



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos  
e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**

**Vitor de Souza Mazucato**

Ribeirão Preto

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos  
e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientado:** Vitor de Souza Mazucato

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas em 19/11/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

## RESUMO

MAZUCATO, V. S. **Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**. 2021. 146f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Neste trabalho foram estudados dois fungos, o *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*, e seus potenciais de produzirem inibidores enzimáticos associados a doenças provocadas por esses fungos em abacaxi, mamão e caqui. Utilizou-se a técnica de cocultivo, uma abordagem utilizada atualmente para mimetizar o ambiente natural e obter uma maior diversidade química de compostos produzidos. Além disso, outras estratégias foram utilizadas para induzir a produção de diferentes metabólitos e explorar o potencial destes fungos como a utilização de meio de cultivo diferentes, sendo eles PDB e Czapek, a realização de processos de biotransformação das micotoxinas ácido fusárico (AF), ácido 9,10-desidrofusárico (ADF) e mistura deles e experimento com modificador epigenético, o ácido suberoidroxâmico (ASBH). Os extratos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), e técnicas cromatográficas foram utilizadas para isolamento dos compostos, cujas estruturas foram elucidadas por RMN de  $^1\text{H}$  e espectrometria de massas, totalizando 14 compostos isolados e identificados. Os cultivos axênicos de *F. guttiforme* e *C. horii* em meio PDB levaram a produção de três compostos, o ácido fusárico (1), ácido 9,10-desidrofusárico (2) e tirosol (3), enquanto o cocultivo deles levou à produção de outros 4 compostos, o fusarinol (4), complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e uma lactona a 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7), sendo estes três últimos inéditos na literatura. A variação de meio de cultivo PDB para meio Czapek levou a produção de compostos estruturalmente diferentes, sendo isolado os compostos uracila (8), *para*-hidroxiacetofenona (9) e a dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10). Os experimentos de biotransformação mostraram que o fusarinol obtido no cocultivo é resultado de um processo de destoxificação de AF pelo fungo *C. horii* a um composto menos tóxico, além disso foram obtidos outros 3 compostos desse processo, o 7-hidroxifusarinol (11), 9,10-desidrofusarinol (12) e acetato de fusarinila (13), sendo dois deles inéditos. A modulação epigenética com AS frente ao fungo *F. guttiforme* levou a um extrato com perfil químico diferente do controle, sendo obtidos alguns dos compostos obtidos no cocultivo em meio Czapek e a gibepirona B (14). Estes compostos foram submetidos a ensaio enzimático de inibição da papaína, as maiores atividade inibitória obtidas foram 56, 54 e 30% para os compostos complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e acetato de fusarinila (13) respectivamente.

**Palavras-chave:** fungos fitopatogênicos; *Fusarium guttiforme*; *Colletotrichum horii*; biotransformação e modulação epigenética; inibidores enzimáticos.

## ABSTRACT

MAZUCATO, V. S. **Exploring the chemical diversity of phytoparasitic fungi on fruits and evaluating their papain inhibitory potentials.** 2021. 146f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

In this work, two fungi, *Fusarium guttiforme* and *Colletotrichum horii*, and their potential to produce enzyme inhibitors associated with diseases caused by these fungi in pineapple, papaya and persimmon were studied. Co-cultivation is an approach currently used to mimic the natural environment and obtain a large chemical diversity of produced compounds. In addition, other strategies were used to induce the production of other compounds and explore the potential of these fungi, such as the use of different culture media, namely PDB and Czapek, the performance of biotransformation processes of fusaric acid (AF), 9,10-dehydrofusaric acid (ADF) mycotoxins and their mixture and experiment with epigenetic modifier suberohydroxamic acid (SBHA). The obtained extracts were followed by hydrogen nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR), chromatographic techniques were used to isolate the compounds that were elucidated by  $^1\text{H}$  NMR and mass spectrometry, totaling 14 isolated compounds. Axenic cultivation in PDB medium led to the production of three compounds, fusaric acid (**1**), 9,10-dehydrofusaric acid (**2**) and tyrosol (**3**), while co-cultivation led to the production of another 4 compounds, fusarinol (**4**), compounds fusaric acid complex with magnesium (**5**), 9,10-dehydrofusaric acid complex with magnesium (**6**) and a 5-butyl-5-(hydroxymethyl)dihydrofuranone lactone (**7**), these last three are unpublished compounds. The variation from the PDB culture medium to the Czapek medium led to the production of totally different compounds, being isolated the compounds uracil (**8**), *p*-hydroxyacetophenone (**9**) and the diketopiperazine cycloproline-leucine (**10**). The biotransformation experiments showed that the fusarinol obtained in the co-cultivation is the result of a process of detoxification of FA by the fungus *C. horii* to a less toxic compound, in addition, other 3 compounds were obtained from this process 7-hydroxyfusarinol (**11**), 9,10-dehydrofusarinol (**12**) and fusarinyl acetate (**13**) being two of them unpublished. Epigenetic modulation with SBHA against the fungus *F. guttiforme* led to an extract with a different chemical profile than the control, being obtained some of the compounds obtained in co-cultivation in Czapek medium and also gibepiyrone B (**14**). These compounds were submitted to an enzymatic assay against papain, the highest inhibitory activities obtained were 56, 54 and 30% for the compounds fusaric acid complex with magnesium (**5**), 9,10-dehydrofusaric acid complex with magnesium (**6**) and fusarinyl acetate (**13**) respectively.

**Keywords:** phytopathogenic fungi; *Fusarium guttiforme*; *Colletotrichum horii*; biotransformation and epigenetic modulation; enzyme Inhibitor

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Proteases

As proteases são importantes para uma variedade de processos biológicos em organismos, desde bactérias e vírus a mamíferos, catalisando a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas clivando em fragmentos menores (VERMA et al., 2016).

Proteases, ou peptidases, semelhantes à papaína (*papain-like*) são enzimas que conduzem importantes funções metabólicas e regulatórias essenciais, o que pode ser evidenciado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos (WU, 2010). Elas participam de processos envolvendo morte celular, degradação de proteínas, autofagia, remodelação de matriz extracelular, processamento de vários fatores de crescimento e citocinas (DANA e PATHAK, 2020; BREZNIK et al., 2019). Desequilíbrios entre a degradação e síntese proteica, erros na transcrição e/ou regulação de processos celulares, localização incomum ou mesmo alterações na expressão de algumas proteases, a exemplo das catepsinas, estão intimamente relacionadas a diversas patologias, tais como progressão de tumores malignos, metástases (LI et al., 2017; VASILJEVA e TURK, 2008; WATSON e KREUZALER, 2009), mal de Alzheimer (HOOK et al., 2010), artrite reumatoide e osteoporose (YASUDA et al., 2005).

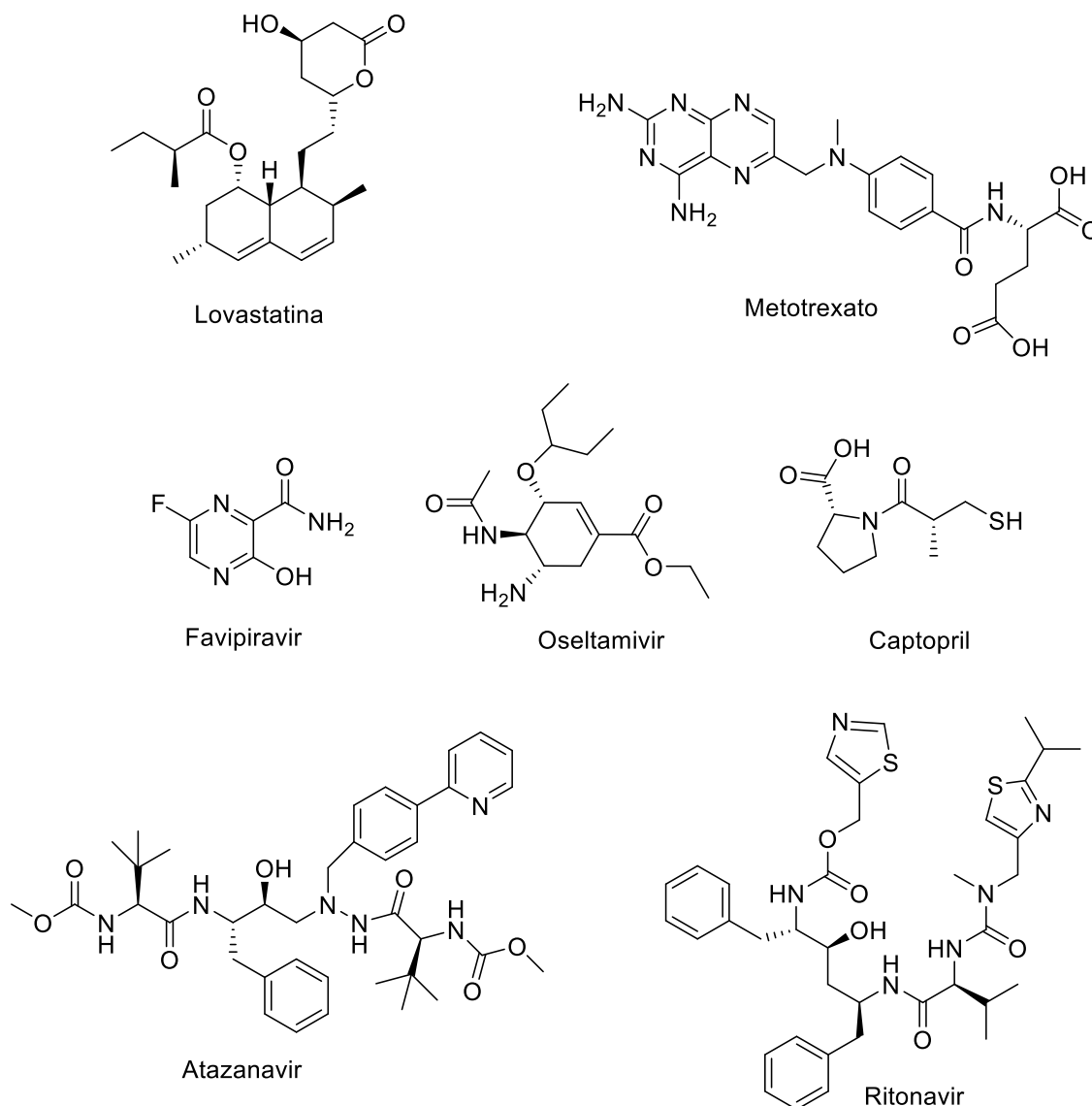
A primeira cisteíno protease, a papaína, foi isolada da fruta tropical *Carica papaya* (mamão). Nas plantas as enzimas proteolíticas estão envolvidas na germinação, crescimento, desenvolvimento e diferenciação do vegetal, controle do metabolismo, homeostase e na morte celular programada. Outros estudos demonstraram a importância das proteases como resposta imune das plantas contra patógenos, como bactérias fungos e insetos. O estudo de nocaute de proteases mostrou que os mutantes são mais suscetíveis a patógenos fúngicos. (MÉNARD, 1993; HOORN e JONES, 2004; MISAS-VILLAMIL et al., 2016; DOMSALLA e MELZIG, 2008; LIU et al., 2018)

Em mamíferos as cisteíno próteses são denominadas catepsinas e diferem dos vegetais na especificidade do substrato e em propriedades enzimáticas. Um exemplo é a catepsina V especificamente expressa no testículo, timo e córnea epitelial e que foi associada a miastenia gravis, doenças neurológicas e diabetes do tipo 1. Também

foi relatada a correlação de sua presença com progressão do câncer e foi observada sua alta expressão em carcinomas de colo e de mama. Por outro lado, a catepsina B possui atividade de endopeptidase e dipeptidil peptidase apresentando ampla distribuição tecidual. Alterações em sua localização, atividade e expressão estão relacionados a doenças como mal de Alzheimer e diversos tipos de câncer quando em grande quantidade como carcinomas de cólon, mama, próstata, pâncreas e cérebro. (LECAILLE et al., 2002; WIEDERANDERS et al., 1992; BRÖMME e KALETA, 2002; SANTAMARÍA et al., 1998; BRÖMME et al., 1999; ADACBI et al., 1998; NIWA et al., 2012; HOOK et al., 2005; MOHAMED e SLOANE, 2006; SLOANE et al., 1986; BERDOWSKA, 2004)

A inibição seletiva de enzimas apresenta papel importante no tratamento de câncer (BARZAK et al., 2019) e doenças relacionadas a infecções virais, parasitárias e bacterianas, por isso, esses inibidores são muito explorados na medicina moderna (CARDOSO et al., 2009). Interessante também é observar a correlação dessas proteases com o mecanismo de penetração e replicação do vírus SARS-CoV-2 em humanos, um novo coronavírus associado à pneumonia atípica que surgiu em Wuhan, China no final de 2019. Sua presença já foi encontrada em diversos países afetando homens, mulheres, idosos e crianças. Duas proteases são responsáveis pelo processamento das proteínas e vitais para replicação do vírus, a protease principal (Mpro) e a protease semelhante à papaína (PLpro) (CHAUHAN et al., 2020; LIU et al., 2020; HILGENFELD, 2014; FREITAS et al., 2020; YUEN et al., 2020; GOYAL e GOYAL, 2020).

Dessa forma, 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 e outras doenças (EDWARDS e MURPHY, 1998). A figura 1 mostra exemplos de compostos inibidores enzimáticos que atuam como medicamentos e compostos antivirais.



**Figura 1.** Alguns compostos inibidores enzimáticos que atuam como medicamentos. **Fonte:** o autor (2021).

## 1.2. Proteases na interação entre plantas e fungos

Durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção que lhes asseguraram resistência a diferentes tipos de condições desfavoráveis, como fungos fitopatogênicos (VALUEVA e MOSOLOV, 2004) que utilizam de enzimas proteolíticas para hidrólise de proteínas da membrana e parede celular, permitindo a infestação na planta hospedeira (TREMACOLDI, 2009). Os compostos proteicos

encontrados nas plantas são os componentes principais envolvidos nos mecanismos de proteção das plantas (VALUEVA & MOSOLOV, 2004), capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica (CHEVREUIL et al., 2011). As proteases, por sua vez, são importantes para a resistência da planta, e são alvos de agentes patogênicos secretados por micro-organismos para suprir as respostas imunes, acarretando um duelo bioquímico entre planta e micro-organismo (MISAS-VILLAMIL et al., 2016.; LIU et al., 2018).

Frutos como o mamão, abacaxi e caqui possuem alto teor de proteases e, muitas delas, estão envolvidas no processo de defesa contra micro-organismo patogênico (FARAHAT e EL-BATAWY, 2013; SALAS et al., 2008), ainda assim, estes frutos são infestados por fungos. Esta observação sugere que estes micro-organismos podem ser capazes de produzir inibidores dessas enzimas, como demonstrado por SILVA e colaboradores (2020) no caso da inibição de papaína e catepsinas V e B por metabólitos do fungo *Fusarium proliferatum* invasor de abacaxi. Este exemplo sugere a investigação dos metabólitos produzidos por esses fungos patogênicos na busca por novas moléculas bioativas potenciais inibidoras de proteases.

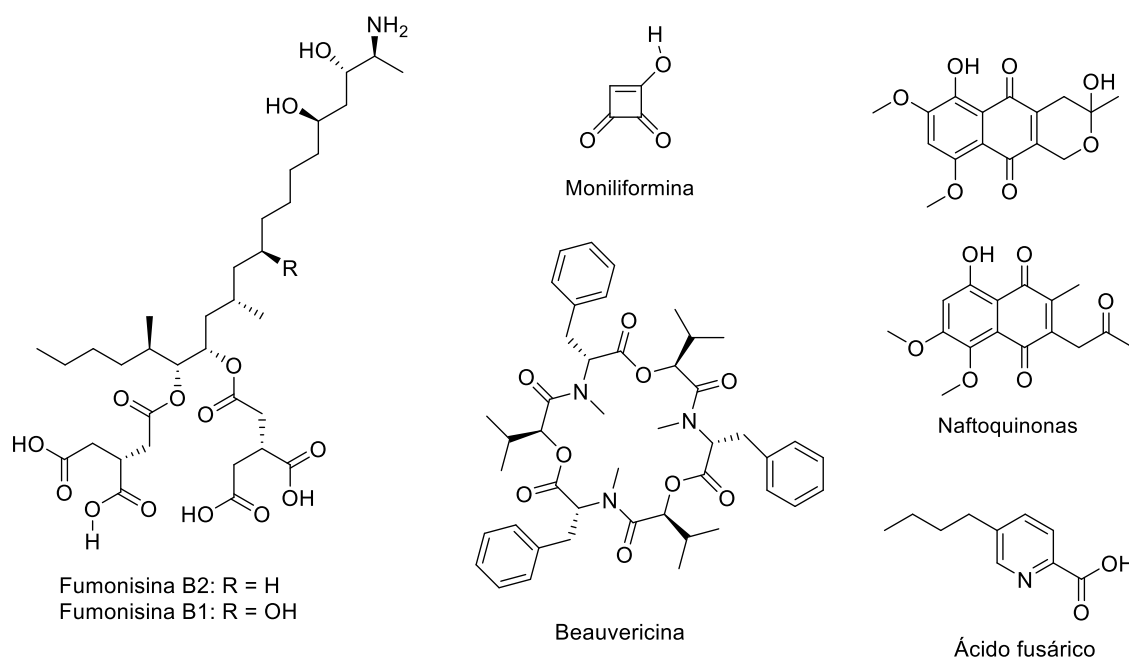
### **1.3. *Fusarium* e *Colletotrichum***

O gênero *Fusarium* está entre as espécies mais adaptativas do filo *Eumycota*, são fungos que apresentam filamentos e são distribuídos por todo o mundo (LALE e GADRE, 2016; ZHOU et al., 2019). Seus membros são patógenos de diversas plantas e são capazes de sobreviver em solos por vários anos, causando murchamento e apodrecimento grave em diversas culturas hortícolas (WANG et al., 2013; BODAH, 2017).

As micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* estão relacionados à virulência desse fungo e o ácido fusárico é a principal micotoxina associada a ele. Em alta concentração essa toxina induz várias respostas fisiológicas como alteração do crescimento celular, permeabilidade da membrana celular, inibição da síntese de ATP e quelação de cofatores importantes como ferro e zinco, pode também desencadear reações de defesa da planta e morte celular programada (CRUTCHER et al., 2014; BANI et al., 2014). Devido ao grande prejuízo econômico, os estudos envolvendo



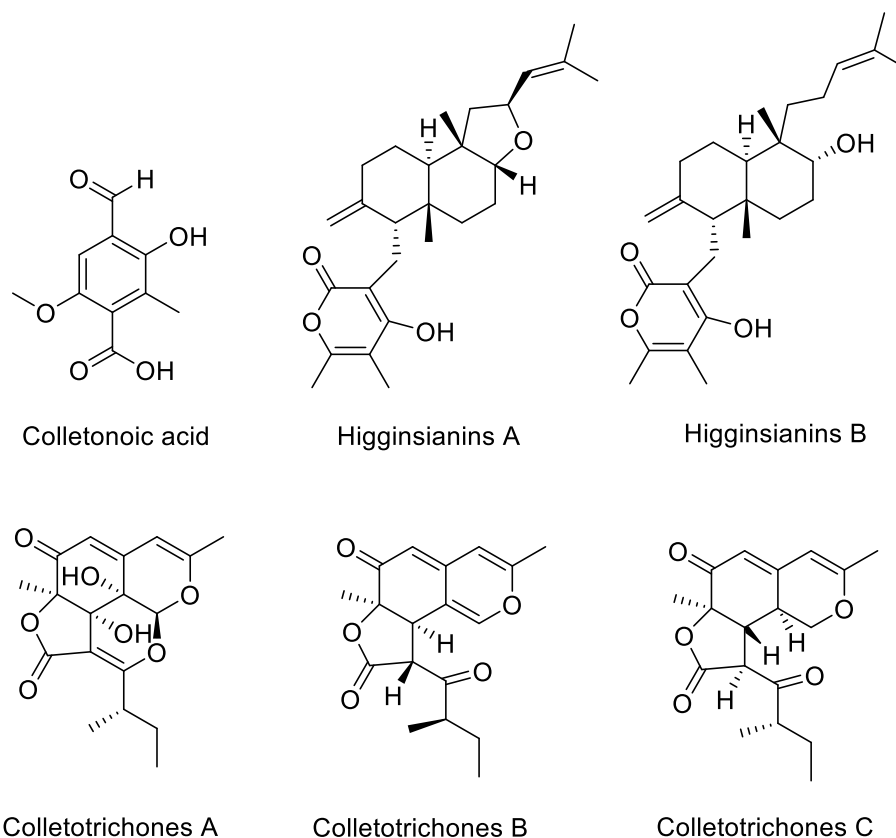
estas espécies são de grande importância para vários países ao redor do mundo. Na América do Sul e Central observa-se uma doença conhecida como fusariose em abacaxi (VENTURA et al., 2009; VENTURA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2016). Na China a murcha de *F. oxysporum* tem sido o fator limitante para uma produção lucrativa, principalmente em casos de cultivo de monocultura de melancia (WU et al., 2008; HOPKINS et al., 1992). Alguns dos metabólitos produzidos por estes fungos são fumonisinas, moniliformina, ácido fusárico (FOTSO et al., 2002; PENA et al., 2020), beauvericina (MORETTI et al., 1994) e naftoquinonas (DAME et al., 2015) mostrados na figura 2.



**Figura 2.** Alguns compostos produzidos pelo gênero *Fusarium*. **Fonte:** o autor (2021).

O gênero *Colletotrichum* é encontrado em todas as regiões temperadas, tropicais e subtropicais do planeta, sendo responsável por doenças em uma grande variedade de plantas lenhosas e herbáceas e já foi eleito o oitavo grupo de fungos fitopatogênicos do mundo, considerando sua importância científica e econômica. (WEIR et al., 2012; DEAN et al., 2012; CANNON et al., 2012; LI et al., 2016). Os fungos deste gênero causam manchas em plantas e manchas de antracnose e podridão em frutos, provocando um grande prejuízo em safras de alimentos básicos como banana, mandioca, laranja, cacau e caqui, principalmente na pós colheita (PERES et al., 2002, DEAN et al., 2012, CAI et al., 2009, LIMA et al., 2021). Estima-se que a perda pela

doença antracnose possa chegar a 40% da safra (LI et al., 2016). Diversos compostos químicos foram isolados desses fungos como ácido coletônico (HUSSAIN et al., 2014), higginsianinas A e B (CIMMINO et al., 2016), coletotrichonas A, B e C (WANG et al., 2016), representados na figura 3.



**Figura 3.** Alguns compostos produzidos pelo gênero *Colletotrichum*.  
**Fonte:** o autor (2021).

#### 1.4. Frutos comestíveis brasileiros e fungos patogênicos

No Brasil, frutos tropicais como mamão, abacaxi e o caqui apresentam grande valor socioeconômico, sendo que o clima quente do país favorece seu cultivo por todo território tornando o país um dos principais produtores e exportadores destes frutos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2019 o Brasil produziu 1,6 bilhão de abacaxis, 169 mil toneladas de caqui e 1,2 milhão de toneladas de mamão, demonstrando a importância comercial destes frutos que são suscetíveis a diversas doenças fúngicas, causando grande prejuízo econômico.

O abacaxi é suscetível a uma doença conhecida como fusariose causada, principalmente, pelo patógeno *Fusarium guttiforme* que é responsável por perda de 30 a 40% do fruto e considerada a sua doença mais prejudicial. O fungo infecta todas as partes da planta, contudo o fruto é a parte mais vulnerável e os sintomas da doença são mais perceptíveis. Os sintomas incluem descoloração inicial da área infectada, tornando-se afundadas, de um marrom claro a escuro e são cobertos com o micélio do patógeno até o apodrecimento da fruta (PLOETZ, 2006; DE SOUZA et al., 2016).

O mamão e o caqui estão sujeitos a duas doenças causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*. O mamão sofre uma doença chamada podridão peduncular provocando grandes prejuízos na pós-colheita. Já o caqui sofre uma doença grave conhecida como antracnose provocada pelo fungo *Colletotrichum horii* e está associado a diversas perdas econômicas. (NERY-SILVA et al., 2007; XIE et al., 2010; SILVA et al., 2020).

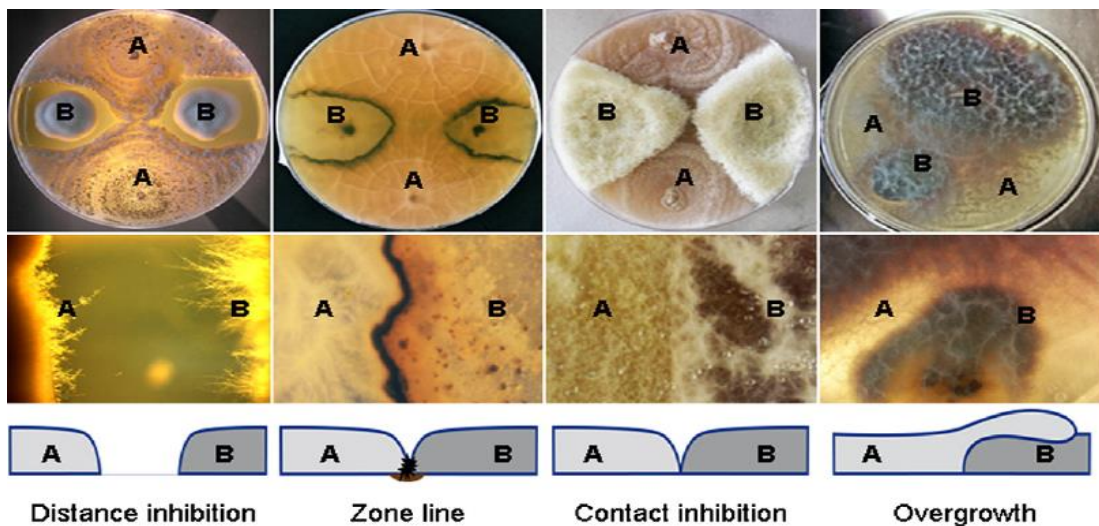
Esses dados mostram a importância de realizar estudos envolvendo esses fungos invasores de frutos na busca de compostos antimicrobianos para uso na agricultura ou medicinal em casos de alimentos contaminados por micotoxinas.

Os recentes avanços no sequenciamento genômico e a correlação da biossíntese de produtos naturais revelaram que os micro-organismos têm potencial ainda maior de produção de metabólitos secundários e que a maioria dos *clusters* de genes não são expressos em condições usuais de cultivo, essas rotas biossintéticas não expressas são chamadas de 'silenciosas' (HERTWECK, 2009; GROSS, 2009; BERTRAND et al., 2014; PAN et al., 2019;). Dessa forma, para acessar outras rotas biossintéticas inexploradas e aumentar a produção de metabólitos secundários, novas abordagens são desenvolvidas, como a utilização de meios de cultivos diferentes, cocultivo de micro-organismos, temperatura, pH, salinidade, utilização de modificadores epigenéticos, processos de biotransformação, entre outros. Neste trabalho algumas destas alternativas foram estudadas (PAN et al., 2019)

### **1.5. Cocultivo de micro-organismos**

Os micro-organismos raramente são encontrados vivendo em populações de espécies únicas no meio ambiente. Estudos de diferentes habitats mostraram que uma enorme riqueza e abundância de micro-organismos são detectadas em uma

pequena amostra, sugerindo que as interações microbianas são inerentes ao estabelecimento de populações no ambiente, como no solo, sedimentos, animais e plantas. Muitos anos de coevolução de diferentes espécies levaram à adaptação e especialização, o resultado é uma grande variedade de relações que podem facilitar a coabitação como relacionamentos mutualistas e endossimbióticos, ou relacionamentos competitivos, antagônicos, patogênicos e parasitários (BRAGA et al., 2016), alguns exemplos destas interações podem ser observados na Figura 1. Tem sido relatado que o cocultivo entre micro-organismos do mesmo ecossistema pode induzir a ativação de rotas biossintéticas silenciosas que levam à produção e identificação de novos produtos naturais (BRAGA et al., 2016). Estes compostos produzidos pela interação entre organismos são utilizados para sinalização e defesas entre si.



**Figura 4.** Interações morfológicas observadas entre dois fungos em uma placa de Petri. As morfologias das colônias de cocultivos fúngicos mostram os quatro principais tipos de interações: inibição a distância, linhas de zona, inibição por contato e supercrescimento. **Fonte:** Adaptado de Bertrand et al. (2014).

As interações microbianas envolvem a produção de metabólitos, geralmente bioativos. Para o estudo destas interações e produção de metabólitos, os modelos de cultivos clássicos axênicos em condições de laboratório não aproveitam plenamente das habilidades dos micróbios, uma vez que, as condições artificiais restringem o acesso a vários micro-organismos e/ou suas habilidades (UEDA e BEPPU., 2017). Uma forma de mimetizar um ambiente natural e contornar os problemas de cultivo é

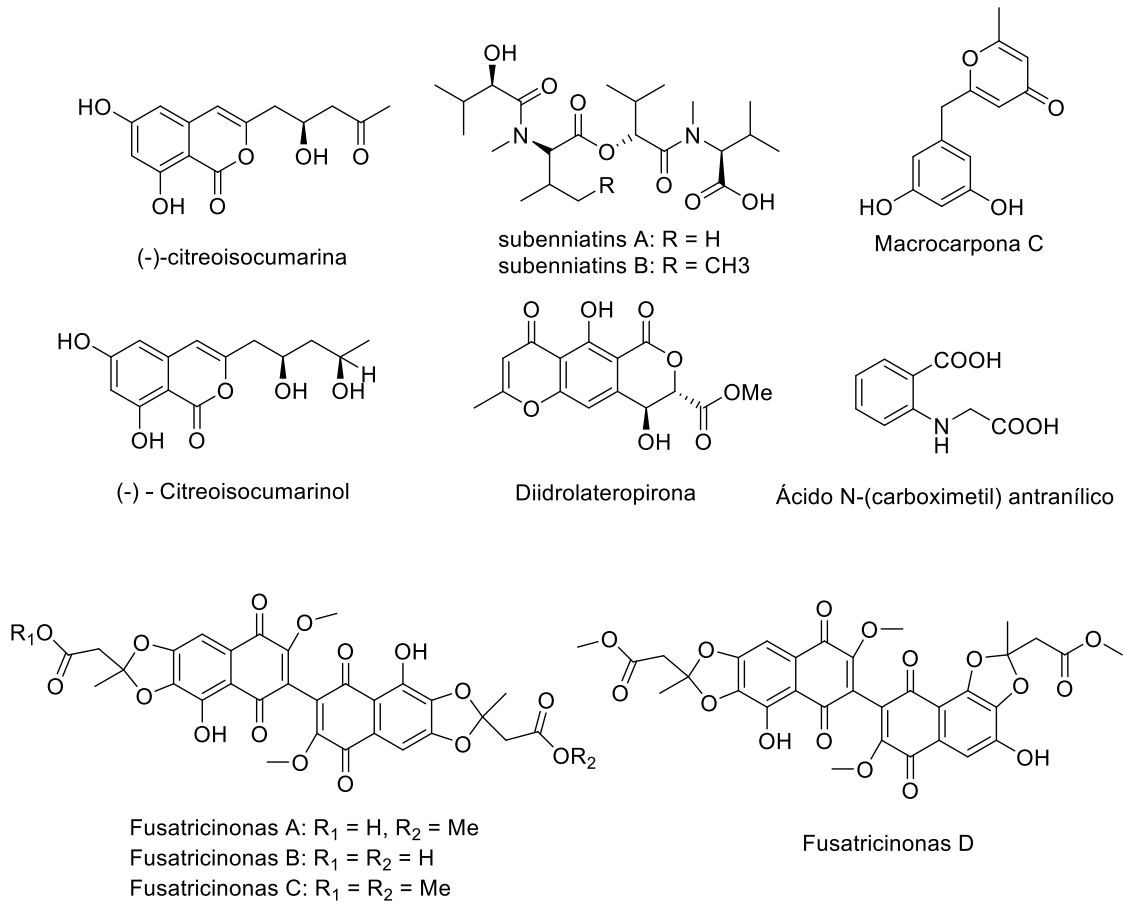
cultivar os micro-organismos na presença um do outro(s). Em 2020, SILVA e colaboradores descreveram uma nova abordagem envolvendo o cocultivo como forma de aumentar a diversidade química de compostos produzidos por micro-organismos (SILVA et al 2020).

Dentre os micro-organismos, os fungos representam uma fonte promissora de metabólitos bioativos com quimiodiversidade reconhecidamente elevada. Aproximadamente 42% das moléculas bioativas microbianas foram produzidas por fungos, e muitos desses compostos têm sido amplamente utilizados como antifúngicos e antibióticos (AZZOLLINI et al., 2018).

Wang e colaboradores (2013) realizaram estudos de cocultivo de duas espécies do gênero *Fusarium*, o *F. tricinctum* e o *F. begoniae* o que levou à produção e isolamento de dois depsipeptídeos lineares, as subeniatinas A e B, figura 5, que não estavam presentes nos cultivos axênicos (WANG et al., 2013)

*F. tricinctum* também foi cultivado na presença da bactéria *Bacillus subtilis* por Ola e colaboradores (2013) em meio de arroz. Isso resultou no aumento de compostos já produzidos do fungo e também a produção de quatro compostos que não foram obtidos nos cultivos axênicos desses micro-organismos sendo a (-)-citreoisocumarina, e 3 novos produtos naturais macrocarpona C, o ácido N-(carboximetil) antranílico e (-) – citreoisocumarinol, figura 5 (OLA et al., 2013).

Mais recentemente Moussa e colaboradores (2019) cultivaram o fungo *F. tricinctum* na presença da bactéria *Streptomyces lividans*, também realizado em meio de arroz, levando a produção de quatro novos dímeros de naftoquinona, fusatricinonas A – D, um novo derivado de lateropirona a diidrolateropirona que não foram obtidos nos cultivos axênicos, figura 5 (MOUSSA et al., 2019). Outros compostos não detectados nos cultivos axênicos também foram obtidos no cocultivo por este grupo.



**Figura 5.** Alguns compostos inéditos isolados a partir do cocultivo microbiano.  
**Fonte:** o autor (2021).

Isso mostra que o estudo de fungos em cocultivo, bem como o isolamento e a caracterização dos metabólitos produzidos por eles é fundamental para obtenção de novos compostos bioativos. Dessa forma, a descoberta de novos produtos naturais utilizando cultivo de fungos como fonte de produtos naturais mostra ser vantajosa e uma área bastante promissora.

### 1.6. Meio de cultivo

De um modo geral, as necessidades nutricionais dos micro-organismos são muito abrangentes e diversificadas, alguns deles requerem apenas uma pequena quantidade de nutrientes como fonte de alimento, enquanto outros requerem meios de cultivos mais complexos. O meio de cultivo tem efeito tanto no crescimento micelial quanto no metabolismo, sendo as fontes de carbono e nitrogênio os principais componentes do meio de cultivos. As fontes de carbono fornecem tanto base para a construção de biomassa quanto para energia, enquanto a fonte de nitrogênio é

necessária para síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Dessa forma, pequenas alterações nas condições de crescimento podem levar a alterações nos perfis metabólicos microbianos. Por exemplo, alta concentração de, bem como extrato de malte ou levedura, e a adição de minerais e oligoelementos, geralmente levam à produção de metabólitos altamente diversos e de alto rendimento. As fontes de carbono também tiveram influências no cocultivo dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus giganteus* - TR22-2 (RUIZ et al., 2010; SINGH et al., 2017; PAN et al., 2019; FRISVAD et al., 2008; MEYER e STAHL, 2003)

Outro fator importante presente no meio é a salinidade, que determina muitos aspectos da química natural da água e dos processos bioquímicos no sistema de cultivo. É uma variável de estado termodinâmica que, junto com a temperatura e pressão, controla as propriedades físicas como a pressão osmótica e enzimas envolvidas no crescimento e metabolismo microbiano (PAN et al., 2019; BLUNT et al., 2015). As condições de cultivo como pH, concentração de oxigênio, temperatura e luz são essenciais para o crescimento e as reações bioquímicas dos micro-organismos. (PAN et al., 2019; ALY et al., 2010)

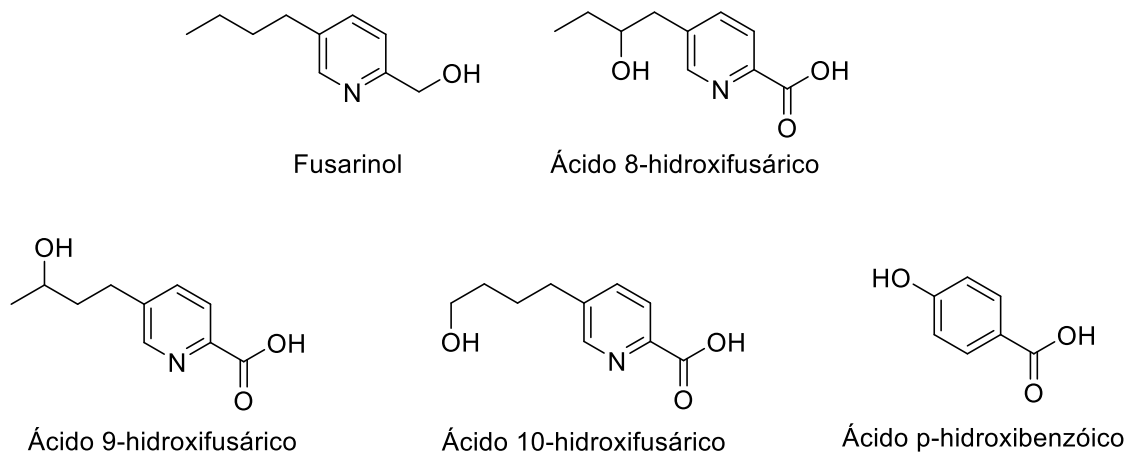
### **1.7. Biotransformação**

As biotransformações de xenobiótico, como fármacos, em organismos vivos são divididas em duas etapas denominadas metabolismo de fase I e de fase II. Nas reações de fase I, as modificações ocorrem pelo metabolismo a partir de reações de oxidação, redução, hidroxilação, hidrólise e entre outras, onde grupos polares são adicionados no xenobiótico. Nas reações da fase II, chamadas conjugações, ocorrem adição de grupos como glicose para tornar o xenobiótico mais solúvel em água. Em humanos estas etapas visam a conversão das substâncias geralmente hidrofóbicas em substâncias mais hidrofílicas ou uma forma mais facilmente excretada, que pode ser por suor, urina ou bile. (GONZALEZ et al., 2011; DERELANKO e HOLLINGER, 2002; AZERAD, 1999)

Foi demonstrado que o sistema de biotransformação de micro-organismos é muito semelhante às reações metabólicas de fase I dos mamíferos e por isso eles são

uma alternativa atraente para o estudo de metabolismo de fármacos e outros produtos químicos na predição de vias metabólicas em humanos, os fungos filamentosos são modelos clássicos para esses estudos. (VENISETTY e CIDDEN, 2003; AZERAD, 1999; PALUDO et al., 2007)

Com o objetivo de identificar mecanismo de desintoxicação de ácido fusárico, Crutcher e colaboradores em 2014 realizaram o estudo de biotransformação do ácido fusárico por fungos *Aspergillus tubingensis* resistentes sendo possível obter um composto denominado fusarinol, figura 6 (CRUTCHER et al., 2014). Devido às altas atividades do AF e por estar envolvido em processo de patogenicidade de fungos *Fusarium*, Crutcher e colaboradores realizaram outro experimento em 2017 utilizando *Mucor rouxii* (CRUTCHER et al., 2017). Foram obtidos outros compostos hidroxilados como o ácido 10-hidroxifusárico e outros análogos mostrados na figura 6.



**Figura 6.** Alguns compostos produzidos pela biotransformação ácido fusárico por micro-organismos. **Fonte:** o autor (2021).

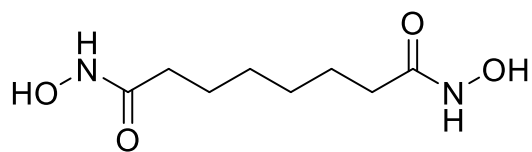
### 1.8. Modificador epigenético

Como descrito anteriormente as condições de cultivo nem sempre são capazes de acessar todas as rotas biossintéticas. Assim, para explorar totalmente a capacidade genética dos micro-organismos e acessar rotas biossintéticas silenciadas, estudos com modificadores epigenéticos são cada vez mais explorados. Uma das



modificações mais estudadas são realizadas nas histonas que são suscetíveis a modificações pós-tradução. A acetilação de histonas é realizada por enzimas histonas-acetiltransferases (HATs), enquanto a desacetilação de histonas é realizada por histona-desacetilases (HDACs). O equilíbrio dinâmico dessas enzimas promove processos de replicação, reparo e transcrição do DNA. A acetilação torna a cromatina mais aberta e acessível para fatores de transcrição, o que geralmente aumenta a expressão de genes produtores de metabólitos secundários. Dessa forma, a desacetilação provoca efeitos contrários, ela induz a condensação da cromatina e, conseqüentemente, a inativação do gene (BROSCH et al., 2001 GRAESSLE et al., 2008; Williams 2008; El-HAWARY et al., 2018; KOUZARIDES et al., 2007). Outros estudos que são realizados com modificadores e que não serão discutidos nesse trabalho são utilizando inibidores de DNA metiltransferase.

O ácido suberoidroxâmico (ASBH), figura 7, é um inibidor de HDAC, o que levou Asai e colaboradores (2013) a realizarem tratamento do fungo *Chaetomium indicum* com este modificador epigenético. Notou-se a indução na produção de policetídeos e o isolamento e caracterização de 6 novos compostos denominados chaetofenóis A-F. Análise do controle mostrou a presença de alguns policetídeos, contudo após o tratamento foi observado que a produção foi estimulada em diferentes graus e apenas os compostos A, B, C e E, figura 8, parecem realmente ser provenientes do tratamento com o inibidor (ASAI et al., 2013).

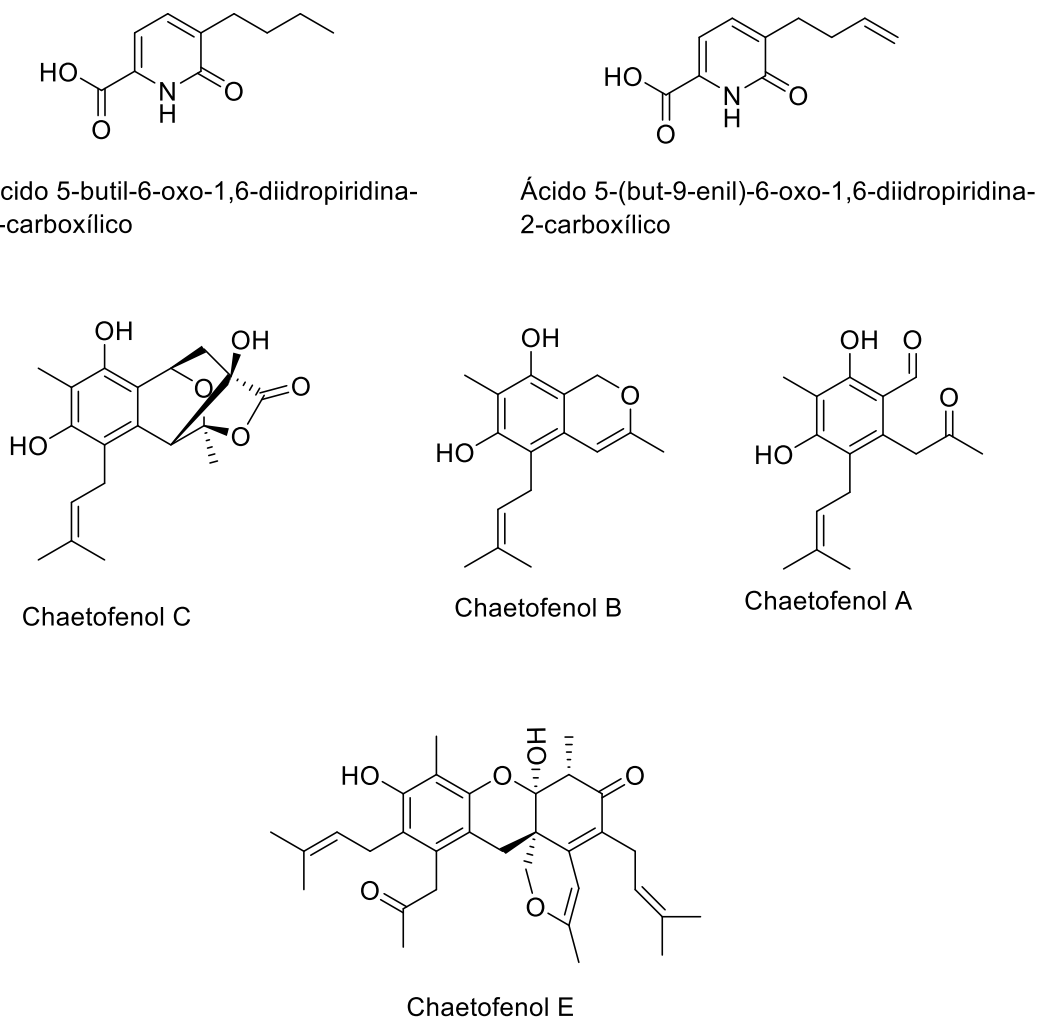


Ácido suberoidroxâmico (ASBH),

**Figura 7.** Estrutura química do modulador epigenético ácido suberoidroxâmico. **Fonte:** o autor (2021).

Chen e colaboradores (2013) induziram a produção de dois novos derivados de ácido fusárico, denominados ácido 5-butiril-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico e ácido 5-(but-9-enil)-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico, figura 8, que não foram produzidas no controle. Estes compostos foram produzidos pelo fungo *Fusarium*

*oxysporum*, isolado da planta medicinal *Datura stramonium*, após o tratamento com ácido suberoidroxâmico. Ambos os compostos e o ácido fusárico foram avaliados quanto às suas atividades antibacterianas utilizando *Bacillus cereus* e observou-se que, enquanto ácido fusárico apresentou uma concentração mínima inibitória de 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , os outros dois compostos não apresentam atividades, sugerindo que a oxidação do anel piridínico diminuiu significativamente a propriedade antibacteriana do ácido fusárico (CHEN et al., 2013).



**Figura 8.** Alguns compostos inéditos produzidos a partir de micro-organismo tratados com o modificador epigenético ácido suberoidroxâmico. **Fonte:** o autor (2021).

## REFERÊNCIAS

ABDEL-RHMAN, S. H.; EL-MAHDY, A. M.; EL-MOWAFY, M. Effect of Tyrosol and Farnesol on Virulence and Antibiotic Resistance of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMed research international**, v. 2015, p. 456463, 2015.

ADACBI, W.; KAWAMOO; S.; OHNO, I.; NISHIDA, K.; KINOSHITA, S.; MATSUBARA, K.; OKUBO, K. Isolation and characterization of human cathepsin V: A major proteinase in corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 39, n. 10, p. 1789–1796, 1998.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi - a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2010.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIRATA, N.; TANIGUCHI, T.; MONDE, K.; FUJII, I.; GOMI, K.; OSHIMA, Y. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. **Organic Letters**, v. 15, n.13, p. 3346-3349, 2013.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Biotransformations**, v. 63, 1999.

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. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. p. February, p. 1–12, 2018.

BACON, C. W.; PORTER J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039–4043, 1996.

BÁIDEZ, A.G.; GÓMEZ, P.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO. A. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 69, n. 4-6, p. 224–229, 2006.

BANI, M.; RISPAIL, N.; EVIDENTE, A.; RUBIALES, D.; CIMMINO, A. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* F. Sp. pisi race 2 and their relation with isolates' pathogenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2574–2580, 2014.

BARRERO, A. F.; OKRA, J. E.; HERRADOR, M. M.; CABRERA, E.; SANCHEZ, J. F.; QUILEZ, J. F.; ROJAS, F. J.; REYES J.F. Gibepyrone:  $\alpha$ -pyrones from *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 49, n. 1, p. 141–150, 1993.

BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, 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". **Biochemical. Journal.**, v. 201, n.1, p. 189-198, 1982.

BARZAK, F. M.; HARJES, S.; KVACH, M. V.; KURUP, H. M.; JAMESON, G. B.; FILICHEV, V. V.; HARJES, E. Selective inhibition of APOBEC3 enzymes by single-stranded DNAs containing 2'- deoxyzebularine. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 43, p. 9435–9441, 2019.

BERDOWSKA, I. Cysteine proteases as disease markers. **Clínica Chimica Acta**, v. 342, n. 1-2, p. 41-69, 2004.

BERTERO, A.; MORETTI, A.; SPICER, L. J.; CALONI, F. *Fusarium* molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 1–27, 2018.

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. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNROA, M. H. G.; PRINSEPD, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 3, p. 116–211, 2015.

BODAH, T. E. Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, v. 5, n. 3, 2017.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86–98, 2016.

BREZNIK, B.; MITROVIĆ, A.; LAH, T. T.; KOS, K. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors. **Biochimie**, v. 166, p. 233–250, 2019.

BROSCH, C.; LOIDL, P.; GRAESSLE S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 409-439, 2008.

BRÖMME, D.; KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins: cathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 18, p. 1639, 2002.

BRÖMME, D.; LI, Z.; BARNES, M.; MEHELER, E. "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization". **Biochemistry**, v. 39, n. (8), p. 2377, 1999.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI,

H.; SHIVAS, R. G. MCKENZIE, H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183–204, 2009.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 181–213, 2012.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes magnéticos cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata Mycopathol Mycol Appl.**, v. 20, n. 1-2, p. 1-6, 1963.

CHAUHAN, G.; MADOU, M. J.; KALRA, S.; CHOPRA, V.; GHOSH, D.; MARTINEZ-CHAPA, S. O. Nanotechnology for COVID-19: Therapeutics and Vaccine Research. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7760–7782, 2020.

CHEN, H.; AWAKAWA, T.; SUN, J.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 1, p. 20-23, 2013.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes and Development**, v. 20, n. 9, p. 1150–1161, 2006.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; SCHIMPL, F. C.; C. S. C. R.; SOUZA, L. A. G.; PANDO, S. C. Prospecção de inibidores de serino proteinases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. **Acta Amazonica Acta Amaz.**, v.41, n. 1, p. 163-170, 2011.

CHING-WEN, C.; YUN-CHIEH, C.; YU-CHIN, L.; WEN-HUANG; P. p-Hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor-κB-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 2, p. 422–432, 2017.

CHOU, SC.; CHIU, YJ.; CHEN, CJ.; LIN, YC.; WU, CH.; CHAO, CT.; CHANG, CW.; PENG, WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Artemisia morrisonensis* Hayata in mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

CHUNG, D.; KIM, S. Y.; AHN, J. H. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

CHUTIA, M.; BHUYAN, P. D.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 777–780, 2009.

CIMMINO, A.; MATHIEU, V.; MASI, M.; CIMMINO, A.; MATHIEU, V.; MASI, M.; BARONCELLI, R.; BOARI, A.; PESCIPELLI, G.; FERDERIN, M.; LISY, R.; EVIDENTE, M.; TUZI, A.; ZONNO, M. C.; KORNIENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Higginsianins A and B, Two Diterpenoid  $\alpha$ -Pyrone Produced by *Colletotrichum higginsianum*, with in Vitro Cytostatic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 116–125, 2016.

COPELAND, R. A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey: Wiley, 2013.

CRUTCHER, F. K.; LIU, J.; PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; DUKE, S. E.; BELL, A. A.; WILLIAMS, H. J.; NICHOLS, R. L. Conversion of Fusaric Acid to Fusarinol by *Aspergillus tubingensis*: A Detoxification Reaction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 1, p. 84–89, 2014.

CRUTCHER, F. K.; PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; NICHOLS, R. L.; LAWRENCE, K. S.; LIU, J. Microbial Resistance Mechanisms to the Antibiotic and Phytotoxin Fusaric Acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 10, p. 996–1006, 2017.

CRUTCHER, F. K.; PUCKHABER, S. L.; BELL, A. A.; LIU, J.; DUKE, S. R.; STIPANOVIC, R. D.; NICHOLS, R. L. Detoxification of Fusaric Acid by the Soil Microbe *Mucor rouxii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 24, p. 4989–4992, 2017.

DAME, Z. T.; SILIMA, B.; GRYZENHOUT, M.; VAN REE, T. "Bioactive compounds 106 from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*". **Natural Product Research Nat. Prod. Res.**, v. 30, n. (11), p. 1301, 2015.

DANA, D.; PATHAK, S. K. A Review of Small Molecule Inhibitors and Functional Probes of Human Cathepsin L. **Molecules**. v. 25, n. 3, p. 698, 2020.

DAVY, A.; SVENDSEN, I.; SØRENSEN, S. O.; SØRENSEN, M. B.; ROUSTER, J.; MELDAL, M.; SIMPSON, D. J. & CAMERON-MILLS, V. "Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B 1". **Plant Physiology Plant Physiol.**, v. 117, n. (2), p. 255-261, 1998.

DE SOUZA, J. T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic Trichoderma species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, n. 24, p. 25–32, 2016.

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. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. Handbook of toxicology. **CRC Press**, 2nd edition, p. 1440, 29 Agosto, 2001.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. "Occurrence and properties of proteases in plant latices". **Planta Medica.**, v. 74, n. (7), p. 699, 2008.

EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Cancer: proteases-invasion and more. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 527-528, 1998.



EL-HAWARY, S. S.; SAYED, A. M.; MOHAMMED, R.; HASSAN, H. M.; ZAKI, M. A.; RATEB, M. E.; MOHAMMED, T. A.; AMIN, E.; ABDELMOHSEN, U. R. Epigenetic modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *penicillium brevicompactum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 253, 2018.

FARAHAT, A. M.; EL-BATAWY, O. I. Proteolytic activity and some properties of stirred fruit yoghurt made using some fruits containing proteolytic enzymes. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 2013.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126–1130, 2007.

FERNANDEZ-POL, J. A.; KLOS, D. J.; HAMILTON, P. D.; Cytotoxic activity of fusaric acid on human adenocarcinoma cells in tissue culture. **Anticancer Research**, 1993, v.13, n. 1, p. 57-64, 1993.

FOTSO, J.; LESLIE, J. F.; SMITH, J. S. Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5195–5197, 2002.

FREITAS, B. T.; DURIE, I. A.; MURRAY, J.; LONGO, J. E.; MILLER, H. C.; CRICH, D.; HOGAN, R. J.; TRIPP, R. A.; PEGAN, P. D. Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and delSGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 2099–2109, 2020.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. Pt 2, p. 231–240, 2008.

GONZALEZ, F.J.; COUGHTRIE, M.; TUKEY, R.H. Drug Metabolism. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Ed.) Goodman and Gilman's - **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12a ed. New York: McGraw Hill, 2011. p. 123-143.

GOODWIN, F. K.; SACK, R. L.; Behavioral effects of a new dopamine- $\beta$ -hydroxylase inhibitor (fusaric acid) in man. **Journal of psychiatric research**, v.11, n. C, p. 211-226, 1974.

GOYAL, B.; GOYAL, D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. **ACS Combinatorial Science**, v. 22, n. 6, p. 297–305, 2020.

GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCHE, G. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 704-720, 2001.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 75, n. 5-6, p. 267-277, 2009.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 26, p. 4688-4716, 2009.

HILGENFELD, R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4085–4096, 2014.

HOOK, V.; TONEFF, T.; BOGYO, M.; GREENBAUM, D.; MEDZIHRADESKY, K. F.; NEVEU, J.; LANE, W. HOOK, G.; REISINE, T. **Journal of Biological Chemistry Biol. Chem.**, v. 386, p. 931 - 940 2005.

HOOK, V.; HOOK, G.; KINDY, M. Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce  $\beta$ -amyloid related to Alzheimer's disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 391, n. 8, p. 861-872, 2010.

HOPKINS, D. L.; LOBINSKE, R. J.; LARKIN, R. P. Selection for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Race 2 in Monocultures of Watermelon Cultivars Resistant to Fusarium Wilt. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 290, 1992

HUSSAIN, H.; ROOT, N.; JABEEN, F.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; AHMAD, M.; HASSAN, Z.; ABBAS, G.; MABOOD, F.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; KHAN, A.; AHMAD, R.; GREEN, I.; R. DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K. HUSSAIN, H.; ROOT, N.; JABEEN, F.; et al. Seimatoric acid and colletonoic acid: Two new compounds from the endophytic fungi, *Seimatosporium* sp. and *Colletotrichum* sp. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, n. 12, p. 1577–1579, 2014.

HWANG, J. T.; JANG, H. J.; KIM, J. H.; PARK, C. S.; KIM, Y.; LIM, C. H.; LEE, S. W.; RHO, M. C. *Lactococcus lactis* KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1412–1422, 2017.

IBGE | Portal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 06 ago. 2021.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KUMAR, S. N.; NAMBISAN, B.; SUNDARESAN, A.; MOHANDAS, C.; ANTO, R. J. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 209–218, 2014.

LALE, G. J.; GADRE, R. V. Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell**, v. 13, n. 4, p. 599-609, 2004.

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". **Chemical Reviews Chem. Rev.**, v. 102, n. (12), p. 4459, 2002.

LI, H.; ZHOU, G. Y.; LIU, J. A.; XU, J. Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum fructicola* on Tea-Oil trees in China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–24, 2016.

LI, Y. Y.; FANG, J.; AO, G. Z. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 6, p. 643–656, 2017.

LIMA, T. C.; SANTOS, R.S.; SILVA, S. Y. S.; SANTOS, D. A.; SILVA, S. C.; GOMES, A. A. OLIVEIRA, M. C. F.; ALVES, K. F.; PINTO, L.; OLIVEIRA, M. N. VOCs profile of *Colletotrichum* spp. as a potential tool for quality control of açai pulp. **Food Chemistry**, v. 362, 2021.

LIN, Z. J.; LU, X. M.; ZHU, T. J.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. GPR12 Selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. Associated with *Cistanches deserticola*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 9, p. 1108–1114, 2008.

LIU, J.; SHARMA, A.; NIEWIARA, M. J.; SINGH, R.; MING, R. & YU, Q. "Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion". **BMC Genomics**, v. 19, n. (1), p. 1, 2018.

LIU, T.; LUO, S.; LIBBY, P.; SHI, G. P. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 213, p. 107587, 2020.

MADOU, M. J.; KALRA, S.; CHOPRA, V.; GHOSH, D.; MARTINEZ-CHAPA, S. O. Nanotechnology for COVID-19: Therapeutics and Vaccine Research. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7760– 7782, 2020.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. **J. of the Braz. Assoc. for the Adv. of Sci.**, v. 45, n. 5, p. 292-298, 1993.

MÉNARD, R.; CARMONA, E.; PLOUFFE, C.; BRÖMME, D.; KONISHI, Y.; LEFEBVRE, J.; STORER, A. C. The specificity of the S' 1 subsite of cysteine proteases. **FEBS**, v. 328, n. 1-2, p. 107-110, 1993.

MEYER, V.; STAHL, U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 68–74, 2003.

MISAS-VILLAMIL, J. C.; VAN DER HOORN, R. A. L.; DOEHLEMANN, G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902–907, 2016.

MOHAMED, M. M. SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature reviews Cancer Nat. Rev. Cancer** 2006, V. 6, n. 10, p. 764 – 775, 2006.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; RITIENI, A. & RANDAZZO, G. "Production of beauvericin by *Fusarium proliferatum* from maize in Italy". **Mycotoxin ResearchMycotoxin Res.**, v. 10, n. 2, p. 73 - 78, 1994.

MOUSSA, M. EBRAHIM, W.; BONUS, M.; GOHLKE, H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; KALSCHEUER, R.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. **RSC Advances**, v. 9, n. 3, p. 1491–1500, 2019.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, L. C. O. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão **Ciência e Agrotecnologia, Cienc. Agrotec.** v. 31, n. 5, p. 1374-1379, 2007.

NIEHAUS, E. M.; VON BARGEN, K. W.; ESPINO, J. J.; PFANNMÜLLER, A.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1749–1762, 2014.

NIWA, Y.; SUZUKI, T.; DOHMAE, N.; UMEZAWA, K. & SIMIZU, S. "Determination of Cathepsin V Activity and Intracellular Trafficking by N-glycosylation.". **FEBS Lett.**, v. 586, n. (20), p. 3601, 2012.

OLA, A. R.; THOMY, D.; LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2094–2099, 2013.

PALUDO, C. R.; SILVA-JUNIOR, E. A.; SILVA, E. O.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; PUPO, M. P.; EMERY, F. S.; GONÇALVES, N. S.; SANTOS, R. A.; FURTADO, N. A. J. C. Inactivation of  $\beta$ -Lapachone Cytotoxicity by Filamentous Fungi that Mimic the Human Blood Metabolism. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 213–220, 2017.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–20, 2019.

PENA, G. A.; SULYOK, M.; CHULZE, S. N. Effect of interacting conditions of water activity, temperature and incubation time on *Fusarium thapsinum* and *Fusarium andiyazi* growth and toxin production on sorghum grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, p. 108468, 2020.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. affecting Fruit after Harvest in Brazil. **Journal. of Phytopathology**, v. 150, n. 3, p. 128–134, 20028.

PLOETZ, R. C.; Fusarium-Induced Diseases of Tropical Perennial Crops. **The American Phytopathological SocietyPhytopathology**, v. 96, n. 6, p. 648-652, 2006

PRZYBYSZ, A.; GAWROŃSKA, H.; GAJC-WOLSKA, J. Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant: Case study. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–15, 2014.

RIEGER, P. H.; LIERMANN, J. C.; OPATZ, T.; ANKE, H.; THINES, E. Caripyrin, a new inhibitor of infection-related morphogenesis in the rice blast *fungus* *Magnaporthe oryzae*. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 6, p. 285, 2010

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146–167, 2010.

SALAS, C. E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M. C.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 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 Research**, v. 58, p. 1624–1630, 1998.

SILVA, A. D.; AMBROZIN, A.; DE CAMARGO, A.; CRUZ, F., FERREIRA, L.; KROGH, R.; SILVA, T. L. Liquid Fungal Cocultivation as a Strategy to Access Bioactive Metabolites. **Planta medica**, v. 87, n. 1-02, p. 187-195, 2021.

SILVA, A. D; AMBROZIN, A. R. P.; CARNEIRO, R. L.; VIEIRA, P. C. A new approach for identifying antagonism among fungi species and antifungal activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112960, 2020.

SILVA, G. H.; SOUZA, J. A. R.; MACEDO, W. R.; PINTO, F. G. Tyrosol, a phenolic compound from *Phomopsis* sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. **Phytochemistry Letters**, v. 43, p. 40–44, 2021.

SILVA, T. L.; TOFFANO, L.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; SOUZA, L. R. F.; VIEIRA, P. C. Mycotoxins from *Fusarium proliferatum*: new inhibitors of papain-like cysteine proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1169-1175, 2020

SINGH, V. K.; SINGH, H. B.; UPADHYAY, R. S.; Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. **Plant physiology and biochemistry, Plant Physiol. Biochem.** v. 118, p. 320, 2017,

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. Janeiro, p. 2087, 2017.

SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D.; HONN, K. V. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2483-2487, 1986.

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 antiomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of applied microbiology** J. Appl. Microbiol, v. 104, n. 3, p. 692, 2008.

SONDERGAARD, T. E.; HANSEN, F. T.; PURUP, S.; NIELSEN, A. K.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C.; GIESE, H.; SØRENSEN, J. L. Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 116–121, 2011

STUDT, L.; JANEVSKA, S.; NIEHAUS, E. M.; BURKHARDT, I.; ARNDT, B.; SIEBER, C. M. K.; HUMPF, H. U.; DICKSCHAT, J. S.; TUDZYNSKI, B. Two separate key enzymes and two pathway-specific transcription factors are involved in fusaric acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 936–956, 2016.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas. **Embrapa Amazonia Oriental**, v.1, p. 44, 2009.



TRIANDAFILLIDI, I.; SAVVIDOU, A.; KOKOTOS, C. G. Synthesis of  $\gamma$ -Lactones Utilizing Ketoacids and Trimethylsulfoxonium Iodide. **Organic Letters**, v. 21, n. 14, p. 5533–5537, 2019.

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. **European Journal of Medicinal ChemistryEur. J.Med. Chem.**, v. 126, p. 1011-1020, 2017

UEDA, K.; BEPPU, T. Antibiotics in microbial coculture. **The Journal of Antibiotics Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 361–365, 2017.

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

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. "The plant proteolytic machinery and its role in defence". **Current Opinion in Plant Biology, Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, n. 4, p. 400-407, 2004.

VASILJEVA, O.; TURK, B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsin in cancer progression: apoptosis versus tumor invasion. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 380-386, 2008.

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153-167, 2003.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. VITÓRIA': NEW PINEAPPLE CULTIVAR RESISTANT TO FUSARIOSIS, **Acta Horticulturae Acta Hortic.**, v. 822, p. 51, 2009

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–12, n. April, 2016.

WANG, J. H.; QUAN, C. S.; QI, X. H.; LI, X.; FAN, S. D. Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 5, p. 1773–1779, 2010.

WANG, J. P.; LIN, W.; WRAY, V.; LAI, D. PROKSCH, P. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begonia*. **Tetrahedron Letters**, v.54, n. 20, p.2492-2496, 2013.

WANG, M.; XIONG, Y.; LING, N.; FENG, X.; ZHONG, Z.; SHEN, Q.; GUO, S.; Detection of the dynamic response of cucumber leaves to fusaric acid using thermal imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 68-76. 2013.

WANG, W. X.; KUSARI, S.; LAATSCH, H.; GOLZ, C.; KUSARI, P.; STROHMANN, C.; KAYSER, O.; SPITELLER, M. Antibacterial Azaphilones from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 704–710, 2016.

WATSON, C. J.; KREUZALER, P. A. The role of cathepsin in involution and breast cancer. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 2, p. 171-179, 2009.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WIEDERANDERS, B.; BRÖMME, D.; KIRSCHKE, H.; FIGURA, K. V.; SCHMIDT, B.; PETERS, C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**The **J. of Biol. Chem.**, v. 267, n. 19, p. 13708-13713, 1992.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895-1897, 2008.

WU, G. Functional assays with isolated proteases. Assay development: fundamentals and practices. **Hoboken: John Wiley & Sons**, 2010.

WU, H. S.; YIN, X. M.; LIU, D. Y.; LING, N.; BAO, W.; YING, R. R.; ZHU, Y. Y.; GUO, S. W.; SHEN, Q. R. Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. **Plant and Soil**, v. 308, n. 1, p. 255, 2008

XIE, C. L.; LIU, Q.; XIA, J.; GAO, Y.; YANG, Q.; SHAO, Z. Z.; LIU, G.; YANG, X.. Anti-allergic compounds from the deep-sea-derived actinomycete *Nesterenkonia flava* MCCC 1K00610. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, p. 1–8, 2017.

XIE, L.; ZHANG, J. Z.; CAI, L.; HYDE, K. D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. **Mycology**, v. 1, n. 4, p. 242–253, 2010.

YANG, Z.; DAN, W.-J.; LI, Y.-X.; PENG, G.-R.; ZHANG, A.-L.; GAO, J.-M. Antifungal metabolites from *Alternaria atrans*: an endophytic fungus in *Psidium guajava*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 5, 2019

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BRÖMME, D. The role of cathepsin in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 7, p. 973-993, 2005.

YUEN, C. K.; LAM, J. Y.; WONG, W. M.; MAK, L. F.; WANG, X.; CHU, H.; CAI, J. P.; JIN, D. Y.; TO, K. K. W.; CHAN, J. F. W.; YUEN, K. Y.; KOK, K. H. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1418–1428, 2020.

ZHANG, Q. Y.; YANG, F. Y.; LIAO, S. G.; WANG, B.; LI, R.; DONG, Y. X.; ZHOU, M.; YANG, Y. Y.; XU, G. B. Synthesis, Antibacterial Activity, and Structure–Activity Relationship of Fusaric Acid Analogs. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 42, n. 4, p. 577–582, 2021.

ZHAO, Y.; GENG, C. A.; CHEN, H.; MA, Y. B.; HUANG, X. Y.; CAO, T. W.; HE, K.; WANG, H.; ZHANG, X. M.; CHEN, J. J. Isolation, synthesis and anti-hepatitis B virus evaluation of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Artemisia capillaris*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 7, p. 1509–1514, 2015.

ZHOU, G.; QIAO, L.; ZHANG, X.; SUN, C.; CHE, Q.; ZHANG, G.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Fusaricates H-K and fusolanones A-B from a mangrove endophytic fungus *Fusarium solani* HDN15-410. **Phytochemistry**, v. 158, p. 13–19, 2019.

ZONNO, M. C.; VURRO, M. Inhibition of germination of *Orobancha ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. **Phytoparasitica**, v. 30, n. 5, p. 519–524, 2002.

