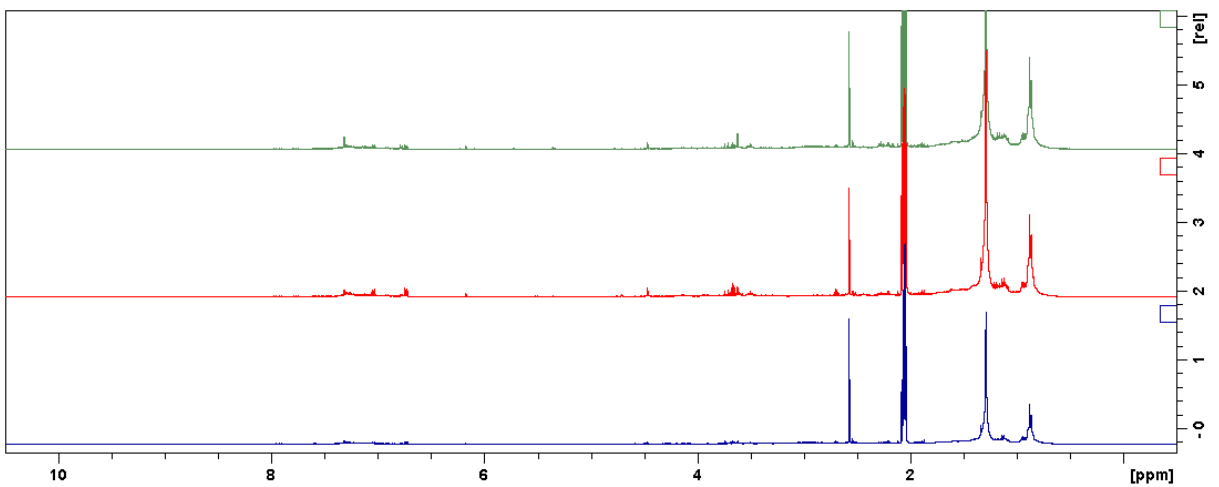


FIGURA B.39 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 39 (replicatas em azul, vermelho e verde).

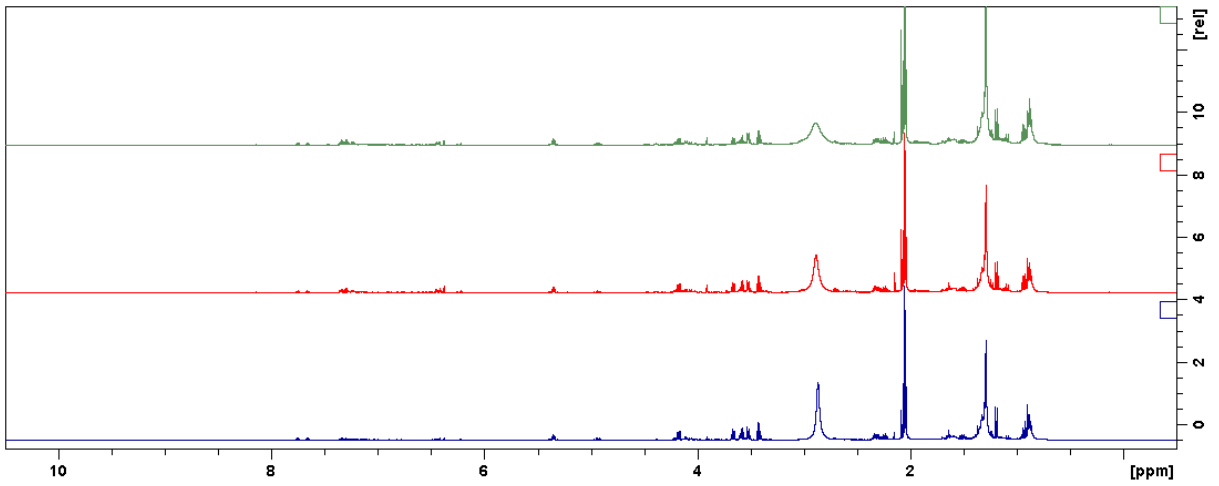


FIGURA B.40 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 40 (replicatas em azul, vermelho e verde).

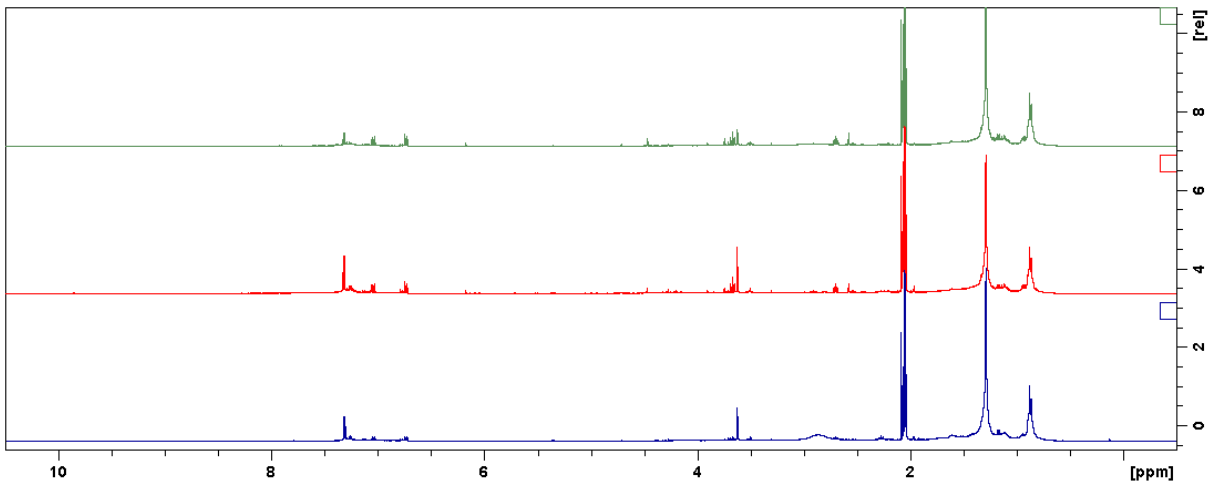


FIGURA B.41 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 41 (replicatas em azul, vermelho e verde).

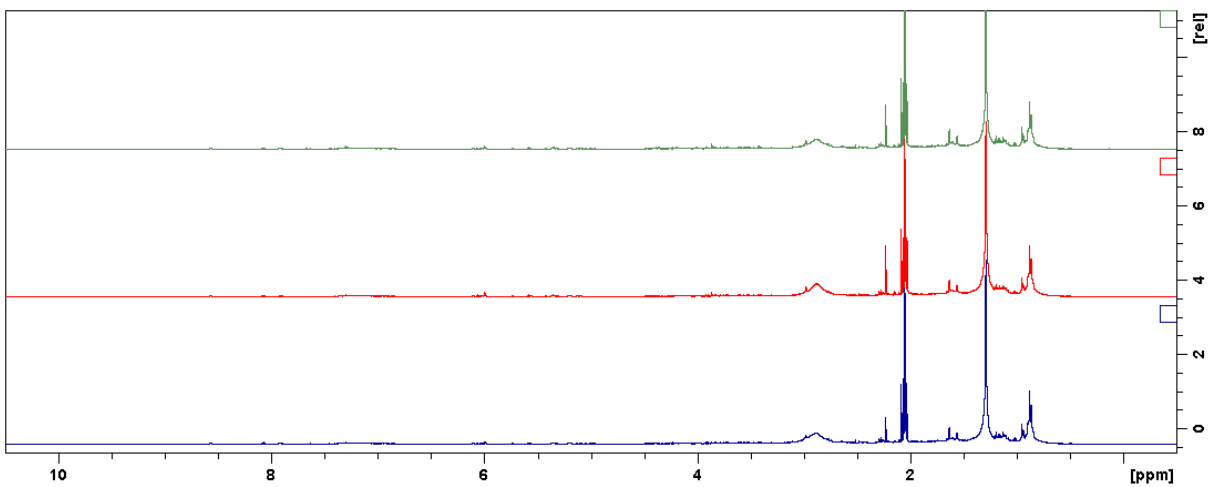


FIGURA B.42 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 42 (replicatas em azul, vermelho e verde).

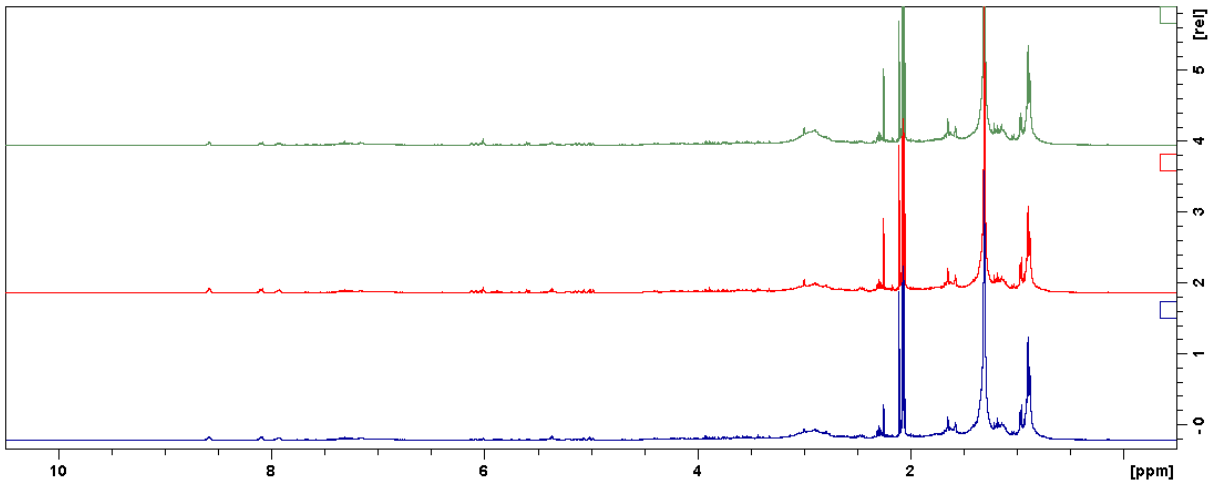


FIGURA B.43 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 43 (replicatas em azul, vermelho e verde).

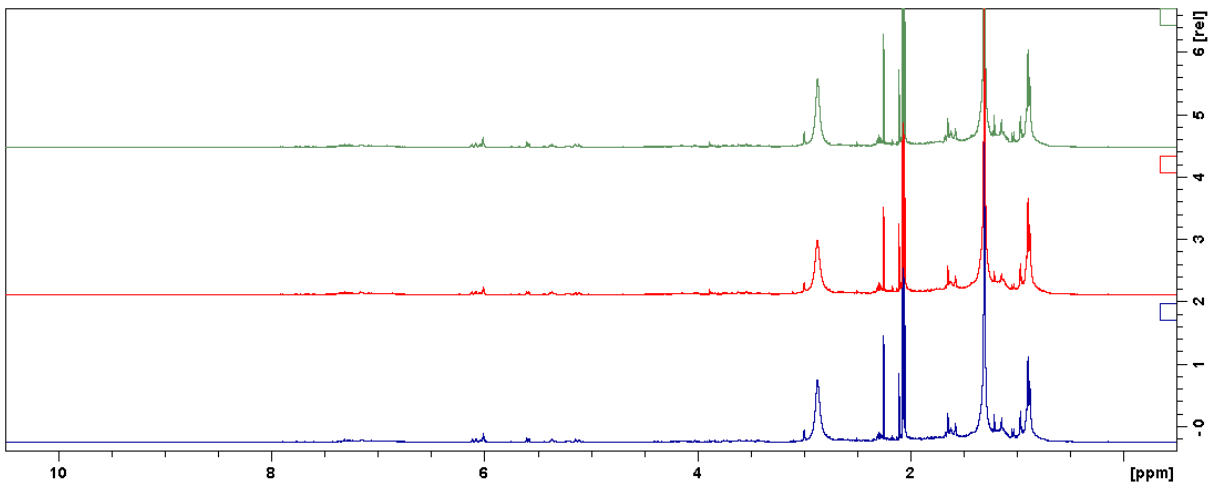


FIGURA B.44 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 44 (replicatas em azul, vermelho e verde).

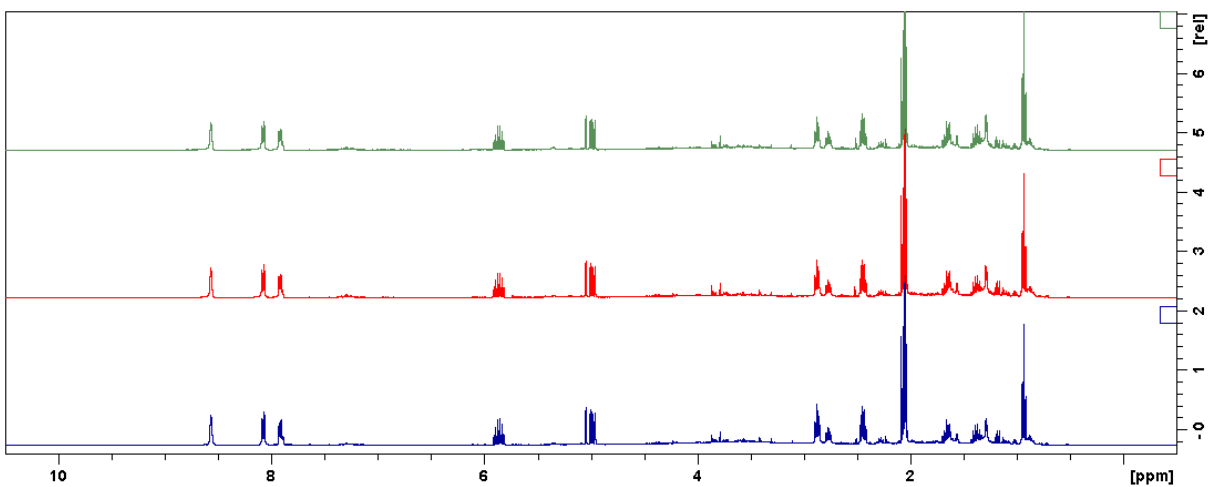


FIGURA B.45 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 45 (replicatas em azul, vermelho e verde).

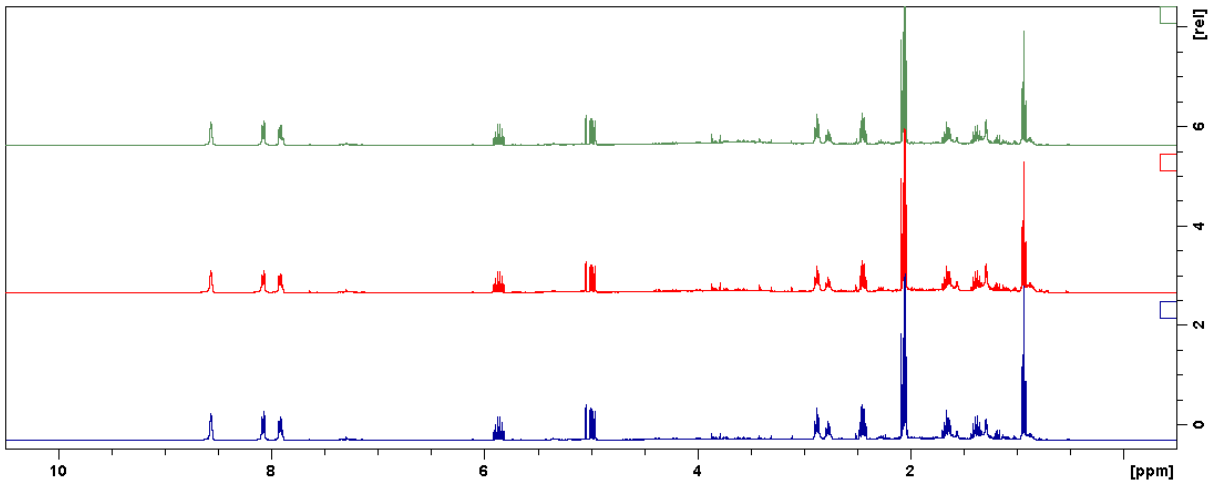


FIGURA B.46 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 46 (replicatas em azul, vermelho e verde).

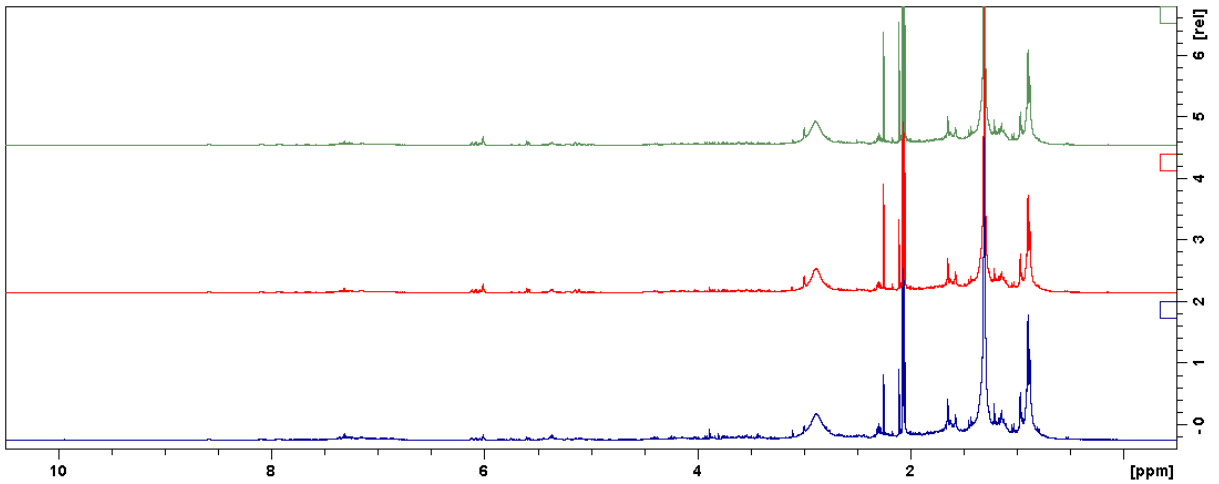


FIGURA B.47 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 47 (replicatas em azul, vermelho e verde).

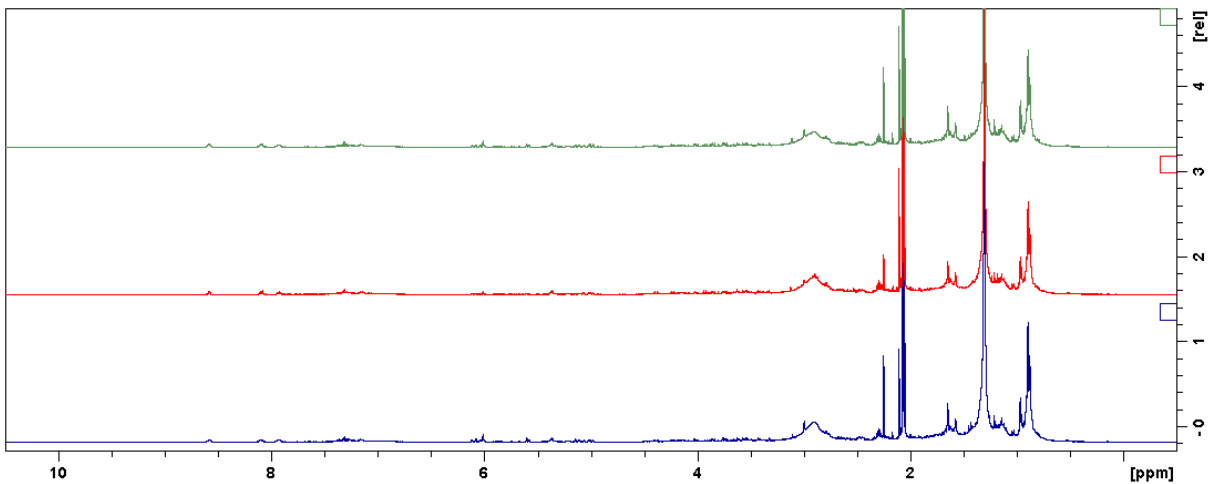


FIGURA B.48 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 48 (replicatas em azul, vermelho e verde).

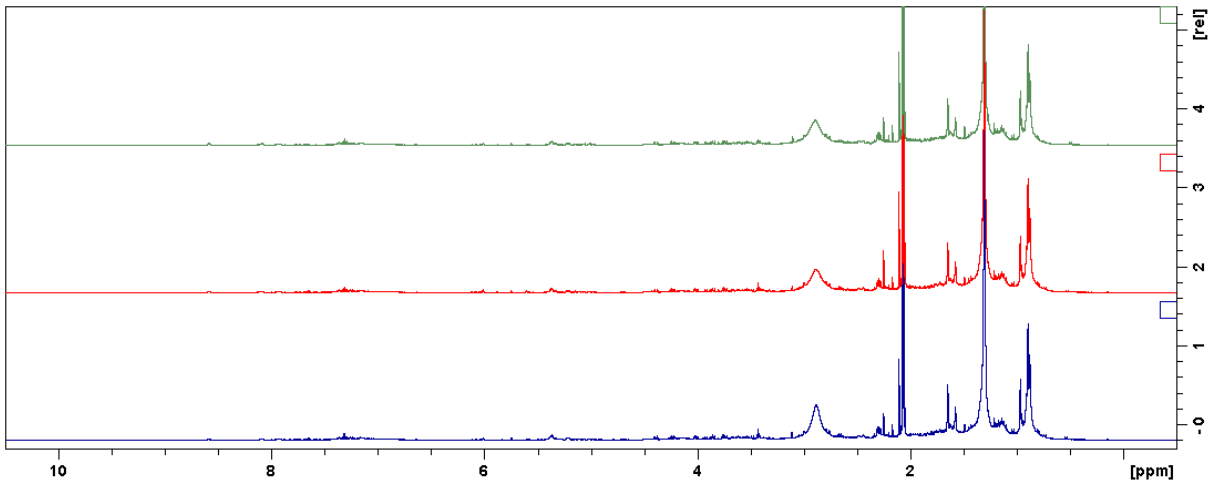


FIGURA B.49 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 49 (replicatas em azul, vermelho e verde).

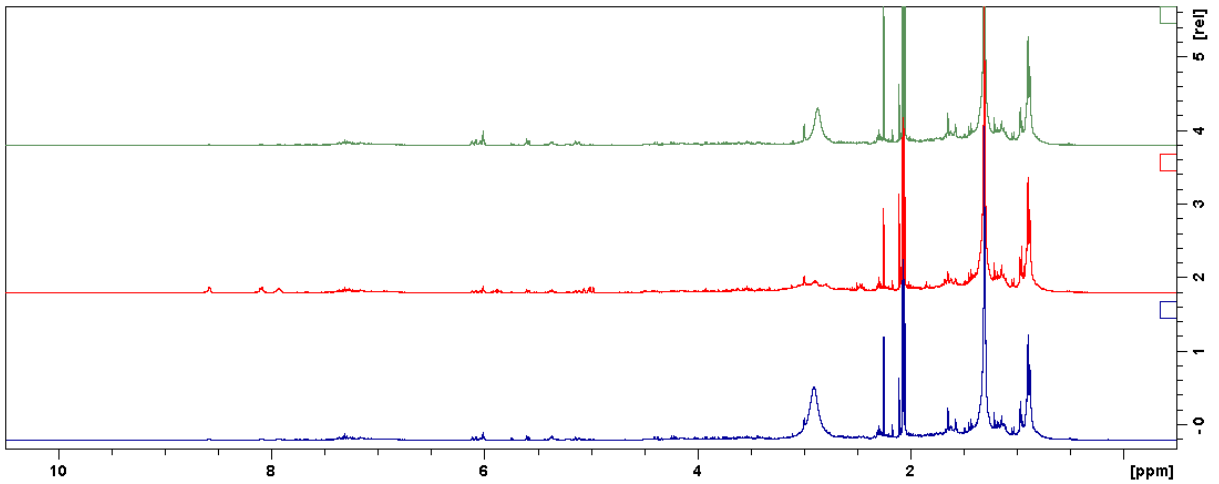


FIGURA B.50 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 50 (replicatas em azul, vermelho e verde).

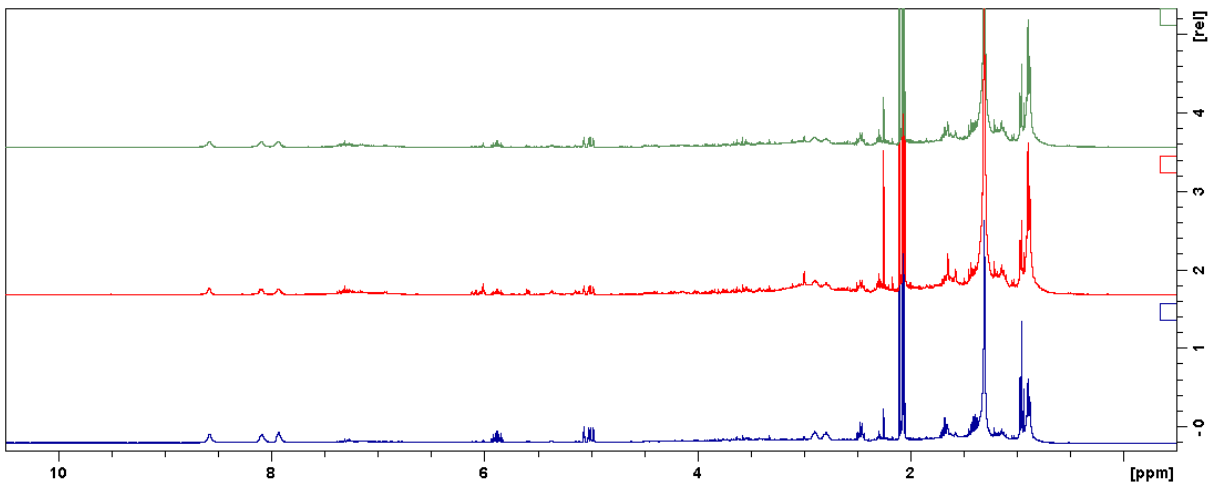


FIGURA B.51 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 51 (replicatas em azul, vermelho e verde).

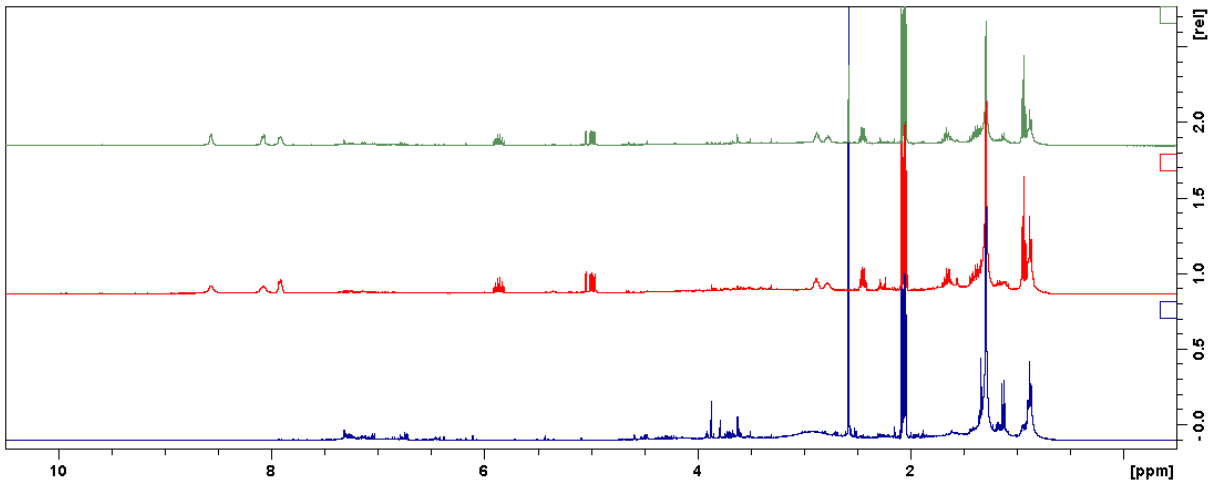


FIGURA B.52 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 52 (replicatas em azul, vermelho e verde).

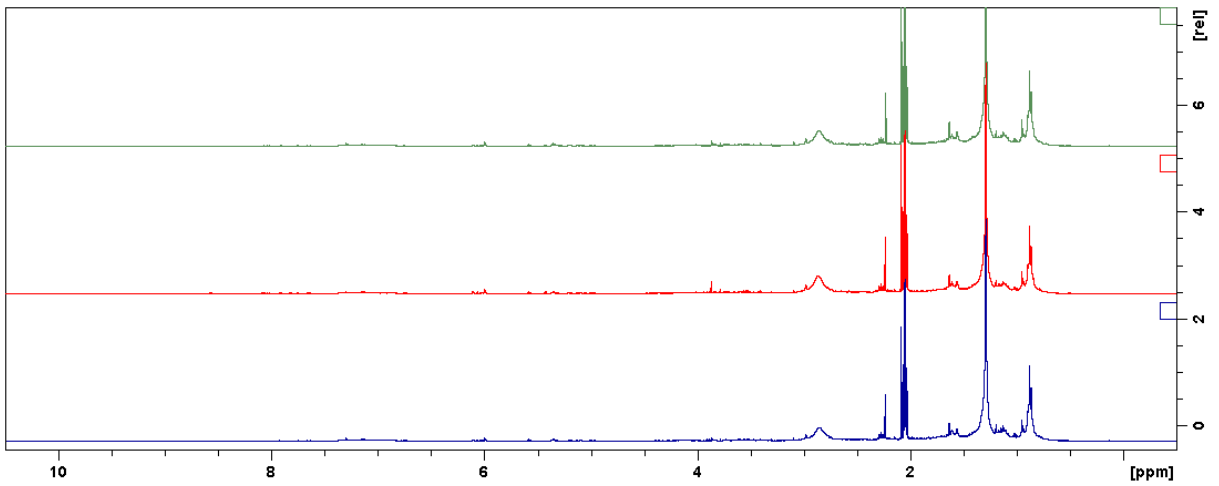


FIGURA B.53 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 53 (replicatas em azul, vermelho e verde).

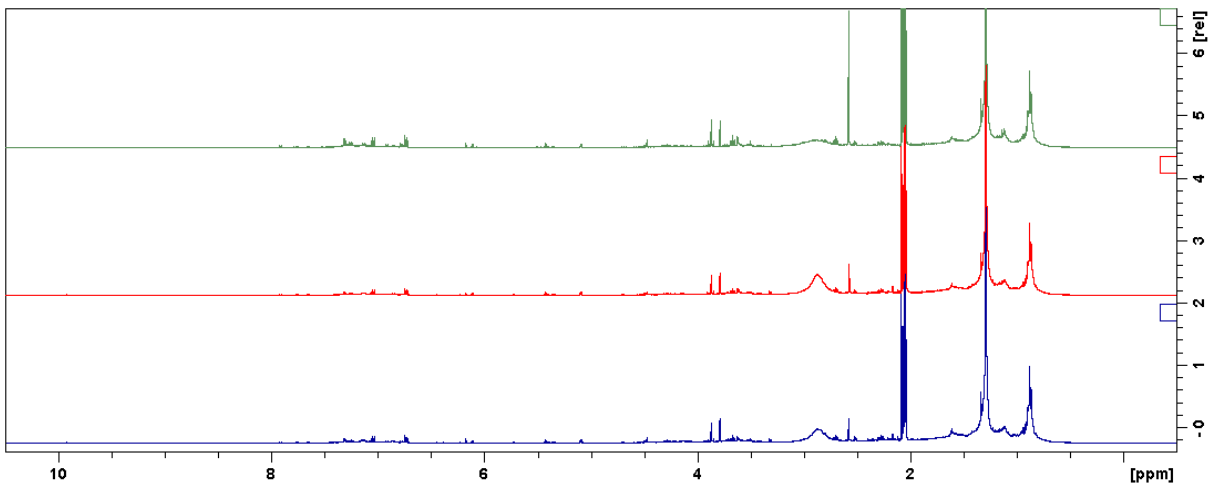


FIGURA B.54 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 54 (replicatas em azul, vermelho e verde).

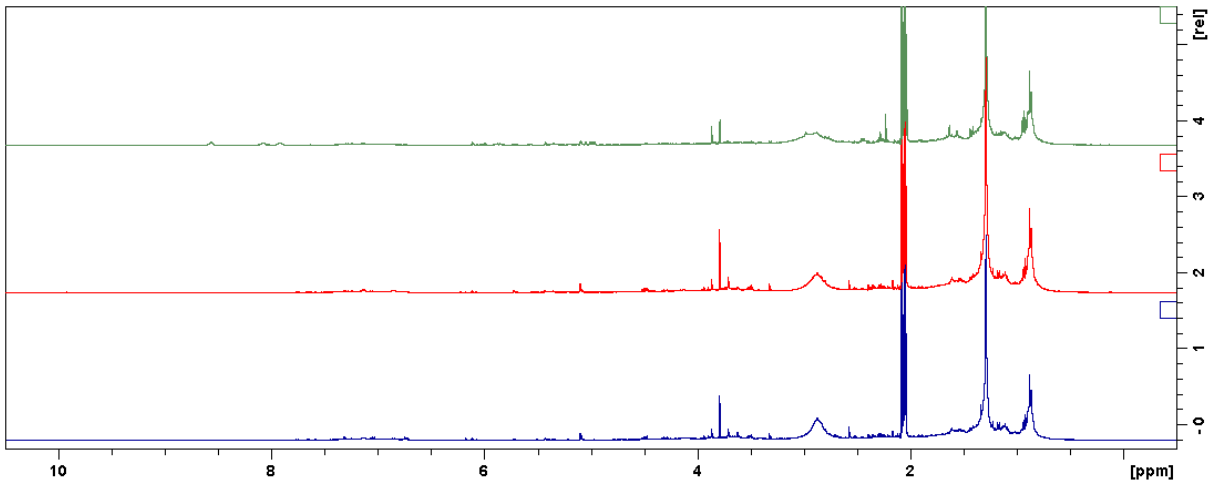


FIGURA B.55 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 55 (replicatas em azul, vermelho e verde).

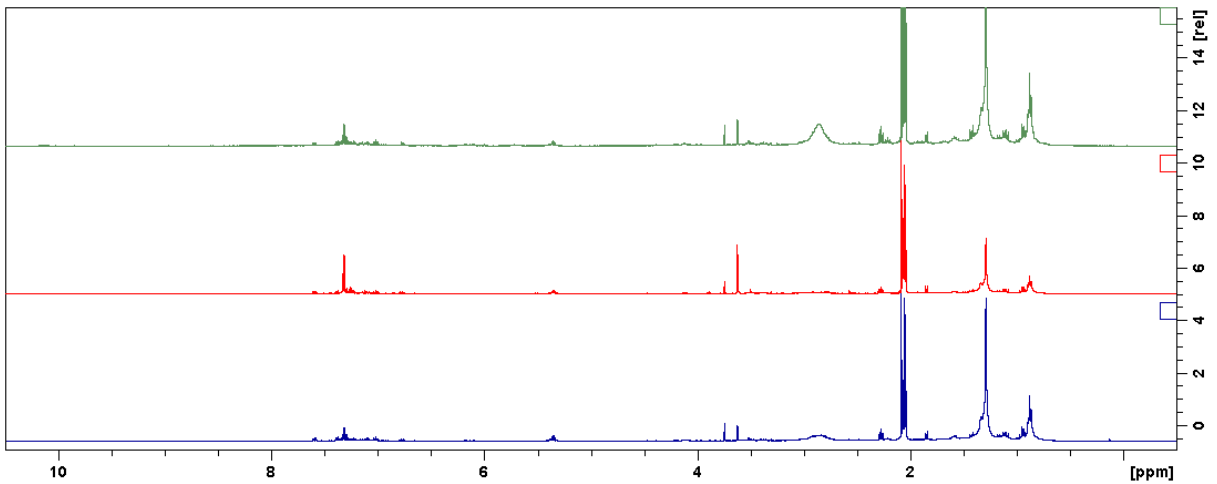


FIGURA B.56 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 56 (replicatas em azul, vermelho e verde).

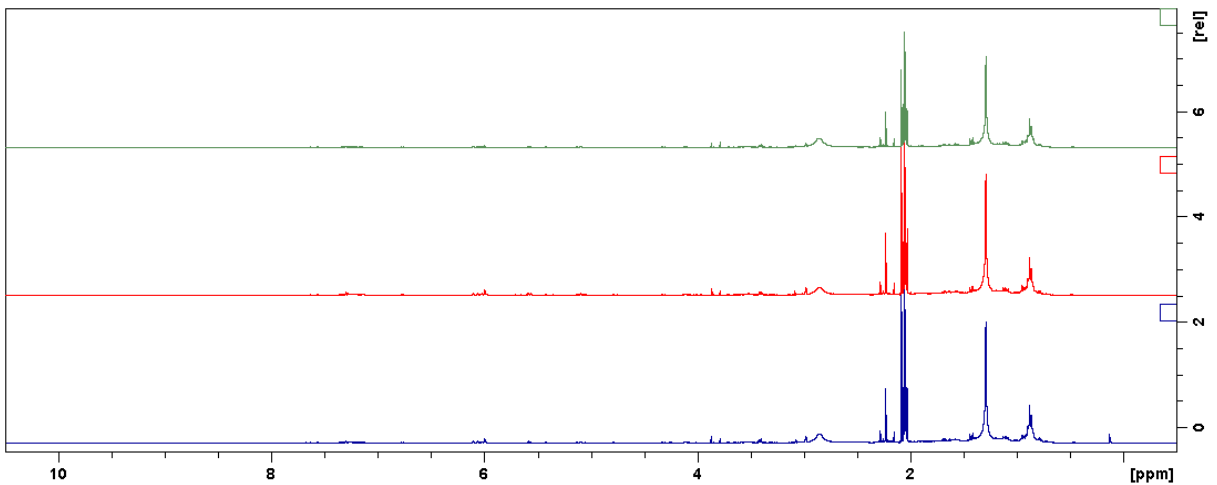


FIGURA B.57 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 57 (replicatas em azul, vermelho e verde).

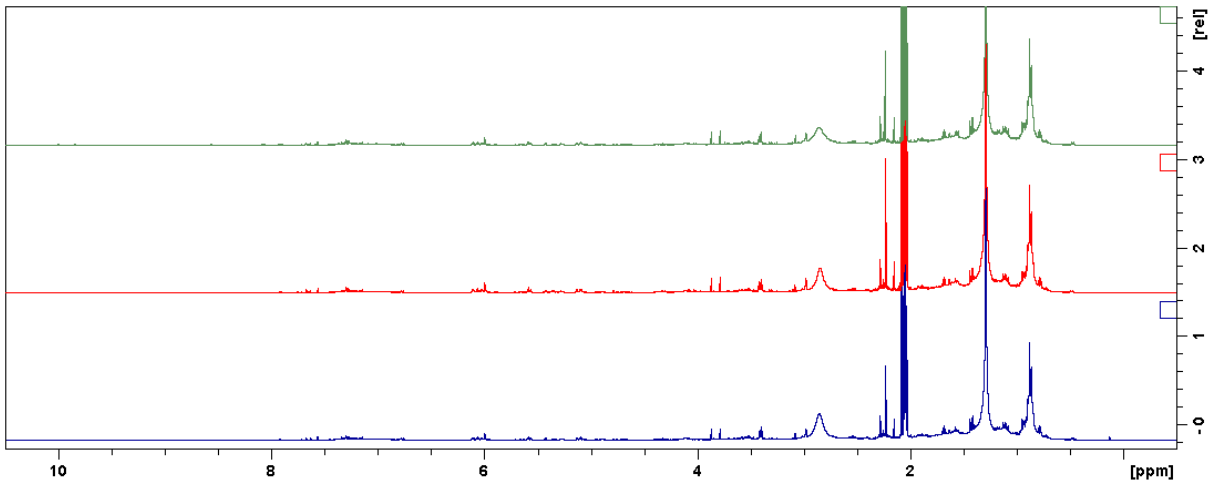


FIGURA B.58 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 58 (replicatas em azul, vermelho e verde).

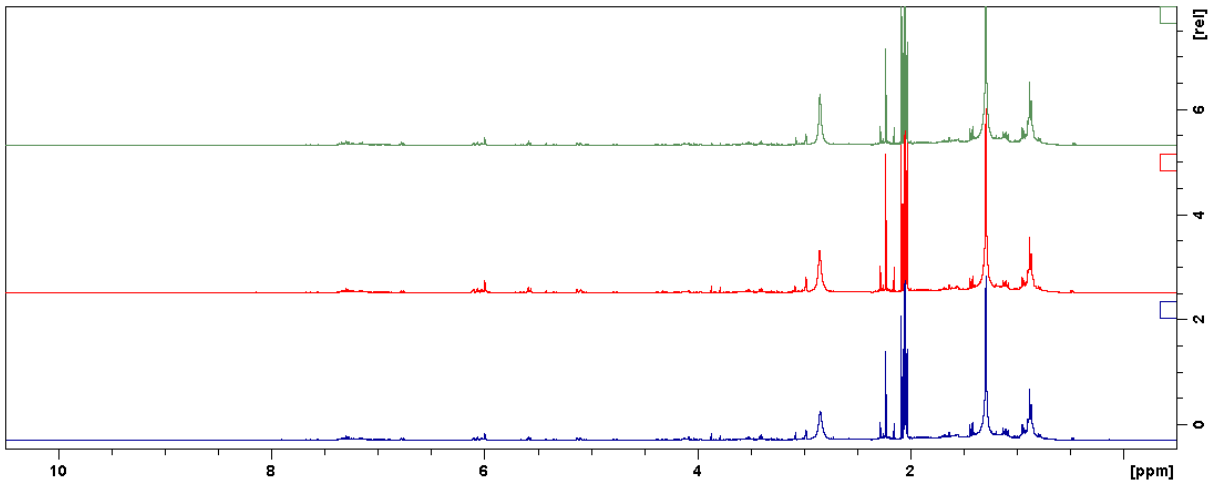


FIGURA B.59 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 59 (replicatas em azul, vermelho e verde).

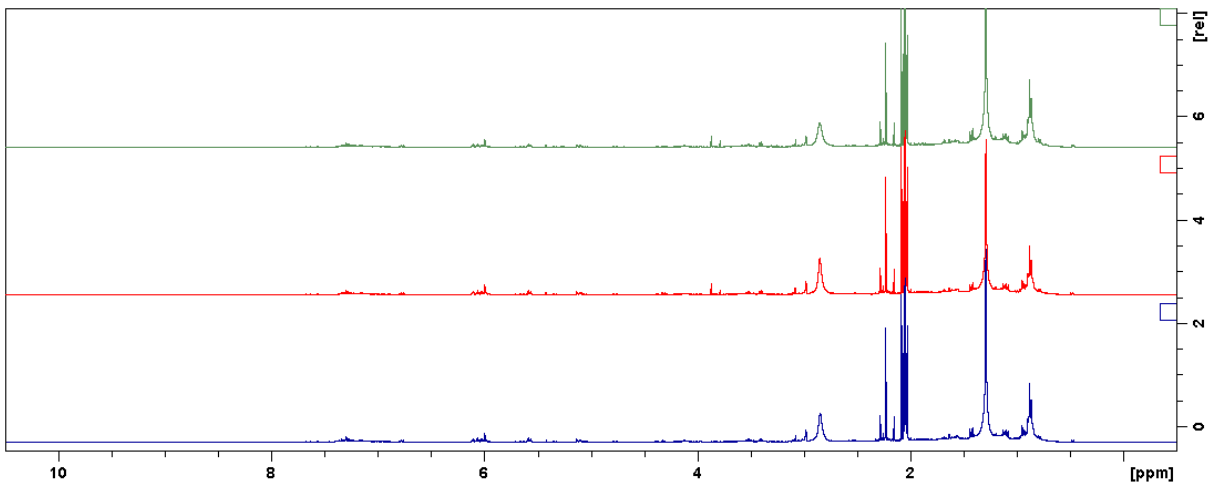


FIGURA B.60 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 60 (replicatas em azul, vermelho e verde).

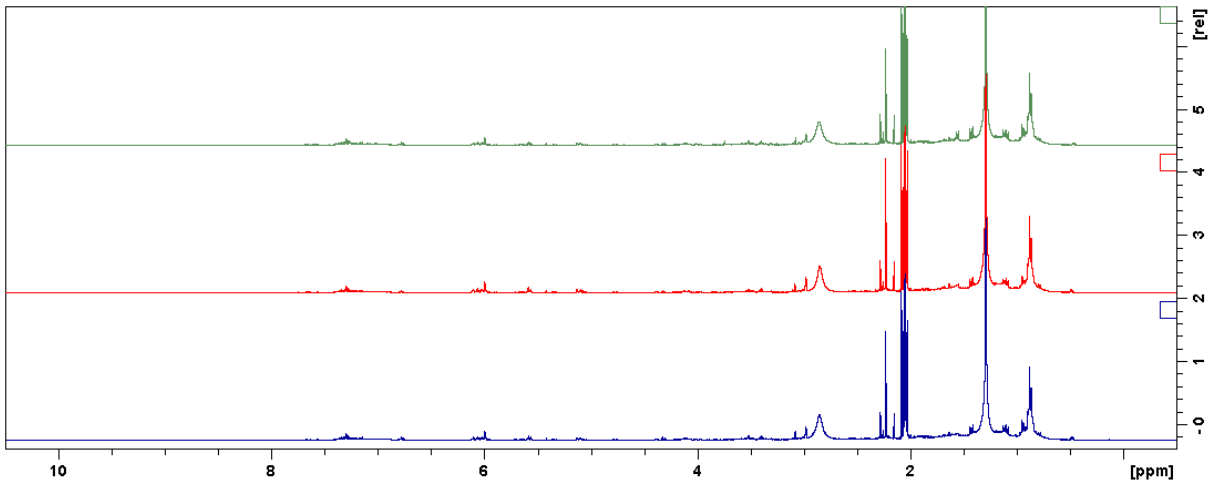


FIGURA B.61 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 61 (replicatas em azul, vermelho e verde).

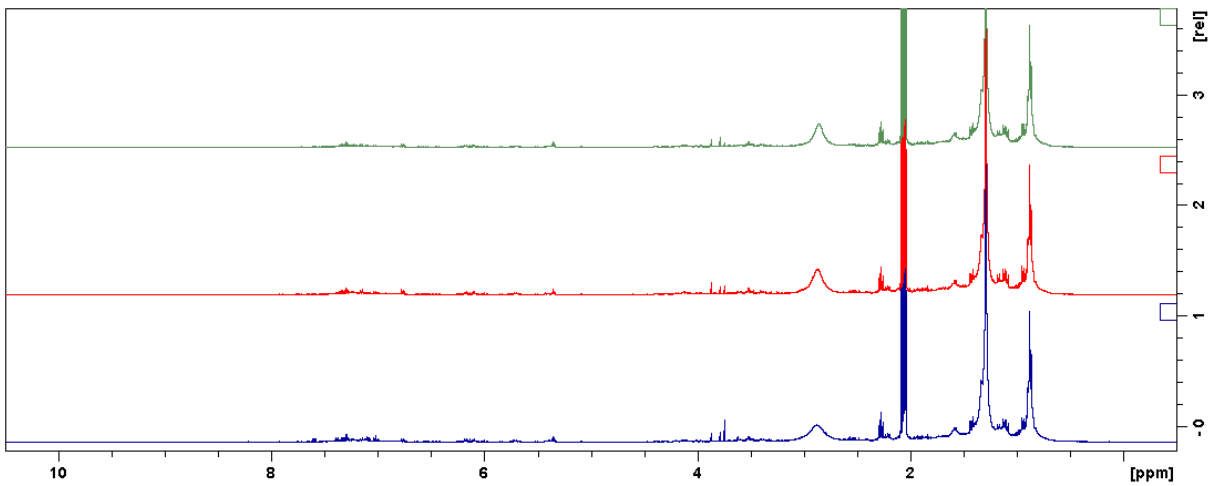


FIGURA B.62 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 62 (replicatas em azul, vermelho e verde).

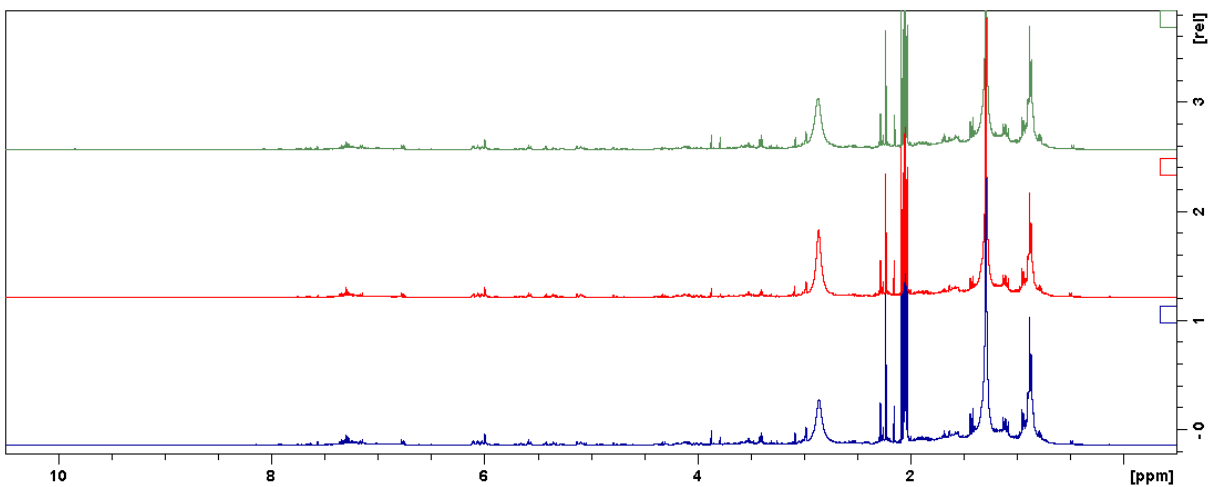


FIGURA B.63 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do extrato 63 (replicatas em azul, vermelho e verde).