



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS
AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA
SUL-OCIDENTAL

NATÁLIA SILVA ANDRADE

RIO BRANCO - AC
OUTUBRO - 2021

NATÁLIA SILVA ANDRADE

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS
AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA
SUL-OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientadora: Dra. Clarice Maia Carvalho

Co-orientadora: Dra. Leila Priscila Peters

RIO BRANCO - AC

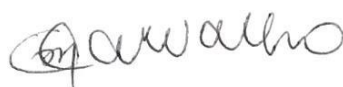
OUTUBRO – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

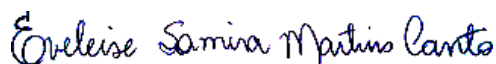
**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS
AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA
SUL-OCIDENTAL**

NATÁLIA SILVA ANDRADE

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/10/2021



Dra. Clarice Maia Carvalho
Universidade Federal do Acre - UFAC



Dra. Eveleise Samira Martins Canto
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



Dra. Ana Cláudia Alves Cortez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Vicente**
e **Maria Antonia**, à amiga **Daniela Paixão**,
e ao meu amor **Thiago Araujo**, por todo o
incentivo para realização deste trabalho.

“Os benefícios da ciência não são para os
cientistas, e sim para a humanidade”

- Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar vida e capacitar minha chegada até a conclusão deste trabalho.

À Professora Dra. Clarice Maia Carvalho, pela orientação concedida durante os dois anos de pesquisa, pela confiança em mim depositada, e pelos ensinamentos que levarei adiante.

À Professora Dra. Leila Priscila Peters, pela orientação concedida durante a pesquisa, pelo encorajamento e conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal do Acre, e ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA).

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, Vicente de Paula Sousa Andrade e Maria Antonia da Silva, por me apoiarem e incentivarem a concretizar meus objetivos.

Ao meu querido e amado, Thiago Ferreira Araujo, por todo o incentivo e por acreditar na realização de meus objetivos desde o início da pesquisa, além do suporte emocional.

À doutoranda Geyse, por ter contribuído nas técnicas de isolamento e ensaios antimicrobianos.

Ao amigo de mestrado, Gleison Rafael Mendonça Queiroz, por todo o suporte e ensinamento concedido no laboratório de Microbiologia, e pela amizade construída.

Aos amigos queridos de turma: Adevânia, Fabyana, Dheme e Jefferson, por tornarem os dias de aula mais leves, e por compartilharem os desafios acadêmicos ao longo do curso.

Ao Laboratório de Microbiologia e toda equipe: Iasminy, Bruno, Thalia, Nárcya, Rosy, Fernanda, Jusley, Laryssa e Atilon pela amizade e convivência durante a execução da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

Fungos aquáticos são abundantes e presentes nos diversos ecossistemas, atuando na degradação de substratos orgânicos submersos, ciclagem de nutrientes e produção de enzimas. Podem ter aplicações tecnológicas, na utilização para pesquisa de novos antimicrobianos, a partir de seus metabólitos secundários. O Brasil carece de estudos que mostrem a importância destes fungos, considerando a extensão das bacias hidrográficas do país, como a Amazônica, que concentra alta biodiversidade de microbiota aquática. Assim, este trabalho objetiva avaliar o potencial antimicrobiano de fungos aquáticos de igarapés urbanos da Amazônia Sul-Occidental. A dissertação é composta por dois capítulos. O Capítulo I abordou uma revisão sistemática sobre atividade biológica de fungos aquáticos, selecionando artigos publicados entre 2010-2020. Foram realizadas buscas nas bases de dados Scielo, Science Direct, Pubmed e Google Scholar, nos meses de maio a novembro de 2020, usando os descritores “biological activity of aquatic fungi”, “activity freshwater fungi”, “activity marine fungi”, “aquatic fungi and antifungal/antibacterial/anti-mycobacterial/anti-inflammatory/antitumor activity”. A seleção foi realizada com base no título e leitura de resumo, reunindo trabalhos com informações sobre atividade biológica de fungos aquáticos, a partir de seus metabólitos e aplicações tecnológicas, como critério de inclusão, sendo excluídos trabalhos duplicados entre as bases de dados, que não atendessem às necessidades de atividade biológica ou estivessem fora do período de busca. Foram encontrados 51 trabalhos compreendidos entre fungos de água doce (23,6%) e água marinha (76,4%). O gênero mais relatado para o ambiente marinho foi *Aspergillus*, e as atividades biológicas mais frequentes foram antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral. No ambiente de água doce, o gênero mais frequente foi *Penicillium*, e as atividades biológicas mais relatadas foram antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Concluiu-se que a maioria dos fungos com atividade biológica pertenciam ao ambiente marinho, e os gêneros mais frequentes para os ambientes analisados foram *Penicillium* e *Aspergillus*. A atividade biológica mais relatada foi a antibacteriana. O Capítulo II objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de fungos aquáticos de igarapés urbanos da Amazônia Sul-Occidental. 90 fungos aquáticos da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFAC foram reativados em meio BDA, com produção de extratos metabólitos utilizando solvente acetato de etila, e realizado o teste de difusão em ágar *cup plate*, contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, além dos fungos *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Os extratos com indicativo de atividade antimicrobiana foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), por meio de microdiluição em poços e concentração microbicida mínima (CMM). Foi realizada bioautografia dos três melhores extratos dos fungos com atividade antimicrobiana, mostrando as zonas de inibição com substâncias ativas, além da caracterização molecular e construção de árvore filogenética. Nos resultados, 10 (11,1%) dos 90 extratos fúngicos apresentaram atividade antimicrobiana a pelo menos um dos microrganismos testados. O fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve atividade antimicrobiana contra três microrganismos testados, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. *K. pneumoniae* foi o organismo mais sensível, e *C. tropicalis* o mais resistente. Na CIM, os fungos *Clonostachys* sp. 1 (6.106) contra *S. aureus* e *Penicillium pinophilum* (6.313) contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *C. albicans* tiveram menor valor de CIM, 0,0390 mg/mL. Na CMM, o fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve menor valor encontrado, 0,0390 mg/mL contra *S. pneumoniae*. Para leveduras, o menor valor foi de 0,0390 mg/mL para o extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) contra *C. albicans*. Na bioautografia, os três melhores extratos com atividade antimicrobiana apresentaram zonas de inibição

indicando classes de substâncias bioativas. A caracterização molecular do fungo 6.106 teve similaridade para o gênero *Clonostachys*, e do fungo 6.313 teve similaridade com a espécie *Penicillium pinophilum*. Concluiu-se que os fungos aquáticos avaliados possuem atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos de importância médica, o que abre novas perspectivas sobre o uso dos metabólitos secundários e suas potencialidades biotecnológicas.

Palavras-chave: *Penicillium pinophilum*; *Clonostachys*; *Gliocladium*; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Aquatic fungi are abundant and present in several ecosystems, act in the degradation of submerged substrates, nutrient cycling and enzyme production. They may have technological applications, in the use for researching new antimicrobials, based on their secondary metabolites. Brazil lacks studies that show the importance of these fungi, considering the extension of the country's hydrographic basins, such as the Amazon, which concentrates high biodiversity of the aquatic microbiota. Thus, this work aims to evaluate the antimicrobial potential of aquatic fungi from urban streams in the South-Western Amazon. The dissertation consists of two chapters. Chapter I addressed a systematic review of the biological activity of aquatic fungi, selecting articles published between 2010-2020. Searches were performed in the Scielo, Science Direct, Pubmed and Google Scholar databases, from May to November 2020, using the descriptors "biological activity of aquatic fungi", "activity freshwater fungi", "activity marine fungi", "aquatic fungi" and "antifungal/antibacterial/anti-mycobacterial/anti-inflammatory/antitumor activity". The selection was based on the title and abstract reading, gathering works containing information on the biological activity of aquatic fungi, from their metabolites and technological applications, as an inclusion criterion, excluding duplicated works between the databases that did not meet the needs of biological activity or were outside the search period. A total of 51 works were found, including fungi from freshwater (23.6%) and marine water (76.4%). The most reported genus for the marine environment was *Aspergillus*, and the most frequent biological activities were antibacterial, anti-inflammatory and anti-tumor. In the freshwater environment, the most frequent genus was *Penicillium*, and the most reported biological activities were antibacterial, antifungal and antitumor. It was concluded that most fungi with biological activity belonged to the marine environment, and the most frequent genera for the analyzed environments were *Penicillium* and *Aspergillus*. The most reported biological activity was antibacterial. Chapter II aimed to evaluate the antimicrobial potential of aquatic fungi from urban streams in the South-Western Amazon. 90 aquatic fungi from the collection of the UFAC Microbiology Laboratory were reactivated in PDA medium, with the production of metabolite extracts using ethyl acetate solvent and the diffusion test performed on cup plate agar, against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and bacteria *Escherichia coli*, in addition to *Candida albicans* and *C. tropicalis* fungi. The extracts with indicative of antimicrobial activity were submitted to the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) by means of microdilution in wells and minimum microbicide concentration (MMC). Bioautography of the three best extracts of fungi with antimicrobial activity was performed, from the inhibition zones with active substances, in addition to the molecular characterization of two of these fungi. In the results, 10 (11.1%) of the 90 fungal extracts showed

antimicrobial activity to at least one of the tested microorganisms. The fungus 6,313 *Penicillium pinophilum* had antimicrobial activity against three tested microorganisms, *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*. *K. pneumoniae* was the most sensitive, and *C. tropicalis* the most resistant. At CIM, the fungi *Clonostachys* sp. 1 (6,106) against *S. aureus* and *Penicillium pinophilum* (6,313) against *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *C. albicans* had lower MIC value, 0.0390 mg/mL. In CMM, the *Penicillium pinophilum* (6,313) fungus had the lowest value found, 0.0390 mg/mL against *S. pneumoniae*. For yeasts, the lowest value was 0.0390 mg/mL for the extract of the fungus *Penicillium pinophilum* (6,313) against *C. albicans*. In bioautography, the three best extracts with antimicrobial activity showed zones of inhibition indicating classes of bioactive substances. The molecular characterization of the 6,106 fungus was similar to the *Clonostachys* genus, and the 6,313 fungus was similar to the *Penicillium pinophilum* species. It was concluded that the evaluated aquatic fungi have antimicrobial activity against several microorganisms of medical importance, which opens new perspectives on the use of secondary metabolites and their biotechnological potential.

Keywords: *Penicillium pinophilum*; *Clonostachys*; *Gliocladium*; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO I – BIOLOGICAL ACTIVITY OF AQUATIC FUNGI: A SYSTEMATIC REVIEW	31
Figura 1. Flowchart of articles on biological activity of aquatic fungi.....	34
Figura 2. Frequency of works on biological activity of aquatic fungi.....	39
Figura 3. Distribution of freshwater fungi by biological activity.....	40
Figura 4. Distribution of marine water fungi by biological activity.....	41
Figura 5. Frequencies of fresh and marine water fungi reported in studies on biological activity of aquatic fungi.....	42
CAPÍTULO II - POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL	54
Figura 1. Extratos de fungos aquáticos com atividade antimicrobiana. a. <i>Clonostachys</i> sp. 1 (6.106) – <i>Staphylococcus aureus</i> ; b. <i>Clonostachys</i> sp. 1 (6.106) – <i>K. pneumoniae</i> ; c. <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313) – <i>S. aureus</i> ; d. <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313) – <i>C. albicans</i> ; e. <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313) – <i>S. pneumoniae</i> ; f. <i>Gliocladium</i> sp.1 (6.419) – <i>K. pneumoniae</i>	64
Figura 2. Macroscopia e microscopia de fungos aquáticos de igarapés urbanos com atividade antimicrobiana. 1a, 1b <i>Acremonium</i> sp.1 (6.112); 2a, 2b <i>Acremonium</i> sp. 2 (6.245); 3a, 3b <i>Acremonium</i> sp. 3 (6.253); 4a, 4b. <i>Clonostachys</i> sp.1 (6.106); 5a, 5b <i>Gliocladium</i> sp. 1 (6.419); 6a, 6b <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313); 7a, 7b <i>Penicillium</i> sp. 1 (6.327); 8a, 8b <i>Penicillium</i> sp. 2 (6.369); 9a, 9b <i>Trichoderma</i> sp (6.340). 1; 10a, 10b <i>Trichoderma</i> sp. 2 (6.380).....	66
Figura 3. Bioautografia dos metabólitos de extratos de fungos aquáticos com atividade antibacteriana. 1a. Placa de cromatografia <i>Clonostachys</i> sp.1 (6.106); 1b, 1c. Bioautografia <i>Clonostachys</i> sp. 1 (6.106) – contra <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumo</i> ; 2a. Placa de cromatografia <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313); 2b, 2c, 2d. Bioautografia <i>Penicillium pinophilum</i> (6.313) – contra <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumo</i> e <i>C. albicans</i> ; 3a. Placa de cromatografia <i>Gliocladium</i> sp. 1 (6.419); 3b, 3c. <i>Gliocladium</i> sp. 1 (6.419) – contra <i>S. pneumoniae</i> e <i>K. pneumoniae</i> . Os sistemas eluentes representados foram em hexano-acetato de etila (1:1)	67
Figura 4. Árvore filogenética por análise de Neighbor-Joining, com alinhamento de dados de sequência ITS1-5.8S-ITS2. Relação do isolado 6.106 e outras espécies recuperadas do GenBank; números nos nós mostram valores percentuais de bootstrap para ramos internos (1000 bootstraps)	68
Figura 5. Árvore filogenética por análise de Neighbor-Joining, com alinhamento de dados de sequência ITS1-5.8S-ITS2. Relação do isolado 6.313 e outras espécies recuperadas do GenBank; números nos nós mostram valores percentuais de bootstrap para ramos internos (1000 bootstraps).....	69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
REVISÃO DE LITERATURA	
Quadro 1. Mecanismos de resistência bacteriana.....	17
Quadro 2. Mecanismos de resistência às classes de antifúngicos.....	19
CAPÍTULO I - BIOLOGICAL ACTIVITY OF AQUATIC FUNGI: A SYSTEMATIC REVIEW	
Tabela 1. Pharmacological activity, fungus studied, extract / compound analyzed, main results obtained from biological activity of freshwater fungi.....	35
Tabela 2. Pharmacological activity, fungus studied, extract / compound analyzed, main results obtained from biological activity of marine fungi.....	36
CAPÍTULO II - POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL	
Tabela 1. Número do fungo, Identificação Taxonômica, Bactérias e Fungos testes para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos metabólitos de fungos aquáticos amazônicos.....	63
Tabela 2. Número do fungo, Identificação Taxonômica, Bactérias, Fungos e Drogas controle utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima de extratos metabólitos de fungos aquáticos amazônicos.....	65
Tabela 3. Análise dos fungos com melhor atividade antimicrobiana e similaridade da sequência de dados obtidos de espécies sequenciadas e depositadas no GenBank.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMM	Concentração Microbicida Mínima
COX-2	Ciclo-Oxigenase-2
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DMSO	Dimetilsulfóxido
IL-6	Interleucina – 6
ITS	Espaço Interno Transcrito
Kb	Kilobyte
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
M	Molar
MH	Müeller-Hinton
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
NO	Óxido Nítrico
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
rpm	Rotação por minuto
SD	Sabourad Dextrose
SDA	Sabourad Dextrose Ágar
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Fungos aquáticos.....	16
2. Microrganismos e mecanismos de resistência.....	17
2.1 Bactérias e resistência bacteriana.....	17
2.2 Fungos e resistência fúngica.....	19
3. Antimicrobianos e necessidade de novas drogas.....	21
4.OBJETIVOS.....	22
4.1Objetivo Geral.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO I – BIOLOGICAL ACTIVITY OF AQUATIC FUNGI: A SYSTEMATIC REVIEW.....	31
INTRODUCTION.....	32
MATERIAL AND METHODS.....	32
RESULTS AND DISCUSSION.....	33
Antibacterial activity.....	42
Antifungal activity.....	43
Anti-inflammatory activity.....	44
Antitumor activity.....	44
Anti-mycobacterial activity.....	45
CONCLUSION.....	46
ACKNOWLEDGEMENTS.....	47
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	47
FUNDING.....	47
CONFLICTS OF INTERESTING.....	47
REFERENCES.....	47
CAPÍTULO II – POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
Reativação dos fungos.....	57
Atividade antimicrobiana.....	57
Concentração Inibitória e Microbicida Mínima.....	58
Caracterização morfológica.....	59
Bioautografia.....	60
Caracterização Molecular.....	61
Extração de DNA.....	61
Amplificação por PCR.....	61
Purificação do produto amplificado e sequenciamento de DNA.....	62
Identificação dos fungos e construção da árvore filogenética.....	62

	RESULTADOS	62
	<i>Atividade antimicrobiana.....</i>	62
	<i>Concentração Inibitória e Microbicida Mínima.....</i>	64
	<i>Identificação macroscópica e microscópica.....</i>	65
	<i>Bioautografia em Camada Delgada.....</i>	66
	<i>Caracterização molecular.....</i>	67
	<i>Análise filogenética.....</i>	68
	DISCUSSÃO.....	69
	CONCLUSÃO.....	73
	CONCLUSÕES GERAIS.....	74
	AGRADECIMENTOS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

Fungos aquáticos estão presentes nos diversos ambientes, sejam eles locais de água doce ou salgada. Embora microrganismos desses ecossistemas sejam pouco estudados, o potencial biotecnológico de diversas espécies fúngicas existentes evidenciam sua importância química, ambiental e farmacológica (TAKAHASI et al., 2017).

Destacam-se pelo potencial tecnológico que possuem, considerando seus metabólitos secundários (GROSSART et al., 2019), provenientes das reações primárias necessárias a vida dos organismos, resultando em uma série de compostos orgânicos que possuem diversas atividades biológicas (CUNHA et al., 2016).

Um marco histórico na descoberta fúngica em relação aos metabólitos secundários ocorreu em 1928, com a descoberta da penicilina, pelo cientista Alexander Fleming (PEREIRA; PITA, 2005). Tal descoberta demonstrou que o fungo *Penicillium notatum* era capaz de produzir substâncias que coíbiam a proliferação bacteriana (WRIGHT et al., 2014).

Diversas atividades já foram relatadas a partir de fungos aquáticos além da bacteriana, como antifúngica (ZHUANG et al., 2011; EL-ELIMAT et al., 2014), anti-tumoral e anti-inflamatória (SARAVANAKUMAR et al., 2015; ABDEL-HADY et al., 2016; TIAN et al., 2015; FANG et al., 2016), de grande importância médica, assim como anti-micobacteriana (KOWANGA et al., 2017), evidenciando as diversas aplicações por eles desempenhadas, a partir de seus compostos naturais, que podem ser utilizados na prática clínica.

No Brasil, a região Amazônica possui uma grande microbiota aquática, e os fungos pertencentes a esta região ainda são pouco conhecidos, sendo necessário que mais estudos sejam desenvolvidos na intenção de descrever sua diversidade fúngica (CANTO et al., 2020), além da investigação de propriedades tecnológicas de acordo com seus compostos bioativos.

Diversos microrganismos são responsáveis por infecções nosocomiais, representando um grave problema de saúde pública, considerando também organismos multirresistentes (SAMPAIO et al., 2013). Com a disseminação da utilização de novos antibióticos, incluindo sintéticos, houve também o aumento da resistência a esses fármacos, observado de maneira preocupante, evidenciando o problema da resistência às drogas existentes e a dificuldade na possibilidade de tratar muitas doenças infecciosas (WHO, 2019).

Uma projeção de 2019 feita pela UN Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG), responsável pela divulgação dos relatórios da Organização Mundial da Saúde, estima que doenças resistentes a medicamentos podem causar cerca de 10 milhões de mortes a cada ano até 2050. (WHO, 2019).

Estudos mostram que as bactérias com maior incidência de multirresistência são entre as gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, e dentre as gram negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ASLAM et al., 2018; SEPTIMUS, 2018).

Em relação às leveduras, *Candida albicans* representa uma das principais causas de infecções nosocomiais fúngicas (AUSTERMEIER et al., 2020), seguida pela *Candida tropicalis*, persistente em infecções sistêmicas (MEGRI et al., 2020).

Doenças que são causadas por infecções bacterianas e fúngicas representam um sério problema em saúde pública (DE SOUZA, 2020). A exploração de novos compostos a partir de peptídeos naturais representa uma alternativa ao tratamento de infecções por essas e outras bactérias (LI et al., 2012).

Assim, o objetivo geral desse trabalho é investigar a atividade antimicrobiana de fungos aquáticos de igarapés urbanos na Amazônia Sul-Occidental.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Fungos aquáticos

Fungos aquáticos são amplamente distribuídos geograficamente, e sua caracterização ocorre de acordo com seu grau de adaptação (PARK, 1972), podendo ser considerados como residentes, completando seu ciclo de vida na água, ou transeuntes, sendo levados para esse ambiente (PEARMAN et al., 2010). Estão presentes em ecossistemas de água doce, onde atingem abundâncias relativas superiores a 50% de todas as sequências de eucariotos (MONCHY et al., 2011), residindo em habitats lênticos, como lagos e lagoas, e lóticos, como rios, córregos e pântanos (GROSSART; ROJAS-JIMENEZ, 2016).

Fungos de água doce estão representados entre os filos Basidiomycota e Ascomycota (EL-ELIMAT, 2021). Este último apresenta ainda um grupo de fungos anamórficos bastante significativo, dos hifomicetos aquáticos ou fungos Ingoldianos, conhecidos por serem ativos em substratos vegetais em decomposição, com predominância em ambientes lóticos (INGOLD, 1975; BARLOCHER, 2009, KRAUSS et al., 2011).

Fungos aquáticos também estão no ecossistema marinho (COMEAU et al., 2016), sendo encontrados em organismos hospedeiros (como esponjas marinhas) ou ambientes bentônicos, o que inclui sedimentos do fundo do mar (RICHARDS et al., 2012). Fungos marinhos são mais representativos os filos Ascomycota e Chytridiomycota. (HASSET et al., 2020).

Além de sua distribuição, esses organismos desempenham um papel importante na colonização de diversos substratos, devido sua capacidade de adaptação ao meio ambiente (JONES; PANG, 2012). Comunidades fúngicas de ambientes aquáticos são relatadas em estudos considerando sua fonte de enzimas (MAYER et al., 2013), além de relatos que incluem a existência de algumas atividades por eles desempenhadas, a partir de seus produtos naturais ativos.

Um estudo realizado com o fungo marinho *Penicillium sp.* associado a coral permitiu a descoberta de dois novos policetídeos, demonstrando atividade contra quatro estirpes bacterianas testadas (BAO et al., 2013). Dentre os ascomicetos de água doce, o fungo *Lindgomyces madisonensis* foi isolado de um substrato e seus compostos ativos foram avaliados, observando-se a existência de atividade tanto bacteriana, como antifúngica, inibindo o crescimento de *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (PAGUIGAN et al., 2015).

Atividades como anti-inflamatória e antitumoral também já foram relatadas a partir de compostos de fungos aquáticos (WU et al., 2018; ALSHERSI et al., 2020), além de antimicobacteriana, como é o caso do fungo *Penicillium chrysogenum* que foi avaliado de maneira eficaz contra estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* e mais quatro outras espécies de *Mycobacterium* (*M. avium*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis* e *M. vaccae*) (VISAMSETTI et al., 2016).

No Brasil, estudos com fungos aquáticos ainda são pouco explorados. Percorrido por uma das mais diversificadas e extensas redes fluviais do mundo, o país possui grandes bacias hidrográficas, como a Amazônica (SALGADO et al., 2018), detentora de grande biodiversidade fúngica, com muitos organismos ainda desconhecidos, demonstrando assim que a comunidade microbiana amazônica permanece pouco explorada, fazendo-se necessário mais estudos que possam descrever a diversidade de fungos pertencentes à essa região (CANTO et al., 2020).

A investigação do potencial tecnológico de fungos aquáticos, considerando suas atividades biológicas, permite a possibilidade de aplicações para fins terapêuticos, visto o cenário mundial caracterizado pela presença de patógenos multirresistentes, que apresentam comportamentos distintos quanto aos mecanismos de resistência e padrões de sensibilidade (LISBOA; NAGEL, 2011). É necessário adotar medidas de uso que sejam eficazes no combate às infecções causadas por esses microrganismos, e fungos de ambiente aquático representam uma excelente alternativa, considerando seu potencial antimicrobiano.

2. Microrganismos e mecanismos de resistência

2.1 Bactérias e resistência bacteriana

As bactérias constituem uma classe de microrganismos frequentemente associadas a infecções responsáveis por índices elevados de morbimortalidade, ocasionadas em ambientes hospitalares tanto por gram-negativas (THADEN et al. 2017; JARELL et al., 2018) como gram-positivas (KOLONITSIOU et al., 2017). O aumento de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos consiste em um desafio ao tratamento destas infecções (SANTANA et al., 2012), responsáveis por provocar 45% das mortes em países em desenvolvimento, refletido em parte pelo uso inadequado de antibióticos prescritos (NICOLINI et al., 2013). Entender esses organismos e seus mecanismos de resistência é fundamental para escolha de terapias adequadas que inibam a disseminação patogênica.

Dentre os grupos de microrganismos relacionados a infecções bacterianas resistentes, tem relevância *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (QUEIROZ et al., 2012) e *Escherichia coli* (ASLAM et al., 2018).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva presente em infecções hospitalares, responsável por números significativos de morbidade e mortalidade (MOURA et al., 2011). Infecções por esse organismo podem surgir tanto em indivíduos que já possuem fatores predisponentes, como em indivíduos saudáveis, caracterizando infecções por *S. aureus* resistente à meticilina associados à comunidade (DELEO et al., 2010).

Além de ser considerado altamente patogênico, *Staphylococcus aureus* está entre os causadores de diversos tipos de infecções, como endocardites, pneumonias e septicemias (LIMA et al., 2015).

Streptococcus pneumoniae é um patógeno oportunista gram-positivo, colonizador das superfícies mucosas do trato respiratório superior humano, sua disseminação na corrente sanguínea ocasiona doenças inflamatórias invasivas, além de ser a principal causa de infecções que incluem otite média, pneumonia adquirida na comunidade, sepse e meningite (WEISER et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno gram-negativo, com um genoma acessório de plasmídeos, o que divide suas estirpes em grupos oportunistas, hipervirulentos e multirresistentes, causa comum de infecções associadas aos cuidados de saúde, que inclui pneumonias, infecções do trato urinário (ITU's) e infecções da corrente sanguínea (MARTIN; BACHMAN, 2018).

Escherichia coli também é um patógeno gram-negativo, causa frequente de várias infecções humanas. Entre as principais patologias, estão enterites, ITU's, septicemia e demais infecções clínicas (ALLOCATI et al., 2013). *E. coli* está comumente associada a infecções gastrointestinais (CALDORIN et al., 2013), além de possuir um reservatório de genes de resistência, que dificulta um tratamento adequado (POIREL et al., 2018).

Em relação aos mecanismos de resistência microbiana, as bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos, e suas ações envolvem a indução de mutação no DNA ativo ou introdução de um DNA estranho, com genes de resistência transferidos entre gêneros ou espécies diferentes de bactérias (ANVISA, 2007).

Com a rápida adaptação do genoma bacteriano frente às condições ambientais, os mecanismos de defesa que são desempenhados, como rearranjo genômico, recombinação, conduzem à evolução microbiana (DARMON; LEACH, 2014; STRAUME et al., 2015). O

Quadro 1 reúne informações sobre mecanismos os quais bactérias podem adquirir resistência.

Quadro 1. Mecanismos de resistência bacteriana.

Mecanismo de resistência	Definição	Autor/ano
Transdução	Transferência de informação genética de uma célula doadora a uma célula receptora através de um bacteriófago.	Ventola et al., 2015
Conjugação	Bactérias realizam a transferência de DNA por interação física, transferindo plasmídeo de uma célula para outra.	Munita; Arias, 2016
Transformação	Bactéria recebe partes de DNA de outra bactéria dispersa no meio, englobando em seu material genético frações de DNA adquiridas.	Straume, 2015
Transposição	Fragmentos de DNA (transpósons), que podem estar inseridos em plasmídeos ou cromossomos bacterianos, são transferidos entre bactérias de espécies diferentes.	Oliveira et al., 2009

2.2 Fungos e resistência fúngica

Cerca de 600 espécies de fungos são consideradas patógenos humanos (MAYER et al., 2013). Entre os fungos oportunistas, um dos mais importantes são *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (MENEZES et al., 2013). Outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* também promovem a ocorrência de infecções fúngicas sistêmicas (BRUNKE; HUBE, 2013; HANI et al., 2015).

Candida albicans se destaca dentre os fungos que ocasionam infecções fúngicas, conseguindo sobreviver em ambientes estressantes, através da formação de biofilmes, além de ser um patógeno bastante comum, causador de infecções mucocutâneas de indivíduos saudáveis (KHRISNASAMY et al., 2019). *C. albicans* é uma levedura polimórfica que faz parte da microbiota humana. Em condições normais, reside no corpo humano, entretanto pode ocasionar infecções que variam de superficiais a sistêmicas (MAYER et al., 2013).

Sua invasão ocorre comumente através das células epiteliais por meio de dois mecanismos: endocitose por indução de células hospedeiras e penetração ativa através de

hifas (WÄCHTLER et al., 2011, 2012). Pode ocasionar candidíases orais, gastrointestinais e vaginais, sendo esta última responsável por acometer cerca de 70 a 75% das mulheres ao menos uma vez na vida durante a idade fértil (SUSTR et al., 2020), com episódios de casos recorrentes atingindo cerca de 138 milhões de mulheres por ano (DENNING et al., 2018; YANO et al., 2019).

Outra espécie de *Candida* com importância médica é a *Candida tropicalis* (CORDEIRO et al., 2003). Frequentemente relatada em casos de candidíase invasiva e candidemia que variam geograficamente, especialmente na América Latina e Ásia (TAN et al., 2016; DA MATTA et al., 2017), comum ainda em infecções orais (LUBIAN et al., 2010), estando entre as espécies de *Candida* mais importantes em termos de epidemiologia e virulência (ZUZA-ALVES et al., 2017; ROCHA, et al., 2021).

C. tropicalis produz infecções sistêmicas que podem ser mais persistentes do que *C. albicans*, prolongando o período de internação decorrente da mesma (KONTOYANNIS et al., 2001; ZUZA-ALVES et al., 2017). Estudos já demonstraram sua resistência às classes de antifúngicos disponíveis, tais como os derivados azólicos, anfotericina B e equinocandinas (KAKATI et al., 2015; SENEVIRATNE et al., 2016).

Os mecanismos de resistência fúngica utilizam processos moleculares, podendo ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo, permitindo sua resistência antes mesmo de haver exposição ao antifúngico, caso da *C. krusei*, resistente intrinsecamente a fluconazol (ARTHINGTON-SKAGGS; REX, 2008). Já a adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram resistência posterior à exposição ao antifúngico, relacionada a mutações em genes específicos para sua ação (MCCARTHY et al., 2017).

A resistência aos antifúngicos existentes está associada ao aumento de infecções fúngicas causadas por muitos desses organismos que apresentam capacidade de mudança fenotípica, levando em conta fatores como a espécie do fungo, tamanho de suas populações, capacidade que possuem de adaptar-se aos diversos ambientes, além da formação de biofilmes (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). O Quadro 2 demonstra mecanismos de resistência às principais classes de antifúngicos existentes.

Quadro 2. Mecanismos de resistência às classes de antifúngicos

Classe de antifúngico	Mecanismo de resistência	Autor/ano
Polienos Anfotericina B Nistatina	Mutação no gene ERG 3, com substituição do ergosterol.	Peman et al., 2009
Azóis Fluconazol Itraconazol	Mutações que modificam o alvo (Itraconazol ou CYP51); Mutações no gene ERG11, com a enzima C-14- α desmetilase e sua alteração no sítio alvo de ligação dos azóis; Indução das bombas de efluxo pelos genes CDR e MDR; Permeabilidade diminuída da membrana plasmática à droga.	Sanguinetti et al., 2015
Flucitosina	Falha na transformação da flucitosina em metabólitos ativos; Mudanças na enzima citosina permease, responsável pela absorção da droga dentro da célula.	Espinel-Ingroff, 2008
Equinocandinas Casposfungina	Mutações no FKS1 (β -1,3 glucano sintase).	Pontón; Quindós, 2006

Embora muitos agentes antifúngicos estejam disponíveis para tratamento clínico, o aumento da resistência dos fungos, especialmente espécies de *Candida* às drogas disponíveis, requer o desenvolvimento de novos compostos seguros e não tóxicos com modos de ação eficazes para tratamento contra microrganismos resistentes (TURECKA et al., 2018).

3. Antimicrobianos e necessidade de novas drogas

Antimicrobianos são agentes farmacológicos de origem natural ou sintética, sendo usuais tanto na prática clínica, como na medicina comunitária (VIEIRA E VIEIRA, 2017). Entretanto, sua distribuição irregular e não direcionada implicam um gasto econômico significativo aos sistemas de saúde (LIMA, 2018).

Fatores como uso prolongado e inadequado de antimicrobianos, falta de informação da população, além da poluição causada ao ambiente com o descarte inadequado desses medicamentos em locais como solo e água, por exemplo, contribuem para o aumento da resistência a eles (MICHAEL et al., 2014; PAVYDE et al., 2015; KAAE et al., 2017).

Os antibióticos são a classe de antimicrobianos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias, com redução mundial de taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções (DA COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017), sendo capazes de inibir a reprodução das bactérias ou mesmo causar sua destruição (SAMPAIO, et al., 2018).

Vários antibióticos já foram descobertos a partir de produtos naturais microbianos, como por exemplo: beta-lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (FERNANDES, 2006; NUSSBAUN et al., 2006; BRÖTZ-OESTERHELT et al., 2008).

O uso irregular e indiscriminado de fármacos promove a seleção natural de resistência bacteriana frente aos antibióticos (DA COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017), assim como aos antifúngicos, evidenciando a necessidade de pesquisa por novas fontes de drogas que sejam capazes de eliminar organismos resistentes. O primeiro composto de importância médica e econômica derivado de um fungo aquático, é a Cefalosporina C, antibiótico de amplo espectro isolado de *Acremonium chrysogenum* (ABRAHAM, 1979).

Fungos aquáticos são fontes promissoras de metabólitos biologicamente ativos, e assim como a penicilina foi o primeiro metabólito fúngico eficaz contra microrganismos e que permitiu a produção em larga escala de um dos primeiros medicamentos na década de 40 (SPECIAN et al., 2014), estudos com produtos naturais a partir de fungos aquáticos também relacionam componentes que apresentam potencial antimicrobiano (LIMBADRI et al., 2018; LIU et al., 2019), além das demais atividades relatadas.

Fica clara a necessidade de investigação de metabólitos secundários produzidos por fungos aquáticos que possam desempenhar aplicações biotecnológicas de interesse industrial, possibilitando a utilização e desenvolvimento de novos produtos com ação antimicrobiana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antimicrobiana de fungos aquáticos de igarapés urbanos da Amazônia Sul-Occidental.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por fungos aquáticos frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, e aos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima dos extratos de fungos aquáticos com atividade antimicrobiana;
- Realizar bioautografia dos extratos de fungos aquáticos com atividade antimicrobiana;
- Realizar a caracterização molecular dos fungos aquáticos com atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HADY, H. et al. Identification and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Penicillium islandicum* and *Aspergillus tamarii* ethyle acetate extracts. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 2021-2039, 2016.

ABRAHAM, E. P. A. Glimpse of the Early History of the Cephalosporins, **Reviews of Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 99-105, 1979.

ALLOCATI, N. et al. *Escherichia coli* in Europe: an overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235-6254, 2013.

ALSHERSI, S. et al. “LAMA-1: A Cerebroside Isolated from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum*.” *Metabolites*, v. 10, n. 2, 2020.

ANVISA. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: < https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm >. Acesso em: 13 ago. 2020.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; REX, J.H. Resistance to Antifungal Agents. In: FONG, I. W., DRLICA, K. **Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century**. Emerging Infectious Diseases of the 21st Century. Boston: MA, p. 325-367, 2008.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.

AUSTERMEIER, S. et al. I want to break free – macrophage strategies to recognize and kill *Candida albicans*, and fungal counter-strategies to escape. **Current Opinion on Microbiology**, v. 58, p. 15-23, 2020.

BAO, J. et al. Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, p. 219–223, 2013.

BARLOCHER, F. Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 3-8, 2009.

BRÖTZ-OESTERHELT, H; BRUNNER N. A. How many modes of action should an antibiotic have?. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8 n. 5, p. 564-73, 2008.

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 3, p. 701-708, 2013.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 110, p. 4-20, 2013.

CANTO, E. S. M. et al. Composition and Diversity of Fungal Decomposers of Submerged Wood in Two Lakes in the Brazilian Amazon State of Pará. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-9, 2020.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 28, 2018.

COMEAU, A. M. et al. Novel chytrid lineages dominate fungal sequences in diverse marine and freshwater habitats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

CORDEIRO, S. N. et al. Hábitos de higiene e sexuais de mulheres com vulvovaginites recorrentes. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 15, n. 2, p. 15-19, 2003.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DA MATTA, D. A. et al. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 24, p. 2-14, 2017.

DARMON, E.; LEACH, D. R. Bacterial genome instability. **Microbiology and Molecular Biology Review.**, v. 78, n. 1, p.1-39, 2014.

DE SOUZA, H. P. et al. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil de 2010 a 2017: aspectos para vigilância em saúde. **Revista panamericana de salud publica**, v. 44, p.1-7, 2020.

DELEO, N. N. et al. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**. v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, 2010.

DENNING D.W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 339-347, 2018.

EL-ELIMAT, T. et al. Freshwater Fungi as a Source of Chemical Diversity: A Review. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 898-916, 2021.

EL-ELIMAT, T. et al. Isochromenones, isobenzofuranone, and tetrahydronaphthalenes produced by *Paraphoma radicina*, a fungus isolated from a freshwater habitat. **Phytochemistry**, v. 104, p. 114-120, 2014.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.

FANG, W. et al. Asperpyrone-Type Bis-Naphtho- γ -Pyrones with COX-2-Inhibitory Activities from Marine-Derived Fungus *Aspergillus niger*. **Molecules**, v. 21, n.7, p. 1-8, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, 1497-503, 2006.

GROSSART, H. P. et al. Fungi in aquatic ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 339–354, 2019.

GROSSART, H. P.; ROJAS-JIMENEZ, K. Aquatic fungi: Targeting the forgotten in microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 140-145, 2016.

HANI, U. et al. Candidiasis: a fungal infection--current challenges and progress in prevention and treatment. **Infection Disorders Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 42-52, 2015.

HASSET, B. T. et al. "Global diversity and geography of planktonic marine fungi". **Botanica Marina**, v. 63, n. 2, p. 121-139, 2020.

INGOLD, C. T. **An Illustrated Guide to Aquatic and Water-borne Hyphomycetes (Fungi Imperfecti) with notes on their Biology**. Cumbria: Freshwater Biological Association, 1975. 98p.

JARRELL, A. S. et al. Factors associated with in-hospital mortality among critically ill surgical patients with multidrug-resistant Gram-negative infections. **Journal of Critical Care**, v. 43, p. 321–326, 2018.

JONES, E. B. G.; PANG, K.-L. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403–2423, 2012.

KAAE, S. et al. Antibiotic knowledge, attitudes and behaviours of Albanian health care professionals and patients-a qualitative interview study. **Journal of Pharmaceutical Policy and Practice**, v. 10, n. 1, 2017.

KAKATI, B. et al. Fluconazole Resistant *Candida* Oesophagitis in Immunocompetent Patients: Is Empirical Therapy Justifiable?. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 12, 2015.

KOLONITSIOU, F. et al. Trends of Bloodstream Infections in a University Greek Hospital during a Three-Year Period: Incidence of Multidrug-Resistant Bacteria and Seasonality in Gram-negative Predominance. **Polish Journal of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 171-180 2017.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1676–1681, 2001.

KOWANGA, K. D. et al. Antimycobacterial and cytotoxic activities of extracts from fungal isolates of Lake Magadi. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2430-2441, 2017.

KRAUSS, G. J. et al. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. 620–651, 2011.

KRHISNASAMY, L. et al. Phylogenetic characterization of biofilm forming multidrug resistant *Candida albicans* and Non albicans *Candida* causing vulvovaginal candidiasis, **Gene Reports**, v. 19, p. 1-6, 2019.

LI, Y. et al. Overview on the recente study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanism and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012.

LIMA, H. K. S. et al. Distribuição e custo de antimicrobianos na Atenção Primária. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 95-101, 2018.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Revista Uningá**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LIMBADRI, S. et al. Bioactive Novel Indole Alkaloids and Steroids from Deep Sea-Derived Fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

LISBOA, T. NAGEL, F. Infecção por patógenos multi-resistentes na UTI: como escapar? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 120-124, 2011.

LIU, Y. J. et al. Antimicrobial Secondary Metabolites from the Seawater-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* SW9. **Molecules**, v. 24, n. 24, 2019.

LUBIAN, C. T. et al. Antifungal activity of the aqueous extract from *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) on oral *Candida* species. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 2, 2010.

MARTIN, R. M; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 8, n. 4, 2018.

MAYER, F. L. et al. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCCARTHY, M. et al. Future Research Priorities in Fungal Resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 3, p. 484-492, 2017.

MEGRI, Y. et al. *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. **Antimicrobial Resistance Infection & Control**, v. 9, n. 50, 2020.

MENEZES, E. A. et al. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, p. 49-55, 2013.

MICHAEL, C. A. et al. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 145, 2014.

MONCHY, S. et al. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1433-1453, 2011.

MOURA, J. S. D. et al. Fatores de risco associados à infecção e mortalidade por *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em um hospital de referência para doenças infectocontagiosas de Goiânia-GO, Brasil. **O mundo da saúde**, v. 35, n. 1, p. 84-90, 2011.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 963-76, 2011.

NICOLINI, P. et al. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, 2013.

OLIVEIRA, J. H. et al., Ácido Clavulânico e cefamicina: Uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação, **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142, 2009.

PAGUIGAN, N. D. et al. Acetophenone derivatives from a freshwater fungal isolate of recently described *Lindgomyces madisonensis* (G416). **Phytochemistry**, v. 126, p. 59-65, 2016.

PARK, D. On the ecology of hetrotrophic micro-organisms in freshwater. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 58, n. 2, p. 291-299, 1972.

PAVYDE, E. et al. Public Knowledge, Beliefs and Behavior on Antibiotic Use and Self-Medication in Lithuania. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 6, p.7002-7016, 2015.

PEARMAN, J. et al. Fungi in aquatic habitats near St Andrews in Scotland. **Mycosphere**, v. 1, p. 11-21, 2010.

PEMAN, J. et al. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453-460, 2009.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina ao Prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PFALLER, M.A. et al. Results from the ARTEMIS disk global antifungal Surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1366–1377, 2010.

POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

PONTÓN, J.; QUÍNDOS, G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. **Medicina Clínica**, v. 126, p. 56-60, 2006.

QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132-138, 2012.

RICHARDS, T. A. et al. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, n. 1, 2012.

ROCHA, W. R. V. et al. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021.

SALGADO, A. A. R. et al. Grandes capturas fluviais no Brasil: Síntese das novas descobertas. **Estudos do Quaternário**, v. 19, p. 23-31, 2018.

SAMPAIO, P. S. et al. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 15-22.

SANGUINETTI, M. et al. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 8, n. 52, p. 2-13, 2015.

SANTANA, T. C. F. S. et al. Prevalence and bacterial resistance in urinary tract infections in São Luis, MA, Brazil in the period from 2005 to 2008. **Journal of Tropical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 409-418, 2012.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 3, p. 199-212, 2015.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: An antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819-829, 2018.

SHEARE, C. A. et al. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 49-67, 2007.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STRAUME, D. et al. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 371-380, 2015.

SUSTR, V. et al. Vulvovaginal Candidosis: Current Concepts, Challenges and Perspectives. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, 2020.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAN, T. Y., et al. Antifungal susceptibility of invasive *Candida* bloodstream isolates from the Asia-Pacific region. **Medical Mycology**, v. 54, p. 471-477, 2016.

THADEN, J. T. Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, 2017.

TIAN, Y. Sydoxanthone C and acremolin B produced by deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 703-706, 2015.

TURECKA, K. et al. Antifungal Activity and Mechanism of Action of the Co (III) Coordination Complexes With Diamine Chelate Ligands Against Reference and Clinical Strains of *Candida* spp. **Frontiers on Microbiology**, v. 9, 2018.

VENTOLA C, L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**. v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VIEIRA, P. N.; VIEIRA, S. L. V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 3, 2017.

VISAMSETTI, A. et al. *Penicillium chrysogenum* DSOA associated with marine sponge (*Tedania anhelans*) exhibit antimycobacterial activity. **Microbiology Research**, v. 185, p. 55-60, 2016.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival?. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006.

WÄCHTLER, B. C. et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration induced endocytosis and host factors on the infection process. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

WÄTCHLER, B. C. et al. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.

WEISER, J. N. et al. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018.

World Health Organization. UN Interagency Coordination Group on AMR (IACG). 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/public-discussion-leaders-group/en/>> Acesso em: Jul. 2020.

WRIGHT, P. M. et al. The Evolving Role Of Chemical Synthesis In Antibacterial Drug Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840-8869, 2014.

WU, Z et al. Brasilane sesquiterpenoids and dihydrobenzofuran derivatives from *Aspergillus terreus* [CFCC 81836]. *Phytochemis*, v. 156, n. 159-166, 2018.

YANO, J. et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: Incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Women's Health* v. 19, p. 1-9, 2019.

ZHUANG, Y. et al. New Quinazolinone Alkaloids within Rare Amino Acid Residue from Coral-Associated Fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. **Organic Letters**, v. 13, n. 5, p. 1130-1133, 2011.

ZUZA-ALVES, D. L. et al. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-19, 2017.

CAPÍTULO I

BIOLOGICAL ACTIVITY OF AQUATIC FUNGI: A SYSTEMATIC REVIEW

*Artigo submetido à revista **Current Microbiology – Qualis B1**

Postgraduate Program in Science, Innovation and Technology for the Amazon, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil

Natália Silva Andrade

Center for Health Sciences and Sports, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

Leila Priscila Peters

Center for Biological and Nature Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

Clarice Maia Carvalho

ABSTRACT

Fungi from aquatic environments are relevant and have several biotechnological potentials, arousing industrial interest owing to the production of secondary metabolites. Although studies on the investigation of aquatic fungi and their compounds are scarce, many of them have demonstrated diverse biological activities, providing evidence of their clinical importance. The objective of this study was to select articles published between 2010 and 2020 that reported the existence of biological activity of aquatic fungi. A bibliographic survey was carried out between the months of May and November 2020 in the Scielo, Science Direct, Pubmed and Google Scholar databases to gather publications in Portuguese and English on the biological activity of aquatic fungi in the afore-mentioned years. The following descriptors were used: “biological activity of aquatic fungi”, “activity fungi freshwater”, “activity fungi marine”, “aquatic fungi and antifungal/antibacterial/antimycobacterial/anti-inflammatory/antitumor activity”. The selection was based on title and abstract reading. The studies that met the inclusion criteria contained information on the biological activity of aquatic fungi, based on their metabolites and technological applications. Studies were excluded if they were duplicated in different databases, did not meet the needs of biological activity or were published outside the search period. There was a total of 51 studies conducted with freshwater (23.6%) and marine (72.4%) fungi, described according to pharmacological activity, species, extract/compound, main findings on biological activity and author/year. It was concluded that most fungi with biological activity belonged to the marine environment. The most prevalent genera were *Penicillium* in fresh water and *Aspergillus* in sea water. In both environments, the most reported activity was antibacterial.

Keywords: marine fungus, antibacterial, *Penicillium*.

INTRODUCTION

Fungi play an important role in different ecosystems, including aquatic environments, where they are universally distributed (JONES; PANG, 2012). Aquatic fungi are those that depend on the aquatic habitat in part or throughout their life cycle (GROSSART et al., 2019). Most of them are comprised between the phyla Ascomycota and Chytridiomycota, while the Basidiomycota phylum is less representative (VALDERRAMA, 2016).

Studies aimed at understanding the biodiversity and distribution of aquatic fungi demonstrate their abundance both in marine environments and in freshwater locations (JONES et al., 2011; RICHARDS et al., 2012; GLADFELTER et al., 2019). However, information on these fungi is limited, which indicates a scarcity of related studies, as shown by the lack of standardized assays using aquatic fungi as test species (ITTNER et al., 2018).

Fungal communities in aquatic environments are ecologically important. However, they have also been researched because of interest from the industry with possible biotechnological application, especially in the field of health, as it is a new ecological niche (TAKAHASHI et al., 2017). Previous studies have reported several activities attributed to this group of microorganisms, e.g., antibacterial (BAO et al., 2013), antifungal, antitumor (FELÍCIO et al., 2015), antimycobacterial (VISAMSETTI et al., 2016), among others. Such exploration consists of benefits that can be used for therapeutic purposes.

Although they are recognized as important microorganisms, more complex studies on aquatic fungi are still needed, for example, on their characterization, quantitative abundance and functionality (which is poorly studied to date) (GROSSART; ROJAS-JIMENEZ, 2016), in addition to the use of their metabolites for the production of biological agents.

By highlighting the biotechnological potential and production of active compounds by this group of microorganisms, this paper aimed to carry out a systematic review of studies on the biological activity of aquatic fungi published between the years 2010-2020.

MATERIALS AND METHODS

In the period from May to November 2020, a survey of articles that addressed the biological activity of aquatic fungi was carried out. The virtual libraries were consulted Science Direct, Google Scholar, Scielo e PubMed, using as search terms “biological activity

of aquatic fungi”, “activity fungi freshwater”, “activity fungi marine”, “aquatic fungi and antifungal/antibacterial/anti-mycobacterial/anti-inflammatory/antitumor activity”.

Articles published in English and Portuguese between 2010 and 2020 were selected. The selection was based on the title and abstract reading, analyzing the works that presented information on the biological activity of aquatic fungi, considering their metabolites and technological applications. As inclusion criteria, studies published between 2010 and 2020 were used, describing the existence of biological activity of fungi from aquatic environments, based on their secondary metabolites. In the exclusion criteria, articles that were duplicated in the database or that did not have information that demonstrated the existence of biological activity from aquatic fungi were not considered.

The articles were systematized in the Excel program, containing information regarding the species of aquatic fungus, extract/compound, biological activity and author/year of publication. Subsequently, the information was organized into tables and graphs for descriptive analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 1,399 articles were found in the searched databases, 651 in Google Scholar, 629 in Pubmed, 92 in Science Direct and 27 in Scielo, published between 2010 and 2020. Of these, 161 were selected for analysis, after reading the title and checking for duplicity, meeting the requirement of biological activity from aquatic fungus, present in fresh or marine water.

After reading the abstract, 119 articles were selected, and after reading and detailed analysis of the works, 51 articles referring to the biological activity of aquatic fungi were included. The flowchart that demonstrates the steps of identification, selection and inclusion of jobs is in Figure 1.

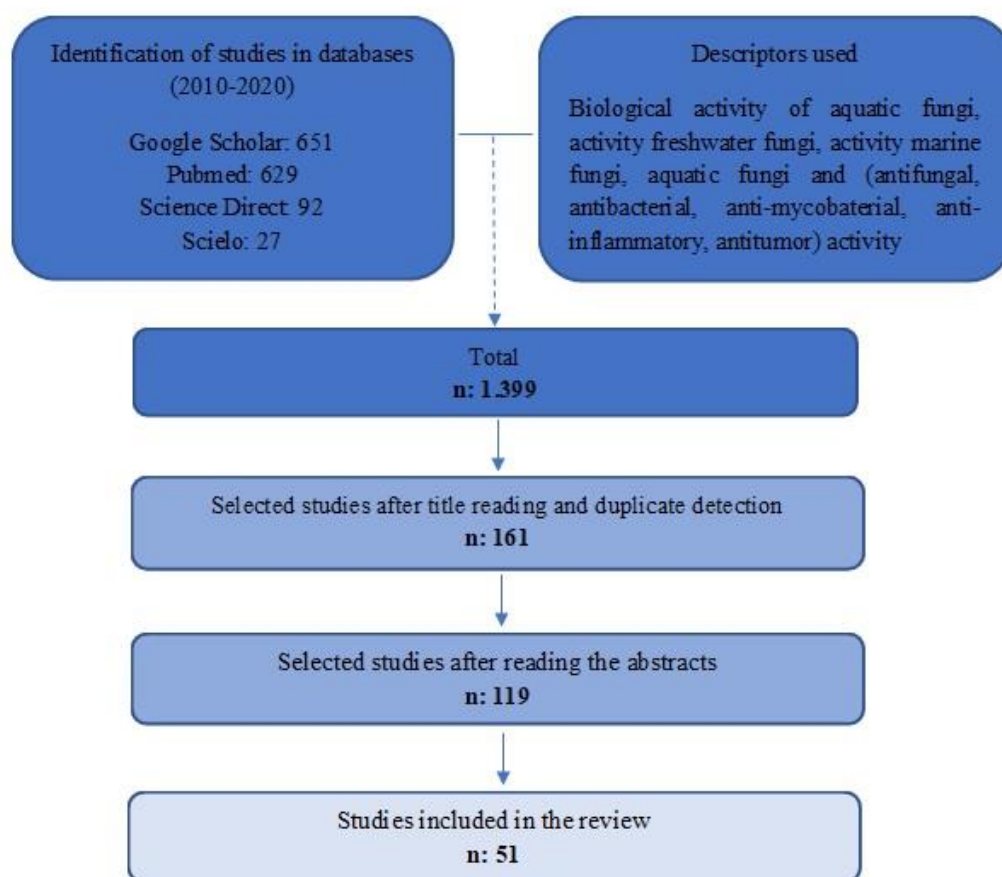


Figure 1. Flowchart of articles on biological activity of aquatic fungi.

From the 51 selected articles, 12 were from freshwater fungi (23.6%) and 39 from marine water (76.4%). The works were organized in two tables, for freshwater fungi (Table 1) and marine water fungi (Table 2) according to pharmacological activity, studied fungus, analyzed extract/compound, main results and author and year of publication of the work.

Table 1. Pharmacological activity, fungus studied, extract / compound analyzed, main results obtained from biological activity of freshwater fungi.

Pharmacological activity	Fungi	Extract/compound	Results	Reference
Antibacterial	<i>Delitschia corticola</i>	Isoamericanic acid A Caffeic acid	Activity against <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	SUN et al., 2011
	<i>Chaetomium</i> sp.	Chaetones A – F	Activity against <i>S. aureus</i>	SHEN et al., 2012
	<i>Paraphoma radicina</i>	Isochromenone derivatives	Activity against <i>S. aureus</i>	EL-ELIMAT et al., 2014
	<i>Lindgomyces madisonensis</i>	Madisone, 4'-methoxymadisonone and dihydroallovisnaginone	Activity against <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	PAGUIGAN et al., 2016
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Speramide A	Activity against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CHANG et al., 2016
	<i>Penicillium</i> sp.	Tanzawaic acid, benzoquinone	Activity against <i>S. aureus</i>	ABDELWAHAB et al., 2018
	<i>Penicillium</i> sp.	Peninaphones A – C	Activity against <i>S. aureus</i>	ZHENG et al., 2019
Antifungal	<i>Ophioceras dolichostomum</i>	Ophiocerol, Isoamericanic acid A, Caffeic acid	Activity against <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	DONG et al., 2010
	<i>Delitschia corticola</i>	Isoamericanic acid, caffeic acid	Activity against <i>Alternaria</i> sp., <i>Esclerocio</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	SUN et al., 2011
	<i>Paraphoma radicina</i>	Isochromenone derivatives	Activity against <i>Cochliobolus miyabeanus</i>	EL-ELIMAT et al., 2014
	<i>Lindgomyces madisonensis</i>	Madison, 4'-methoxymadisonone, dihydroallovisnaginone	Activity against <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>	PAGUIGAN et al., 2016
	<i>Clavariopsis aquatica</i>	Clavariopsin	Activity against <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i>	SOE et al., 2019
Antitumor	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Diketopiperazines	Activity against cell lines SF-268, MCF-7, NCI-H460, HepG2	WANG et al., 2012
	<i>Chaetomium</i> sp.	Chaetone	Activity against cell lines A549, Raji, HepG2, MCF-7, HL-60.	SHEN et al., 2012
	<i>Penicillium islandicum</i>	Ethyl acetate extract	Activity against cell lines HepG2, MCF-7	ABDEL-HADY et al., 2016
	<i>Penicillium</i> sp.	Benzoquinones	Activity against cell line L5178Y	ABDELWAHAB et al., 2018

Antimycobacterial	<i>Lindgomyces madisonensis</i>	Madisona, 4'-metoximadisona, dihidroallovistinaginona	Activity against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	PAGUIGAN et al., 2016
	<i>Helicoon richonis</i>	Ethyl acetate extract	Activity against <i>M. madagascariense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	KOWANGA et al., 2017

Table 2. Pharmacological activity, fungus studied, extract / compound analyzed, main results obtained from biological activity of marine fungi.

Pharmacological activity	Fungi	Extract/compound	Results	Reference
Antibacterial	<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergiterpenoid A, (-) - sydonol, (-) – sydonic acid, (-) - 5- (hidroximetil) -2- (2', 6', 6'-trimetiltetra-hidro-2H-piran-2-il) fenol	Activity against <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus tetragenus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>V. anguillar</i>	LI et al., 2012
	<i>Trichoderma aureoviride</i>	Tricodermaquinone, tricodermaxantone	Activity against <i>S. aureus</i> meti-cilin resistant	KHAMTONG et al., 2012
	<i>Penicillium</i> sp.	Acid D, secalonic acid B, penicillixanthone A	Activity against <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	BAO et al., 2013
	<i>Penicillium</i> sp.	Penicifuran A	Activity against <i>S. aureus</i>	QI et al., 2013
	<i>Cladosporium</i> sp.	Malettinin E	Activity against <i>Xanthomonas campestris</i>	SILBER et al., 2014
	<i>Paecilomyces</i> sp.	Betulin	Activity against <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Salmonella typhi</i>	BARAKAT; SALEH, 2016
	<i>Trichoderma</i> sp.	Alternariol 1'-hidroxi-9-metil éter	Activity against <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	ZHANG et al., 2017
	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	Isocoumarins, Benzophenone derivatives	Activity against <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>	LIU et al., 2017
	<i>Penicillium</i> sp.	Penicillilactone A	Activity against <i>V. harveyi</i>	YOUNG LIU et al., 2018
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigatoside F, Fumiquinazoline G	Activity against <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>S. aureus</i>	LIMBADRI et al., 2018
	<i>Arthrimum</i> sp.	4-hidroxi-2-piridon arthpironas F-I; apiosporamide	Activity against <i>S. aureus</i>	BAO et al., 2018
	<i>Aspergillus flavipes</i>	Ethyl acetate extract	Activity against <i>V. harveyi</i>	GUO et al., 2019
	<i>Aspergillus sydowii</i>	2- (4-hidroxibenzil) -4- (3-acetil) quinazolinone, sesquiterpenes, alcaloid	Activity against <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pneumoniae</i>	LIU et al., 2019
	<i>Penicillium crustosum</i>	Ethyl acetate extract	Activity against <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMER et al., 2019

Antifungal	<i>Aspergillus insuetus</i>	Insufetolide A; Sesquiterpens: strobilactone A; (E, E)-6-(60,70-di-hidro- xi-20,40-octadienoil)-obilobilone A	Activity against <i>Neurospora crassaw</i>	COHEN et al., 2011
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Quinazolinone	Activity against <i>C. albicans</i>	ZHUANG et al., 2011
	<i>Cladosporium</i> sp.	Maletin B and C	Activity against <i>C. albicans</i>	SILBER et al., 2014
	<i>Penicillium</i> sp.	Terretrione D, Terretrione C	Activity against <i>C. albicans</i>	SHAALA; YOUSSEF, 2015
	<i>Pleosporales</i> sp.	Pleosporaline E	Activity against <i>C. albicans</i>	CHEN et al., 2015
	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	Isocoumarin	Activity against <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	LEI et al., 2017
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigatoside E	Activity against <i>Fusarium oxysporum</i>	LIMBADRI et al., 2018
Antitumor	<i>Aspergillus insuetus</i>	Insufetolide C, sesquiterpens: (E) -6- (40-hidroxi-20-butenoil) -obilobilone A, (E, E) -6- (60,70-di-hidroxi-20,40-octadienoil) -obilobilone A	Activity against cell line MOLT-4	COHEN et al., 2011
	<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergiterpenoid A, (-) - sydonol, (-) – sydonic acid, (-) - 5- (hidroximetil) -2- (2 ' , 6 ' , 6'-trimetiltetra-hidro-2H-piran-2-il) fenol	Activity against cells lines HL-60 and A-549.	LI et al., 2012
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Auranomide B	Activity against cell line HepG2	SONG et al., 2012
	<i>Penicillium paneum</i>	Penipacids A and E, analogue	Activity against cells lines RKO and Hela	LI et al., 2013
	<i>Hypocrea lixii</i>	Acid methyl ester 16-mehylheptadecanoic (HDA) and acide 9,12-octadecadienoic (ODA)	Activity against cells lines KB and A431	SARAVANAKUMAR et al., 2015
	<i>Penicillium crustosum</i>	Ethyl acetate extract	Activity against cells lines SCC, MCF-7 and Caco	AMER et al., 2019
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ergosterol, epidioxyergosterol	Activity against cells lines A-549, DU-145, MCF-7 and HepG2	ALSHERSI et al., 2020
Anti-inflammatory	<i>Penicillium</i> sp.	Metilpenicilone	Activity against NO, PGE2, iNOS and COX-2	KIM et al., 2014
	<i>Aspergillus flocculosus</i>	Preussin C-K	Activity against IL-6	GU et al., 2015
	<i>Pleosporales</i> sp.	Pleosporins	Activity against lipopolysaccharid and induced by IL-6 production	CHEN et al., 2015
	<i>Aspergillus</i> sp.	Diorcinol, cordyol C, 3,7-diidroxi-1,9-dimetil dibenzofurane	Activity against COX-2	TIAN et al., 2015
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Crisamide C	Activity against IL-6	CHEN et al., 2016

	<i>Aspergillus niger</i>	Aurasperone F, Aurasperone C, Asperpirones A	Activity against COX-2	FANG et al., 2016
	<i>Phoma</i> sp.	Pleosporalins A–C	Activity against IL-6	WU et al., 2017
	<i>Chondrostereum</i> sp.	Chondroterpens A, B, H, Hirsutanol A, Condrosterins A, B	Activity against NO	HSIAO et al., 2017
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspervesiamides B, C, F, G	Activity against iNOS	LI et al., 2018
	<i>Penicillium</i> sp.	7-acetoxydehydroausti-nol, Austinolide, 7-acetoxydehydroaustin, 11-hydroxyisoaustinone, 11-acetoxyisoaustinone	Activity against NO	PARK et al., 2018
	<i>Aspergillus terreus</i>	Luteroeto E	Activity against NO	LIU et al., 2018
	<i>Aspergillus terreus</i>	Brasilanones A and E	Activity against NO	WU et al., 2018
Antimycobacterial	<i>Trichoderma</i> sp.	Trichoderins A, A1 and B	Activity against <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	PRUKSAKORN et al., 2010
	<i>Emericella varicolor</i>	Ophiobolin K, 6-epi-ophiobolin K, 6-epi-ophiobolin G	Activity against <i>M. smegmatis</i>	ARAI et al., 2012
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ethyl acetate extract	Activity against <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i>	VISAMSETTI et al., 2016
	<i>Aspergillus</i> sp.	Gliotoxin, 12,13-dihydroxy-fumitremorgin C, helvoic acid	Activity against <i>M. tuberculosis</i>	LUO et al., 2017
	<i>Arthrinium</i> sp.	4-hidroxy-2-pyridone arthpyrones F-I; apiosporamide	Activity against <i>M. smegmatis</i>	BAO et al., 2018
	<i>Gliocladium</i> sp.	Ergosterol-5, 8-peroxid	Activity against <i>M. tuberculosis</i>	Uc-CACHÓN et al., 2019
	<i>Penicillium</i> sp.	Ketidocillinones B and C	Activity against <i>M. phlei</i>	SHAH et al., 2020

The highest number of citations was related to antibacterial activity, both in fresh and marine water fungi (32.3%), followed by antifungal activity (18.5%), considering both environments. The activity with the lowest number of works found was anti-mycobacterial (13.8%) (Figure 2).

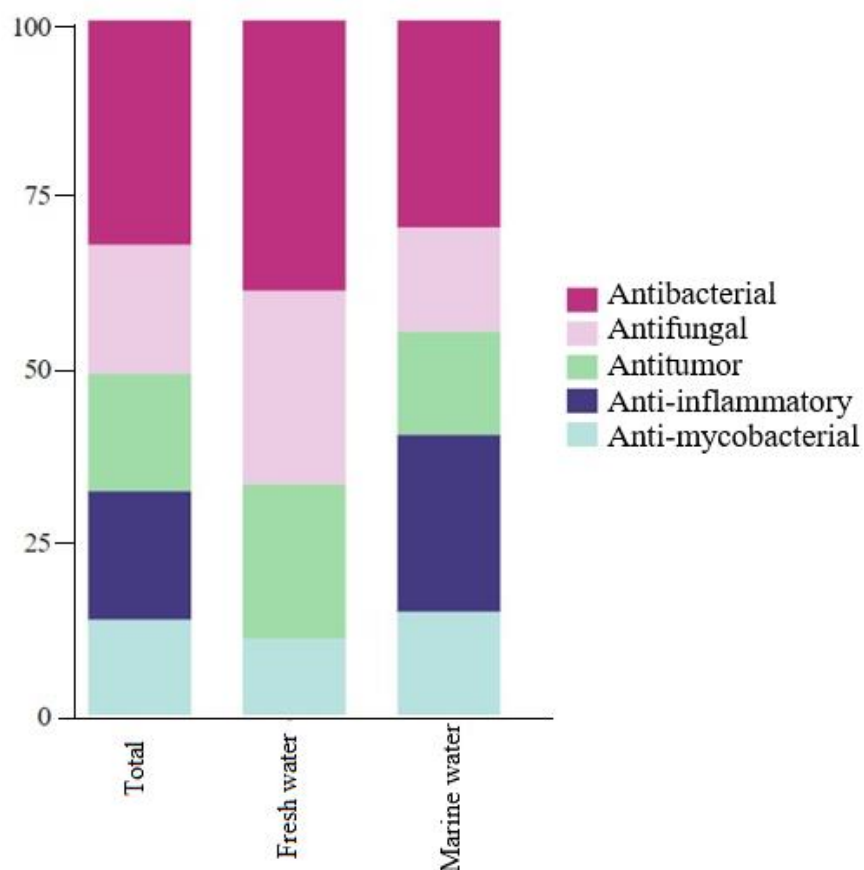


Figure 2. Frequency of works on biological activity of aquatic fungi.

Regarding the biological activity of freshwater fungi, 38.9% of the studies reported the existence of antibacterial activity, 27.8% of antifungal activity, 22.2% of antitumor activity, 11.1% of anti- mycobacterial, and no studies were found that reported anti-inflammatory activity in freshwater fungi. The distribution of freshwater fungi by type of activity reported is shown in Figure 3.

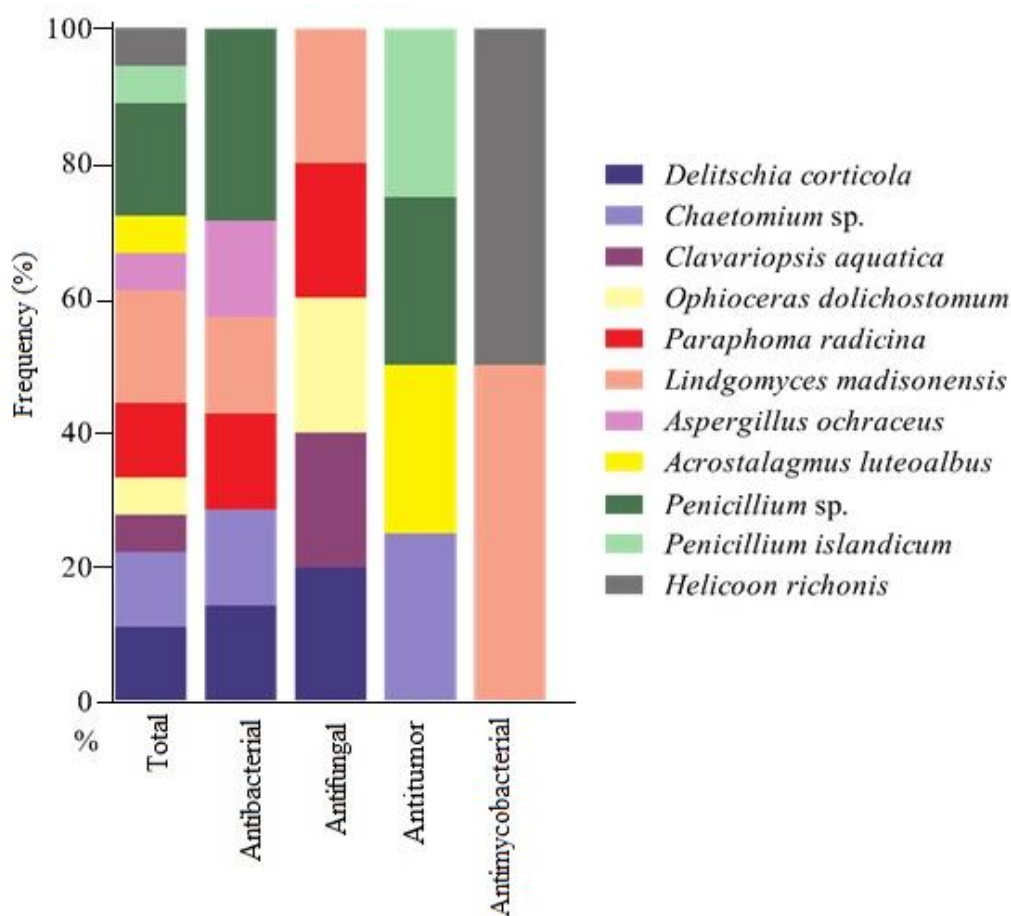


Figure 3. Distribution of freshwater fungi by biological activity.

Regarding biological activity for marine fungi, the most reported was also antibacterial activity, 29.8%, followed by anti-inflammatory activity with 25.5%, and the other activities (antifungal, antitumor and anti-inflammatory) had a frequency of 14.9% each. Figure 4 shows the list of fungi distributed for each activity reported, and Figure 5 represents all fungal species that were found in freshwater and marine environments, totaling 37 species among the collected works.

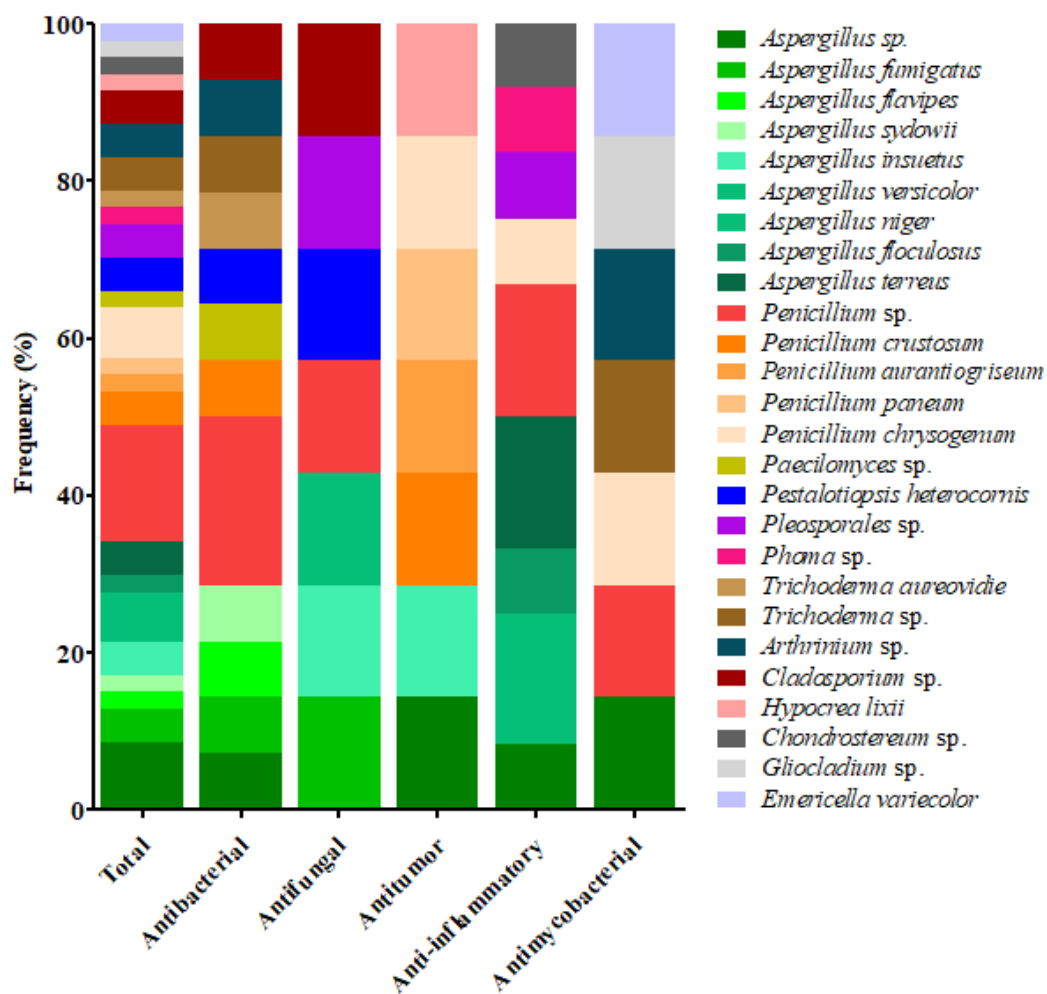


Figure 4. Distribution of marine water fungi by biological activity.

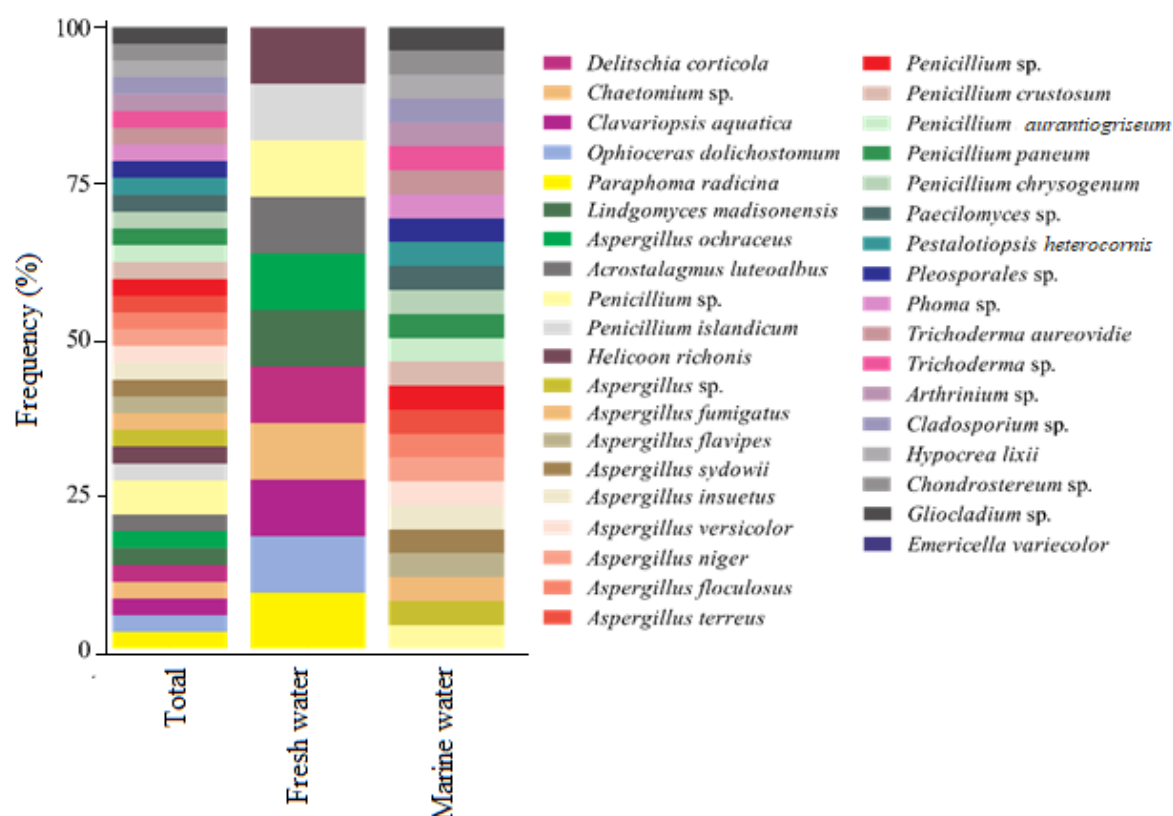


Figure 5. Frequencies of fresh and marine water fungi reported in studies on biological activity of aquatic fungi.

Antibacterial activity

Among the studies that reported antibacterial activity of aquatic fungi, 33.3% focused on fungi isolated from fresh water while 66.7% were isolated from sea water fungi. Of such studies, 28.5% reported fungi of the genus *Penicillium* (BAO et al., 2013; QI et al., 2013; ABDELWAHAB et al., 2018; YOUNG LIU et al., 2018, AMER et al.; ZHENG et al., 2019).

Of the bacteria inhibited in antibacterial activity tests, *Staphylococcus aureus* was the most cited: 71.4% of the papers about antibacterial activity, followed by *Escherichia coli* (23.8%) and *Bacillus subtilis* (23.8%). As reported by previous studies, the main activity that was evaluated was against strains of *S. aureus* (SUN et al., 2011; SHEN et al., 2012; KHAMTONG et al., 2012; LI et al., 2012; QI et al., 2013; EL-ELIMAT et al., 2014; PAGUIGAN et al., 2016; ZHANG et al., 2017; LIU et al., 2017; LIMBADRI et al., 2018; BAO et al., 2018; ABDELWAHAB et al., 2018; ZHENG et al., 2019; LIU et al., 2019 and AMER et al., 2019), which reinforces the importance of finding measures that inhibit this

pathogen, which is responsible for a large number of infections acquired in the community and in hospitals (TAYLOR; UNAKAL, 2017).

In one of these studies, after the characterization of structurally new metabolites of aquatic fungi, two new compounds could be isolated: isochromenone and hydronaphthalenone (Table 1), from the cultivated extract of the aquatic fungus *Delitschia corticola*, which showed antibacterial activity against the strains tested in the study (SUN et al., 2011). A study with the marine fungus *Trichoderma aureoviride* showed antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (KHAMTONG et al., 2012).

Antifungal activity

Among the studies retrieved for antifungal activity, 41.7% focused on fungi isolated from fresh water while 58.3%, on sea water fungi. The fungal genus predominantly reported in the selected studies was *Aspergillus* (25%), especially in the marine environment, especially the species *Aspergillus insuetus* (COHEN et al., 2011), *Aspergillus versicolor* (ZHUANG et al., 2011) and *Aspergillus fumigatus* (LIMBADRI et al., 2018).

Among the fungi that were inhibited in antifungal tests, *Candida albicans* was the most tested; it was reported in 50% of the selected studies (SILBER et al., 2014; ZHUANG et al., 2014, PAGUIGAN et al., 2016, SHAALA; YOUSSEF, 2015; CHEN et al., 2015; LEI et al., 2017). The second most inhibited fungus was *Alternaria* sp., corresponding to 16.6% of the papers (DONG et al., 2010 and SUN et al., 2011).

One of the most important opportunistic fungal pathogens is *Candida albicans*, which is able to commensally colonize the gastrointestinal tract, mouth, skin and urogenital system (NAGLIK et al., 2011). It can also cause infections, especially among people with weakened immune systems, attacking the skin, mucosa, membranes; penetrating the blood; and attacking arteries and organs (FISHER et al., 2011).

A new macrolide belonging to the fresh water fungus *Ophiocera dolichostomum* was identified, and it was shown to have nematicidal and antifungal activity against some pathogens (DONG et al., 2010). Acetophenone derivatives have recently been described from the fungal isolate *Lindgomyces Madisonensis*, which demonstrated activity against fungi and bacteria. Malettinin E was described by Silber et al. (2014), based on compounds produced by the fungus *Cladosporium* sp., and it demonstrated antifungal and antibacterial activity. Studies such as these support the need to investigate promising aquatic fungi and their antifungal activities.

Anti-inflammatory activity

No studies were found to report anti-inflammatory activity of fresh water fungi. However, there were 11 studies assessing this activity in the marine environment. The most frequent genus was *Penicillium* (27.2%), with *Penicillium* sp. (KIM et al., 2014; PARK et al., 2018) and *Penicillium chrysogenum* (CHEN et al., 2016) followed by the species *Aspergillus terreus* (16.8%) (LIU et al., 2018; WU et al., 2018). Other studies with the genus *Aspergillus* were also found: *Aspergillus flocculosus* (8.33%), *Aspergillus niger* (8.33%) and *Aspergillus versicolor* (8.33%).

Among the most frequently tested markers are nitric oxide (NO), present in 45.4% of the studies (KIM et al., 2014; HSIAO et al., 2017; PARK et al., 2018; LIU et al., 2018; WU et al., 2018), followed by Interleukin-6 (IL-6), accounting for 36.3% (GU et al., 2015; CHEN et al., 2015, 2016; WU et al., 2017). COX-2 was evaluated in 27.2% of the selected studies (KIM et al., 2014; TIAN et al., 2015; FANG et al., 2016).

As noted, most works with anti-inflammatory activity show activity against nitric oxide. The production of NO is important for the body's defense, but its overproduction implies the emergence of human pathologies; therefore, NO blocking agents are beneficial in the response to the treatment of inflammation (BERNARDES et al., 2014). Research on the fungus *Aspergillus versicolor*, using the compound Aspersiamide (G), found activity against inducible nitric oxide synthase (iNOS), which catalyzes the production of NO, showing that it is potentially relevant to the development of new anti-inflammatory agents for the treatment of diseases and other associated disorders (LI et al., 2018).

Antitumor activity

Among the studies on antitumor activity, 36.3% were conducted in fresh water and 63.3% in sea water. One of the most studied genera in the two environments is *Penicillium* (54.6%). The following species were found: *Penicillium islandicum* (ABDEL-HADY et al., 2016), *Penicillium* sp. (ABDELWAHAB et al., 2018), *Penicillium aurantiogriseum* (SONG et al., 2012), *Penicillium paneum* (LI et al., 2013), *Penicillium crustosum* (AMER et al., 2019) and *Penicillium chrysogenum* (ALSHERSI et al., 2020). Then, 18.1% of the studies described the genus *Aspergillus*: *A. insuetus* (COHEN et al., 2011) and *Aspergillus* sp. (LI et al., 2012).

Among the most frequently tested cell lines, HepG2 was present in 45.4% of the studies (WANG et al., 2012; SHEN et al., 2012; ABDEL-HADY et al., 2016; SONG et al., 2012; ALSERSI et al., 2020).

The second most tested cell line was MCF-7, present in 45.4% of the studies (WANG et al., 2012; SHEN et al., 2012; ABDEL-HADY et al., 2016; AMER et al., 2019; ALSHERSI et al., 2020).

HepG2 is a human liver cancer cell line that is widely used in pharmacotoxicological research (DONATO; GOMÉZ-LECHON, 2014). A recent study among the selected works demonstrated that the fungus *Acrostalagmus luteoalbus*, particularly its compound diketopiperazine, was able to exhibit antitumor activity against this and three other cell lines (A-549, DU-145 and MCF-7). This result was evidence of a significant antitumor potential from his natural product (WANG et al., 2012). Another fungus that was less observed in the studies but was also present was the freshwater fungus *Chaetomium* sp., which showed activity against five tumor cell lines: A-549, Raji, HepG2, MCF-7 and HL-60 (SHEN et al., 2012).

Antimycobacterial activity

For this activity, 22.2% of the studies were conducted in fresh water while 77.8%, in marine water. Among the existing fungal genera, the most studied was *Penicillium* (22.2%), with *Penicillium chrysogenum* (VISAMSETTI et al., 2016) and *Penicillium* sp. (SHAH et al., 2020). Other species also had antimycobacterial activity, such as marine fungi *Emericella varicolor* (ARAI et al., 2012) and *Arthrinium* sp. (BAO et al., 2018), and fresh water fungi *Lindgomyces Madisonensis* (PAGUIGAN et al., 2016) and *Helicoon richonis* (KOWANGA et al., 2018).

Among the tested mycobacteria, two were the most studied: *Mycobacterium smegmatis*, with five studies (55.5%) on activity against this organism (PRUKSAKORN et al., 2010; VISAMSETTI et al., 2015; LUO et al., 2017; Uc-CAHÓN et al., 2019), and *Mycobacterium tuberculosis*, with four studies (44.4%) on the same activity (PRUKSAKORN et al., 2010; ARAI et al., 2012; VISAMSETTI et al., 2015; BAO et al., 2018).

The etiological agent of tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, remains a worrisome public health problem worldwide. According to the epidemiological bulletin of Brazil's Ministry of Health published in 2018, about ten million people in the world became

will from tuberculosis and 1.5 million people died as a result of it. Tuberculosis is the leading cause of death from a single infectious agent (MS, 2020).

In one of the studies, the fungus *Penicillium chrysogenum* (isolated from sea sponge *Tedania anhelans*) underwent different culture conditions. In addition to high antibacterial activity, its extracts showed mycobacterial activity against strains of *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis*, among other microorganisms (VISAMSETTI et al., 2015).

There may occur multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis*, owing to inappropriate and uncontrolled use of antibacterial drugs (VISWANATHAN et al., 2014). The quest for alternative compounds that can be effective for the bacillus that causes TB also includes research on metabolic products from aquatic fungi, which, as noted, consists of promising studies on antimycobacterial activity.

CONCLUSION

Based on the evaluation of the selected studies, it can be inferred that the inhalants marine environment has the highest prevalence of studies on aquatic fungi. In this environment, the most reported activity was antibacterial, followed by anti-inflammatory one. The most reported genus was *Aspergillus*.

In the freshwater environment, the activity most frequently studied was also the antibacterial one, and unlike the marine environment, no papers were found to describe anti-inflammatory activity. The second highest activity reported was antifungal, followed by antitumor one. *Penicillium* was the most reported genus for fresh water.

Considering the most described activity for both environments, which was the antibacterial one, the microorganism *Staphylococcus aureus* was the most tested, followed by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. For antifungal activity, the second most described one, also considering the two environments, *Candida albicans* was the most tested for this activity, followed by *Alternaria sp.*

For anti-inflammatory activity, the most tested markers were nitric oxide, Interleukin-6 and COX-2. In antitumor activity, the most tested cell lines were HepG2 and MCF-7. For antimycobacterial activity, the most tested strains were those from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*.

The study of aquatic fungi and their secondary metabolites with antimicrobial activity supports the importance of further studies in this field. There is a need for investment in research on active fungal metabolites that inhibit or destroy these pathogenic

microorganisms, which sometimes cause a series of diseases of worldwide importance. Such research may help reduce harmful actions to human health, such as infections and mortality.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Bibliographic research, article writing and data analysis: Natália Silva Andrade

Critical review of the article: Leila Priscila Peters

Article idea, article writing and data analysis: Clarice Maia Carvalho

FUNDING

The authors received no specific funding for this work.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES

- Abdel-Hady H, El-Wakil EA, Helmy EAM (2016) Identification and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Penicillium Islandicum* and *Aspergillus Tamaritii* ethyle acetate extracts. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5(9): 2021-39. <https://dx.doi.org/10.20959/wjpps20169-7674>
- Abdelwahab MF, Fouad MA, Kamel MS, Özkaya FC, Kalscheuer R, Müller WEG, Lin W, Liu Z, Ebrahim W, Daletos G, Proksch P (2018) Tanzawaic acid derivatives from freshwater sediment-derived fungus *Penicillium* sp. Fitoterapia 128: 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.019>
- Alshersi S, Malatani RT, Bogari HA, Noor AO, Ibrahim AK, Elhady SS, Abdelhameed RFA (2020) “LAMA-1: A Cerebroside Isolated from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum*.” Metabolites 10(2). <https://doi.org/10.3390/metabo10020075>
- Amer MS, Ellatif HAH, Hassan SWM, Aboelela GM, Gad AM (2019) Characterization of some fungal strains isolated from the Eastern coast of Alexandria, Egypt, and some

applications of *Penicillium crustosum*. Egyptian of Aquatic Research 45(3): 211-17. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.06.006>

Arai M, Niikawa H, Kobayashi M (2012) Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. Journal of Natural Medicines 67(2): 271-275. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0676-5>

Bao J, Sun Y-L, Zhang X-Y, Han, H-C, Qian P-Y, Qi S-H (2013) Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. The Journal of Antibiotics. 66:219–23. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.110>

Bao J, Zjai H, Zhu K, Yu J-H, Zhang Y, Wang Y, Jiang C-S, Zhang Y, Zhang H (2018) Bioactive Pyridone Alkaloids from a Deep-Sea-Derived Fungus *Arthrinium* sp. UJNMF0008. Marine Drugs 16(5). <https://doi.org/10.3390/md16050174>

Barakat K, Saleh M (2016) Bioactive Betulin produced by marine *Paecilomyces* WE3-F. Journal of Applied Pharmaceutical Science 6(3): 461-468. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60306>

Chang YW, Yuan C, Zhang J, Liu S, Cao P, Hua H, Di Y, Hao X (2016) Speramides A-B, two new prenylated indole alkaloids from the freshwater-derived fungus *Aspergillus ochraceus* KM007. Tetrahedron Letters 57(45): 4952-4955. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2016.09.071>

Chen S, Wang J, Lin X, Zhao B, Wei X, Li G, Kaliaperumal K, Liao S, Yang B, Zhou X, Liu J, Xu S, Liu Y (2016) Chrysamides A–C, Three Dimeric Nitrophenyl trans-Epoxyamides Produced by the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO41001. American Chemical Society 18(15): 3650-53. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01699>

Chen CJ, Zhou YQ, Liu XX, Zhang WJ (2015) Antimicrobial and anti-inflammatory compounds from a marine fungus *Pleosporales* sp. Tetrahedron Letters 56(45): 6183-6189. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.09.079>

Cohen E, Koch L, Thu MK, Rahamin Y, Aluma Y, Ilan M, Yarden O, Carmeli S (2011) Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. collected along the coast of Israel. Bioorganic & Medicinal Chemistry 19(22): 6587-93. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.045>

Dong JY, Wang L, Song HC, Wang LM, Shen KZ, Sun R, Li GH, Li L, Zhang KQ (2010) Ophiocerol, a novel macrocyclic neolignan from the aquatic fungus *Ophioceras dolichostomum* YMF1.00988. Natural Product Research 24(11): 1004-1012. <https://doi.org/10.1080/14786410902854126>

El-Elimat T, Raja HA, Figueroa M, Falkinham JO, Oberlies NO (2014) Isochromenones, isobenzofuranone, and tetrahydro- naphthalenes produced by *Paraphoma radicina*, a fungus isolated from a freshwater habitat. Phytochemistry 104: 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.006>

Fang W, Lin X, Wang J, Liu Y, Tao H, Zhou X (2016) Asperpyrone-Type Bis-Naphtho- γ -Pyrone with COX-2-Inhibitory Activities from Marine-Derived Fungus *Aspergillus niger*. Molecules 21(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070941>

Felicio, R, Pavão GB, Oliveira ALA, Erbert C, Conti R, Pupo MT, Furtado NAJC, Ferreira EG, Costa-Lotufo LV, Young MCM, Yokoya NS, Deboni HM (2015) Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). *Revista brasileira de farmacognosia* 25(6): 641-650. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.003>

Fisher JF, Kavanagh K, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA (2011) *Candida* Urinary Tract Infection: Pathogenesis. *Clinical Infectious Diseases* 52(6): 437–451. <https://doi.org/10.1093/cid/cir110>

Gladfelter AS, James TY, Amend, AS (2019) Marine fungi. *Current Biology* 29(6): 191-95. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.009>

Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT (2014) Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. *Reviews in Toxicology* 31(2): 149-156.

Grossart HP, Rojas-Jimenez K (2016) Aquatic fungi: Targeting the forgotten in microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* 31: 140-45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.016>

Grossart HP, Wyngaert S, Kagami M, Cunliffe M, Jimenez KR (2019) Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 17: 339-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0175-8>

Gu BB, Jiao FR, Wu W, Jiao WH, Li L, Sun F, Wang SP, Yang F, Lin HW (2015) Preussins with Inhibition of IL-6 Expression from *Aspergillus flocculosus* 16D-1, a Fungus Isolated from the Marine Sponge *Phakellia fusca*. *Journal of Natural Products* 81(10): 2275-81. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00662>

Guo L, Zhang F, Wang X, Chen H, Wang Q, Guo J, Cao X, Wang L (2019) Antibacterial activity and action mechanism of questin from marine *Aspergillus flavipes* HN4-13 against aquatic pathogen *Vibrio harveyi*. *Biotech* 9(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1535-1>

Hsiao G, Chi WC, Pang KL, Chen JJ, Kuo YH, Wang YK, Cha HJ, Chou SC, Lee TH (2017) Hirsutane-Type Sesquiterpenes with Inhibitory Activity of Microglial Nitric Oxide Production from the Red Alga-Derived Fungus *Chondrostereum* sp. NTOU4196. *Journal of Natural Products* 80(5): 1615–1622. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00196>

Ittner LD, Junghans M, Werner I (2018) Aquatic Fungi: A Disregarded Trophic Level in Ecological Risk Assessment of Organic Fungicides. *Frontiers in Environmental Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00105>

Jones EBG, Pang KL (2012) Tropical aquatic fungi. *Biodiversity and Conservation* 21(9): 2403-23.

Jones EBG (2011) Fifty years of marine mycology. *Fungal Diversity* 50(73). <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0119-8>

Khamtong N, Rukachaisirikul V, Tadpetch K, Kaewpet M, Phongpaichit S, Preedanon S, Sakayaroj J (2012) Tetrahydroanthraquinone and Xanthone Derivatives from the Marine-

Derived Fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95. Archives of Pharmacal Research 35(3): 461-468. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0309-2>

Kim DCC, Lee HS, Ko W, Lee DS, Sohn JH, Yim YC, Oh H (2014) Anti-inflammatory effect of methylpenicillin from a marine isolate of *Penicillium* sp. (SF-5995): inhibition of NF- κ B and MAPK pathways in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages and BV2 microglia. Molecules 19(11): 18073-89. <https://doi.org/10.3390/molecules191118073>

Kowanga KD, Munissi JJE, Masalu R, Nyandoro SS, Masimba P, Gatebe E (2017) Antimycobacterial and cytotoxic activities of extracts from fungal isolates of Lake Magadi. International Journal of Biological Chemistry 11(5): 2430-41. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i5.38>

Lei H, Lin X, Han L, Ma J, Ma Q, Zhong J, Liu Y, Sun T, Wang J, Huang X (2017) New Metabolites and Bioactive Chlorinated Benzophenone Derivatives Produced by a Marine-Derived Fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. Marine Drugs 15(3). <https://doi.org/10.3390/md15030069>

Li D, Xu Y, Shao CL, Yang RY, Zheng CJ, Chen YY, Fu XM, Qian Y, She Z-G, Voogd NJ, Wang CY (2012) Antibacterial bisabolane-type sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. Marine Drugs 10(1): 234-241. <https://doi.org/10.3390/md10010234>

Li CS, Li XM, Gao SS, Wang BG (2013) Cytotoxic Anthranilic Acid Derivatives from Deep Sea Sediment-Derived Fungus *Penicillium paneum* SD-44. Marine Drugs 11(8): 3068-76. <https://doi.org/10.3390/md11083068>

Li H, Sun W, Deng M, Zhou Q, Liu J, Chen C, Qi C, Luo Z, Xue H, Zhang Y (2018) Aspersiamides, Linearly Fused Prenylated Indole Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. Journal of Organic Chemistry 83(15): 8483-92. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01087>

Limbadi S, Luo X, Lin X, Liao S, Wang J, Zhou X, Yang B, Liu Y (2018) Bioactive Novel Indole Alkaloids and Steroids from Deep Sea-Derived Fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012. Molecules 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092379>

Liu M, Sun W, Wang J, He Y, Zhang J, Li F, Qi C, Zhu H, Xue Y, Hu Z, Zhan Y (2018) Bioactive secondary metabolites from the marine-associated fungus *Aspergillus terreus*. Bioorganic Chemistry 80: 525-530. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.029>

Liu Y, Ding L, Fang F, He S (2018) Penicillilactone A, a novel antibacterial 7-membered lactone derivative from the sponge-associated fungus *Penicillium* sp. LS54. Natural Product Research 33(17): 2466-70. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1452012>

Liu. YJ, Zhang JL, Li, C, Mu XG, Liu XL, Wang L, Zhao YC, Zhang P, Li XD, Zhang XX (2019) Antimicrobial Secondary Metabolites from the Seawater-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* SW9. Molecules 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244596>

Luo, X, Zhou X, Lin X, Qin X, Zhang T, Wang J, Tu Z, Yang B, Liao S, Tian Y, Pang X, Kaliyaperumal K, Li JL, Tao H, Liu Y (2017) Antituberculosis compounds from a deep-sea-

derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. Natural Product Research, 31(6): 1-5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1266353>

Naglik JR, Moyes DL, Wächter B, Hube B (2011) *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. Microbes and Infection 13: 963-976. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.009>

Paguigan ND, Raja HA, Day CS, Oberlies NH (2016) Acetophenone derivatives from a freshwater fungal isolate of recently described *Lindgomyces madisonensis* (G416). Phytochemistry 126: 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.03.007>

Park JS, Quang TH, Yoon C-S, Kim HJ, Sohn JH, Oh H (2018) Furanoaustinol and 7-acetoxydehydroaustinol: new meroterpenoids from a marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5497. The Journal of Antibiotics 71: 557–563. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0034-2>

Pruksakorn P, Arai M, Kotoku N, Vilchèze C, Baughn AD, Moodley P, Jacobs WR, Kobayashi M (2010) Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20(12): 3658-63. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.100>

Qi J, Shao CL, Li ZY, Gan LS, Fu XM, Zhao HY, Wang CY (2013) Isocoumarin Derivatives and Benzofurans from a Sponge-Derived *Penicillium* sp. Fungus. Journal of Natural Products 76(4): 571-79 <https://doi.org/10.1021/np3007556>

Richards TA, Meredith DM, Jones GL, Bass D (2012) Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. Annual Review of Marine Science 4(1): 449-522. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100802>

Romo JA, Kumamoto CA (2020) On Commensalism of *Candida*. Journal of Fungi (Basel) 6(1):16. <https://doi.org/10.3390/jof6010016>

Saravanakumar K, Vivek R, Boopathy NS (2015) Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*, Journal of Applied Biomedicine 13(3): 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.001>

Shaala LA, Youssef DTA (2015). Identification and Bioactivity of Compounds from the Fungus *Penicillium* sp. CYE-87 Isolated from a Marine Tunicate. *Marine Drugs* 13:1698-1709. <https://doi.org/10.3390/md13041698>

Shah M, Sun C, Sun Z, Zhang G, Che Q, Gu Q, Zhu T, Li D (2020) Antibacterial Polyketides from Antarctica Sponge-Derived Fungus *Penicillium* sp. HDN151272. *Marine Drugs* 18(2). <https://doi.org/10.3390/md18020071>

Shen KZ, Gao S, Gao YX, Wang AR, Xu YB, Sun R, Hu PG, Yang GF, Li AJ, Zhong D, Liu H-Y, Dong JY (2012) Novel dibenzo[b,e]oxepinones from the freshwater-derived fungus *Chaetomium* sp. YMF 1.02105. *Planta Medica* 78(17): 1837- 43. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327828>

Silber J, Ohlendorf B, Labe A, Wenzel-Storjoham A, Näther C, Imhoff JF (2014) Malettinin E, an antibacterial and antifungal tropolone produced by a marine *Cladosporium* strain. *Frontiers in Marine Science* 1(35). <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00035>

Soe TW, Han C, Fudou R, Kaida K, Sawaki Y, Tomura T, Ojika M (2019) Clavariopsins C–I, Antifungal Cyclic Depsipeptides from the Aquatic Hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Journal of Natural Products* 82(7): 1971–78. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00366>

Song F, Ren B, Yu K, Chen C, Guo H, Yang N, Gao H, Liu X, Liu M, Tong Y, Dai H, Bai H, Wang J, Zhang L (2012) Quinazolin-4-one coupled with pyrrolidin-2-iminium alkaloids from marine-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum*. *Marine Drugs* 10(6):1297–1306. <https://doi.org/10.3390/md10061297>

Sun R, Gao YX, Shen KZ, Xu YB, Wang CR, Liu H-Y, Dong JY (2011) Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. *Phytochemistry Letters* 4(2): 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.12.001>

Takahashi JA, Lima GS, Dos Santos, GF, Lyra FH; Da Silva Hughes AF, Gonçalves FAG (2017) Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. *Revista Virtual de Química* 9(6): 2351–82.

Taylor TA, Unakal CG (2021) *Staphylococcus Aureus*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/> Accessed 12 Jan 2021

Tian Y, Qin X, Lin X, Kaliyaperumal K, Zhou X, Liu J, Ju Z, Tu Z, Liu Y (2015) Sydoxanthone C and acremolin B produced by deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. *The Journal of Antibiotics* 68: 703–706. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.55>

Uc-Cachón AH, Gamboa-Angulo M, Borges-Argáez R, Reys-Estebanez M, Said-Fernández S, Molina-Salinas GM (2019) Antitubercular activity of the Fungus *Gliocladium* sp. MR41 Strain. *Iranian Journal Pharmaceutical Research* 18(2): 860–866. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100667>

Valderrama B, Paredes-Valdez G, Rodríguez R, Romero-Guido C, Martínez F, Martinez-Romero J, Guerrero S, Mendonza-Herrera A, & Folch-Mallol, JL (2016) Assessment of non-cultured aquatic fungal diversity from different habitats in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(1):18–28. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.013>

Visamsetti A, Ramachandran SS, Kandasamy D (2016) *Penicillium chrysogenum* DSOA associated with marine sponge (*Tedania anhelans*) exhibit antimycobacterial activity. *Microbiological Research* 185: 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.001>

Viswanathan V, Vigneswari A, Selvan K, Satyavani K, Rajeswari R, Kapur A (2014) Effect of diabetes on treatment outcome of smear-positive pulmonary tuberculosis--a report from South India. *Journal of Diabetes and its Complications* 28(2): 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.12.003>

Wang FZ, Huang Z, Shi XF, Chen YC, Zhang WM, Tian XP, Li J and Zhang S. Cytotoxic indole diketopiperazines from the deep sea-derived fungus *Acrostalagmus luteoalbus* SCSIO F457. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012; 22(23): 7265-7267. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.115>

World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. Geneva: WHO, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>. Accessed on 13 Jan 2021.

Wu Z, Li D, Zeng F, Tong Q, Zheng Y, Liu J, Zhou Q, Li X-N, Chen C, Lai Y, Zhu H, Zhang Y (2018) Brasilane sesquiterpenoids and dihydrobenzofuran derivatives from *Aspergillus terreus* [CFCC 81836]. *Phytochemistry*, 156: 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.006>

Wu X, Chen Z, Ding W, Liu Y, Ma Z (2018) Chemical constituents of the fermentative extracts of marine fungi *Phoma* sp. CZD-F11 and *Aspergillus* sp. CZD-F18 from Zhoushan Archipelago, China, *Natural Product Research* 32(1)3: 1562-1566 <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1389929>

Zhang JC, Chen GY, LI XZ, Hu M, Wang BY, Ruan HB, Zhao LX, Zhou J, Ding ZT, Yang YB (2017) Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp., *Natural Product Research* 31(23): 2745-52. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1295235>

Zheng, YY, Liang ZY, Shen NX, Liu WL, Zhou XJ, Fu XM, Chen M, Wang CY (2019) New Naphtho- γ -Pyrones Isolated from Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. HK1-22 and Their Antimicrobial Activities. *Marine Drugs* 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060322>

Zhuang Y, Teng X, Liu P, Li G, Zhu W (2011) New Quinazolinone Alkaloids within Rare Amino Acid Residue from Coral-Associated Fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Organic Letters* 13(5):1130-33. <https://doi.org/10.1021/ol103164n>

CAPÍTULO II

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS AQUÁTICOS DE IGARAPÉS URBANOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL

Natália Silva Andrade¹; Geyse Souza Santos², Leila Priscila Peters^{1,3}; Clarice Maia Carvalho^{1,2,4}.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

³ Centro de Ciências da Saúde e Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁴ Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Fungos de ambientes aquáticos possuem grande importância ecológica, atuando na ciclagem de nutrientes e decomposição de material vegetal submerso. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados sobre seu potencial biotecnológico, que contribuiria na pesquisa de novos antimicrobianos. Considerando a capacidade de resistência dos microrganismos às variedades de drogas existentes, o estudo com fungos de ambiente aquático e seus metabólitos permitem a investigação de novos compostos ativos contra patógenos infecciosos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários produzidos por fungos aquáticos isolados de igarapés urbanos da cidade de Rio Branco, Acre, Brasil. 90 fungos isolados de ambiente aquático pertencentes à Coleção do Laboratório de Microbiologia da UFAC foram reativados em meio BDA, com produção de extratos com solvente acetato de etila. Para seleção inicial, foi utilizado o teste de difusão em ágar *cup plate*, contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, e as leveduras *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Os extratos com atividade antimicrobiana foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo teste de microdiluição em poços, concentração microbicida mínima (CMM), bioautografia em Camada Delgada, para verificação das substâncias ativas e caracterização molecular dos fungos com melhor atividade antimicrobiana, com construção de árvore filogenética. 10 extratos fúngicos (11,1%) apresentaram atividade antimicrobiana a pelo menos um dos microrganismos testados. Destes, o extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve atividade contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *C. albicans*, além dos fungos *Clonostachys* sp.1 (6.106) e *Gliocladium* sp. 1 (6.419) com atividade contra dois microrganismos testados. Na CIM, os extratos dos fungos *Clonostachys* sp. 1 (6.106) contra *S. aureus* e *Penicillium pinophilum*

(6.313) contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *C. albicans* tiveram menor valor de CIM, 0,0390 mg/mL. Na CMM, o menor valor foi de 0,0390 mg/mL, para o extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) contra *S. pneumoniae* e *C. albicans*. A bioautografia dos três extratos com melhor atividade antimicrobiana mostrou zonas de inibição indicando a presença de substâncias bioativas, e a caracterização molecular dos fungos 6.106 e 6.313 mostrou que a sequência obtida do fungo 6.106 apresentou similaridade de 99,81% para o gênero *Clonostachys*, e do fungo 6.313 apresentou similaridade de 99,82% para a espécie *Penicillium pinophilum*. Os fungos aquáticos avaliados tiveram atividade antimicrobiana contra alguns dos microrganismos testados, mostrando sua potencialidade e necessidade de estudos a partir de seus metabólitos secundários.

Palavras-chave: *Penicillium pinophilum*; *Clonostachys*; *Gliocladium*; Rio Branco.

INTRODUÇÃO

Fungos de ambientes aquáticos demonstram importância ecológica, sendo responsáveis pela ciclagem de nutrientes, decomposição de material vegetal submerso, servem de alimento para vertebrados, invertebrados e outros microrganismos (AGUIAR et al., 2019). Em relação ao seu potencial tecnológico, várias atividades já foram relatadas por eles, tais como antibacteriana (CHENG et al., 2016, ZHENG et al., 2019), antifúngica (PAGUIGAN et al., 2016), antitumoral (ABDELWAHAB et al., 2018), anti-inflamatória (LIU et al., 2018), nematicida (DONG et al., 2010) e anti-micobacteriana (BAO et al., 2018), entre outras.

No Brasil, alguns estudos já fizeram relatos acerca da riqueza de fungos aquáticos facultativos e fungos ingoldianos (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2014), além da diversidade fúngica, como por exemplo na bacia Amazônica (BEZERRA et al., 2015). Esta região possui uma extensa diversidade microbiana, incluindo microrganismos aquáticos ainda pouco conhecidos (PIEDEDE et al., 2014). O conhecimento limitado sobre a distribuição fúngica e seus aspectos ecológicos traz a necessidade de que mais estudos sejam realizados nessa região (CORTEZ et al., 2016), carecendo ainda de estudos que avaliem também suas estruturas e atividades metabólicas, com aplicações tecnológicas.

O estudo de fungos aquáticos e seus metabólitos representa novas perspectivas para a indústria farmacêutica, proporcionando a busca por novos compostos eficientes contra microrganismos patogênicos multirresistentes, presentes tanto nos ambientes hospitalares como na comunidade (LIMA et al., 2020).

A resistência aos antimicrobianos é uma preocupação de saúde pública mundial, definida como a capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antimicrobiano (OMS, 2014). Consequentemente, os tratamentos se tornam ineficazes e as infecções

persistentes. Outro fato aliado à resistência é a escassez na inovação de tecnologias de saúde que sejam capazes de combater a adaptação dos microrganismos (BRASIL, 2018).

Estudos mostram que as bactérias com maior incidência de multirresistência são entre as gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, e dentre as gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ASLAM et al., 2018; SEPTIMUS, 2018).

Patógeno de ambiente predominantemente hospitalar, a presença de *S. aureus* decorre de medidas sanitárias inadequadas, associada a problemas terapêuticos (EXNER et al., 2017), e o uso de antibióticos no controle do seu desenvolvimento tem sido por vezes ineficaz, devido a capacidade de resistência ao uso dos mesmos, como por exemplo, *S. aureus* resistente à *meticilina*. A prevalência de estirpes hipervirulentas associadas à comunidade têm se desenvolvido de maneira preocupante. (FOSTER; GEOGEHAN, 2015; FREITAS et al., 2021).

S. pneumoniae constitui uma das principais causas bacterianas de uma ampla gama de infecções que incluem pneumonia adquirida na comunidade, sepse e meningite. Sua capacidade de remodelação de genoma facilitou a disseminação da resistência a antibióticos e a evasão da imunidade induzida por vacinas (WEISER, 2018).

E. coli e *K. pneumoniae* são duas enterobactérias com maior aumento de resistência à antibioticoterapia. *E. coli* é responsável por ocasionar cerca de 130 a 175 milhões de infecções do trato urinário em todo o mundo (SURGERS et al., 2018), além de ser um patógeno alimentar (BAI et al., 2015). *K. pneumoniae* permeia entre as principais causas de infecções associadas a cuidados de saúde, ocasionando infecções urinárias, respiratórias e na corrente sanguínea (CANEIRAS, 2019). O advento de estirpes hipervirulentas conferem maior potencial de causar doenças mais graves e disseminadas (HARADA; DOI, 2018).

Em relação aos fungos, a levedura *Candida albicans* possui alto potencial causador de infecções oportunistas no indivíduo, com aumento dos relatos de resistência às drogas antifúngicas utilizadas para este organismo (VIEIRA; SANTOS, 2017). *C. tropicalis* possui relevância clínica entre as espécies de *Candida*, evidente em regiões tropicais e subtropicais (RODRIGUEZ et al., 2017; MEDEIROS et al., 2019). Sua patogenicidade está relacionada a diversas características de virulência, sendo associada a infecções com altas taxas de mortalidade (DE SOUZA et al., 2020). Possui uma capacidade de resistência a antifúngicos, a exemplo do fluconazol (SILVA et al., 2015), dificultando a ação do mesmo no tratamento de infecções fúngicas.

Considerando os prejuízos à saúde, o aumento de doenças associadas aos microrganismos descritos e sua capacidade de adaptação, é necessária a pesquisa por novos agentes antimicrobianos, no intuito de combater as infecções causadas por estes microrganismos, principalmente pelos provenientes de ambientes hospitalares e disseminados para a comunidade. Este grupo é responsável por altos índices de morbimortalidade em todo o mundo (BURNHAM et al., 2018), e seu estudo incentiva novas descobertas terapêuticas, além de ampliar o conhecimento acerca das potencialidades da microbiota fúngica aquática.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de fungos aquáticos de igarapés urbanos da cidade de Rio Branco, Amazônia Sul Ocidental.

MATERIAL E MÉTODOS

Reativação dos fungos

Foi realizada a reativação de 90 fungos aquáticos isolados dos igarapés urbanos São Francisco e Judia, da cidade de Rio Branco, Acre, que estavam armazenados na coleção do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Acre. Os fungos armazenados utilizando a técnica em água destilada (CASTELLANI, 1939) e óleo mineral (BUELL; WESTON, 1947) foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata-Dextrose (BDA) (dextrose 20g/L, ágar 15g/L, amido de batata 4g/L) e incubados a 28 °C durante sete dias.

Atividade antimicrobiana

Foram inoculados 10 plugs de 15 mm de meio BDA com fungo em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura Batata-Dextrose (BD), incubados a 28 °C durante 14 dias sem agitação. O micélio foi separado do meio metabólico por filtração em papel de filtro, e o filtrado extraído por partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila (AcOEt) na proporção de 1:1 (v/v) por três vezes (CECHINEL; YUNES, 1998). A fase orgânica foi evaporada a 37 °C até obter o peso constante, e o extrato foi solubilizado em dimetilsulfóxido 99,9% (DMSO) na concentração de 20 mg/mL para avaliação antimicrobiana.

Para verificar a atividade antibacteriana dos metabólitos, foi utilizado o teste de difusão em ágar *cup plate* (ROSE; MILLER, 1939). As estirpes padrões das bactérias

Staphylococcus aureus (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Escherichia coli* (ATCC 10536) foram inoculadas em ágar Müeller-Hinton (MH) (extrato de carne 2g/L, casaminoácidos 17,5g/L, ágar 1,5g/L) e incubadas durante 24 h a 37 °C. Três a cinco colônias foram ressuspensas com solução de NaCl 0,9% estéril, obtendo uma turbidez óptica comparada à solução padrão de McFarland 0,5 (CLSI, 2012).

Com um swab estéril, a suspensão bacteriana ajustada foi inoculada sobre a placa de Petri contendo meio MH (CLSI, 2012), foram feitos poços de 5 mm de diâmetro e colocados 20 µL do extrato metabólito dos fungos. As placas foram armazenadas a 4 °C por 24 h, para difusão do extrato no meio de cultivo, e posterior incubação em estufa a 37 °C por 24 h. Cloranfenicol (30 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e DMSO como controle negativo (RABANAL et al., 2002). Os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm) com régua de antibiograma e o ensaio realizado em três repetições.

Para averiguar a atividade antifúngica foi utilizado o mesmo ensaio descrito para atividade antibacteriana, entretanto sendo utilizado o meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (dextrose 20g/L, digestão péptica de tecido animal 5g/L, digestão pancreática de caseína 5g/L) e a suspensão microbiana ajustada para a turbidez da solução padrão 1,0 McFarland (CLSI, 2012). Para o teste, foram utilizadas as leveduras *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida tropicalis* (ATCC 700603).

Concentração Inibitória e Microbicida Mínima

Os extratos metabólitos dos fungos com atividade antimicrobiana foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, conforme metodologias padrões (CLSI, 2003).

Diluições sucessivas foram realizadas nas placas contendo 96 poços, partindo da concentração inicial de 20 mg/mL até a concentração final de 0,0390 mg/mL dos extratos. Para atividade antibacteriana, foi distribuído 50 µL de caldo MH em todos os poços da placa, e em seguida, adicionados 50 µL de cada extrato na concentração de 20 mg/mL, seguindo o processo de diluição seriada, homogeneizando e transferindo 50 µL para o próximo poço, e assim sucessivamente, resultando na concentração final de 0,0390 mg/mL.

A droga controle, Cloranfenicol 30 µg/mL, foi diluída de forma semelhante aos extratos. Foi adicionado 5 µL do inóculo correspondente a cada estirpe testada exceto para

o controle negativo segundo norma M7-A6 (CLSI, 2003). O controle negativo continha somente 100 µL de caldo MH, e o controle positivo 50 µL de caldo MH e 5 µL de inóculo.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h, após esse período foi adicionado em cada poço 20 µL do reagente Resazurina (0,15 mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração azul para o vermelho (OLIVEIRA et al., 2013; RISS et al., 2016).

Para avaliação da CIM dos extratos com atividade antifúngica, foram distribuídos 50 µL de caldo Sabouraud Dextrose (SD) em todos os poços da placa, com adição de 50 µL do extrato na concentração de 20 mg/mL, e seguindo o processo de diluição seriada, sendo homogeneizado e transferido 50 µL para o próximo poço, assim sucessivamente, resultando na concentração final de 0,0390 mg/mL. A droga controle, Cetoconazol 50 mg/mL, foi diluída da mesma maneira que o extrato.

Foi adicionado 5 µL de inóculo fúngico em todos os poços, exceto para o controle negativo, segundo norma M27-A2 (CLSI, 2002). O controle negativo continha somente 100 µL de caldo SD, e o controle positivo 50 µL de caldo SD e 5 µL de inóculo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h, posteriormente foi adicionado em cada poço 20 µL do reagente Resazurina (30 mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração de azul para vermelho (OLIVEIRA et al., 2013; RISS et al., 2016). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para determinação da concentração microbicida mínima (CMM), a fim de avaliar a se o extrato teve ação bacteriostática ou bactericida, foi utilizado swab estéril para absorver o conteúdo dos poços que apresentaram inibição para crescimento bacteriano, a partir do menor valor de CIM, e duas diluições acima desse valor, inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar MH. As placas foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. Nenhum crescimento em concentrações maiores ou iguais à CIM indicaram ação bactericida. Na avaliação dos extratos com inibição do crescimento fúngico, a fim de averiguar ação fungistática ou fungicida, a técnica utilizada foi a mesma, sendo que dessa vez os extratos foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar SD. Nenhum crescimento em concentrações maiores ou iguais à CIM indicaram ação fungicida. (AZEVEDO et al., 2012).

Caracterização Morfológica

Foi realizada a caracterização macromorfológica dos fungos com atividade antimicrobiana, de acordo com as características da colônia. As morfoespécies de cada

gênero observado foram agrupadas e utilizadas para identificação micromorfológica. Para tal, foi utilizada a técnica de microcultivo (LACAZ et al., 1998).

Os fungos selecionados foram inoculados em placas de Petri contendo plugs de meio BDA e Aveia (farinha de aveia 60g/L, ágar 15g/L), sendo posteriormente cobertos com lamínulas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 dias, e após o crescimento micelial, as lamínulas foram removidas e coradas com azul de lactofenol, a fim de visualizar as estruturas reprodutivas em microscópio óptico. (BARNETT; HUNTER, 1999).

Bioautografia

Foi realizado ensaio de bioautografia dos extratos fúngicos com melhor atividade antimicrobiana. Assim, foram aplicados 20 µL dos extratos em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Sílica Gel 60), eluídas usando diferentes sistemas: hexano, hexano-AcOEt (AcOEt) (1:1), AcOEt, AcOEt-Metanol (MeOH) (1:1), e analisadas em câmara ultravioleta (UV) 312 nm.

A bioautografia das substâncias eluídas em CCD, contra as bactérias, foi feita por meio de difusão em ágar MH, e para leveduras em ágar SD. Os extratos eluídos em CCD foram colocados em placas de Petri com o lado silicado voltado para cima, e foram solubilizados 20 mL de meio correspondente contendo 100µL de suspensão bacteriana ou fúngica em Enlarmeyers, homogeneizados e distribuídos sobre as placas de CCD. As placas de Petri foram armazenadas a 37 °C durante 24h em estufa. Decorrido esse período, foram adicionados 5 mL de reagente cloreto de 2-3-5 trifeniltetrazólio em cada placa, e após 4h em estufa a 37 °C, as zonas de inibição presentes foram evidenciadas. Adaptado de Shetty et al. (2014) e Valle-Júnior et al. (2016). A indicação dos compostos bioativos foi calculada a partir da obtenção do fator de retenção (Rf), segundo a fórmula:

$$Rf = \frac{a}{v}$$

Onde:

Rf é o fator de retenção;

a é a distância percorrida pelo composto;

v é a distância percorrida pelo solvente.

Caracterização Molecular

Os três fungos com melhor atividade antimicrobiana foram caracterizados molecularmente, sendo submetidos às etapas de extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.

Extração de DNA

O DNA genômico dos fungos selecionados foram extraídos usando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Doyle; Doyle, 1987). Os fungos foram crescidos em meio de cultura BDA a 28 °C, durante 7 dias. Foi realizada a coleta e pesagem de 100 mg de micélio fúngico, em seguida macerado com auxílio de um cadinho em nitrogênio líquido, até formar um pó fino.

A solução tampão de extração CTBA 3% foi preparada contendo NaCl, EDTA 0,5 M (pH 8,0) e TRIS-HCl (pH 8,0). Foram adicionados 0,8 mL de CTAB 3%, e 8 µL de 2-β-mercaptoetanol às amostras, sendo homogeneizadas e levadas ao banho-maria a 65 °C, por 1 hora. Adicionado 0,5 mL de CIA às amostras (24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico), com agitação manual por 1 minuto. Após a centrifugação das amostras (8.000 rpm por 10 min.), o sobrenadante foi coletado, com nova adição de 0,5 mL de CIA e nova centrifugação (8.000 rpm por 10 min).

O sobrenadante foi novamente coletado, sendo adicionado 0,35 mL de isopropanol gelado (-20° C). As amostras foram mantidas no congelador por 1 h. Nova centrifugação foi realizada (8.000 rpm por 10 min), com lavagem de etanol 70% refrigerado, e centrifugação de 7.500 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi retirado mais uma vez, e o DNA foi deixado à secagem. Decorrido esse processo, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de água mili-Q esterilizada + 2 mL de RNAase (37 °C).

Amplificação por PCR

A presença de DNA fúngico foi testada em todas as amostras de DNA por um ensaio de PCR, utilizando os *primers* universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), utilizados para amplificar a região do DNAr.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando volumes contendo: 40 ng de DNA; 0,5 µM de cada primer; 0,2 µM de dNTP; 1,25 U Taq DNA polimerase (Ludwig) e 2,5 µL do tampão. A PCR foi realizada em termociclador nas etapas: desnaturação a 95 °C

(2 min), 30 ciclos de 95 °C (30 s), 55 °C (30 s) e 72 °C (1 min) e extensão final a 72 °C (7 min). Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb como marcador molecular de pares de bases (pb).

Purificação do produto amplificado e sequenciamento de DNA

O kit Easy Pure PCR Purification Kit (Trasngen Biotech) foi utilizado para a purificação do produto amplificado via PCR da região do DNAr composta por ITS1-5,8S-ITS2 conforme instruções do fabricante. Para o sequenciamento das amostras, foi utilizado o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram purificados com o reagente *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup* (Applied Biosystems) e quantificados no equipamento Nanodrop 2000 c (Thermo Scientific).

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando o programa *Data Collection 3* (Applied Biosystems), e os arquivos resultantes foram convertidos em arquivos FASTA (.seq; texto) pelo *Sequence Analysis Software v. 6* (Applied Biosystems) sob parâmetros padrões.

Identificação dos fungos e construção de árvore filogenética

As sequências foram verificadas e editadas nos softwares Chroma e Bioedit 7.2 (HALL, 1999). Foram utilizadas as regiões das sequências consideradas de maior qualidade, processadas para geração de novos arquivos FASTA. As sequências foram verificadas e processadas na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A similaridade das sequências dos fungos selecionados foi estudada com as sequências depositadas no GenBank utilizando o algoritmo BLASTn.

Foi realizada a identificação de espécies próximas e relacionadas aos isolados de interesse, e as sequências foram utilizadas para análise filogenética. A árvore filogenética foi construída por meio do método de neighbor joining (JUKES; CANTOR, 1969), utilizando o software MEGA 11 (TAMURA et al., 2013).

RESULTADOS

Atividade antimicrobiana

Dez extratos metabólitos (11,1%) tiveram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Número do fungo, Identificação Taxonômica, Bactérias e Fungos testes para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos metabólitos de fungos aquáticos amazônicos.

Nº do fungo	Identificação	Bactéria				Fungo	
		<i>Sau</i>	<i>Spn</i>	<i>Eco</i>	<i>Kpn</i>	<i>Cal</i>	<i>Ctro</i>
6.112	<i>Acremonium</i> sp. 1	-	-	-	19,3±1,15	-	-
6.245	<i>Acremonium</i> sp. 2	-	-	-	19,3±1,15	-	-
6.253	<i>Acremonium</i> sp. 3	-	-	-	15,3±1,15	-	-
6.106	<i>Clonostachys</i> sp. 1	44±0	-	-	17,3±1,15	-	-
6.419	<i>Gliocladium</i> sp. 1	-	14,6±1,15	-	27,3±1,15	-	-
6.313	<i>Penicillium pinophilum</i>	34±0	34±0	-	-	16,6±4,61	-
6.327	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-	22,6±1,15	-	-	-
6.369	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	22±0	-	-	-	-
6.340	<i>Trichoderma</i> sp. 1	-	9,3±1,15	-	-	-	-
6.380	<i>Trichoderma</i> sp. 2	-	-	-	20±0	-	-
Controle positivo	Cloranfenicol (30µg/mL)	40±0	48±0	46±0	48±0	-	-
	Cetoconazol (50µg/mL)	-	-	-	-	44±0	43±0
Controle negativo	DMSO	-	-	-	-	-	-
	Total	2	4	1	6	1	0

Sau: *Staphylococcus aureus*; *Spn*: *Streptococcus pneumoniae*; *Eco*: *Escherichia coli*; *Kpn*: *Klebsiella pneumoniae*; *Cal*: *Candida albicans*; *Ctro*: *Candida tropicalis*.

Dos 10 fungos com atividade antimicrobiana, três morfoespécies (30%) pertencem ao gênero *Acremonium*, três ao gênero *Penicillium* (30%), dois pertencem ao gênero *Trichoderma* (20%), um ao gênero *Clonostachys* (10%), e um ao gênero *Gliocladium* (10%).

O fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) inibiu o crescimento de três (50%) dos seis microrganismos testados, duas bactérias gram-positivas, *S. aureus* e *S. pneumoniae*, e o fungo *C. albicans*. O fungo *Clonostachys* sp.1 (6.106) inibiu o crescimento de duas bactérias, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, e o fungo *Gliocladium* sp.1 (6.419) também inibiu duas bactérias, *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae foi o microrganismo mais sensível, inibido por seis (60%) dos dez extratos fúngicos com atividade antimicrobiana, e *C. tropicalis* foi o mais resistente, inibido por nenhum dos extratos avaliados. O maior halo de inibição observado foi do fungo *Clonostachys* sp. 1 (6.106), contra *S. aureus*, com média de 44 mm.

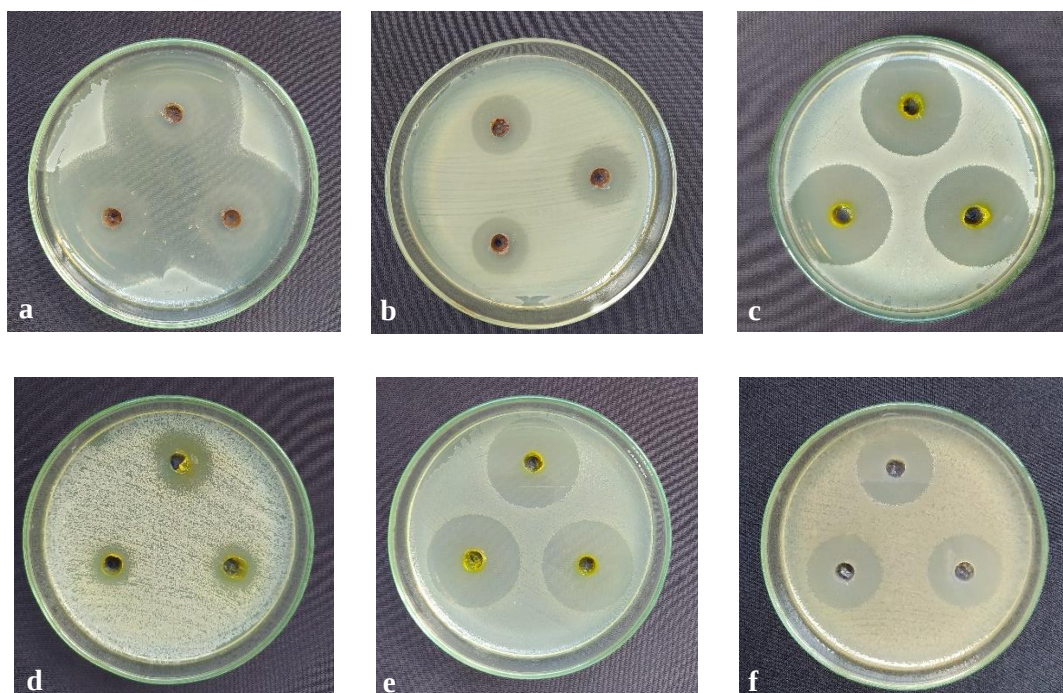


Figura 1. Extratos de fungos aquáticos com atividade antimicrobiana. a. *Clonostachys* sp. 1 (6.106) – *Staphylococcus aureus*; b. *Clonostachys* sp. 1 (6.106) – *K. pneumoniae*; c. *Penicillium pinophilum* (6.313) – *S. aureus*; d. *Penicillium pinophilum* (6.313) – *C. albicans*; e. *Penicillium pinophilum* (6.313) – *S. pneumoniae*; f. *Gliocladium* sp. 1 (6.419) – *K. pneumoniae*.

Concentração Inibitória e Microbicida Mínima

Foram avaliadas a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima dos extratos dos fungos aquáticos amazônicos que tiveram atividade antimicrobiana no ensaio preliminar (Tabela 2).

Tabela 2. Número do fungo, Identificação Taxonômica, Bactérias, Fungos e Drogas controle utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima de extratos metabólitos de fungos aquáticos amazônicos.

Nº do fungo	Identificação	Bactéria mg/mL						Fungo mg/mL			
		<i>Sau</i>		<i>Spn</i>		<i>Eco</i>		<i>Kpn</i>		<i>Cal</i>	
		CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
6.112	<i>Acremonium</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-
6.245	<i>Acremonium</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	2,5	5	-	-
6.253	<i>Acremonium</i> sp. 3	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-
6.106	<i>Clonostachys</i> sp. 1	0,0390	0,0781	-	-	-	-	0,625	1,25	-	-
6.419	<i>Gliocladium</i> sp. 1	-	-	1,25	1,25	-	-	0,1562	0,3125	-	-
6.313	<i>Penicillium pinophilum</i>	0,0390	0,0781	0,0390	0,0390	-	-	-	-	0,0390	0,0390
6.327	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-	-	-	2,5	>10	-	-	-	-
6.369	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	-	1,25	1,25	-	-	-	-	-	-
6.340	<i>Trichoderma</i> sp. 1	-	-	5	5	-	-	-	-	-	-
6.380	<i>Trichoderma</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-
Droga controle	Cloranfenicol 30µg/mL	0,2345	0,4687	0,2345	0,4687	0,9375	1,875	0,0585	0,2343	-	-
	Cetoconazol 50 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	3,125	3,125

Sau: *Staphylococcus aureus*; *Spn*: *Streptococcus pneumoniae*; *Eco*: *Escherichia coli*; *Kpn*: *Klebsiella pneumoniae*; *Cal*: *Candida albicans*; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CMM: Concentração Microbicida Mínima.

O menor valor de CIM observado entre os extratos metabólitos com atividade antimicrobiana foi do extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313), contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *C. albicans*, de 0,0390 mg/mL. O mesmo valor também foi observado para o extrato do fungo *Clonostachys* sp. 1 (6.106), contra *S. aureus*.

Em relação às bactérias utilizadas no ensaio, o extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve o menor valor de CMM dos extratos testados, 0,0390 mg/mL, contra *S. pneumoniae*. Em relação aos fungos, o mesmo extrato também teve menor valor de CMM, 0,0390 mg/mL, contra *C. albicans*.

O segundo menor valor de CMM, 0,0781 mg/mL, foi exibido pelos extratos *Clonostachys* sp. 1 (6.106) e *Penicillium pinophilum* (6.313), contra *S. aureus*.

Identificação macroscópica e microscópica

Foi realizado um registro fotográfico das características macro e micromorfológicas dos fungos selecionados com atividade antimicrobiana (Figura 2).

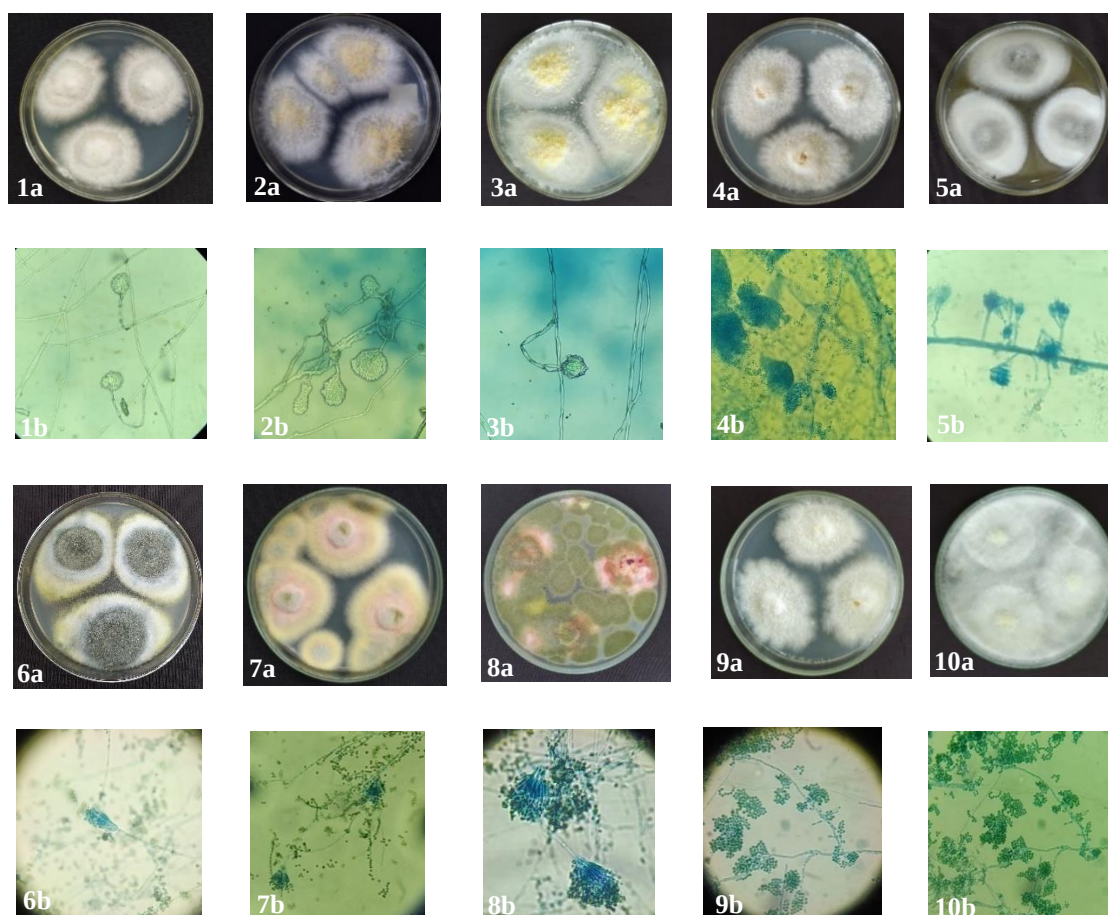


Figura 2. Macroscopia e microscopia de fungos aquáticos de igarapés urbanos com atividade antimicrobiana. 1a, 1b. *Acremonium* sp.1 (6.112); 2a, 2b. *Acremonium* sp. 2 (6.245); 3a, 3b. *Acremonium* sp. 3 (6.253); 4a, 4b. *Clonostachys* sp.1 (6.106); 5a, 5b. *Gliocladium* sp. 1 (6.419); 6a, 6b *Penicillium pinophilum* (6.313); 7a, 7b *Penicillium* sp. 1 (6.327); 8a, 8b *Penicillium* sp. 2 (6.369); 9a, 9b *Trichoderma* sp. 1 (6.340); 10a, 10b *Trichoderma* sp. 2 (6.380).

Bioautografia em Camada Delgada

Os três extratos com melhor atividade antimicrobiana foram analisados pela técnica de bioautografia. O extrato do fungo *Clonostachys* sp. 1 (6.106), com atividade antibacteriana contra *S. aureus*, teve zonas de inibição com Rf de 0,33 e 0,79. O extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) apresentou zonas de inibição contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*, com valor de Rf de 0,66. O extrato fúngico *Gliocladium* sp. 1 (6.419) apresentou zonas de inibição com valores de Rf 0,23, 0,73 e 0,95 contra *S. pneumoniae*.

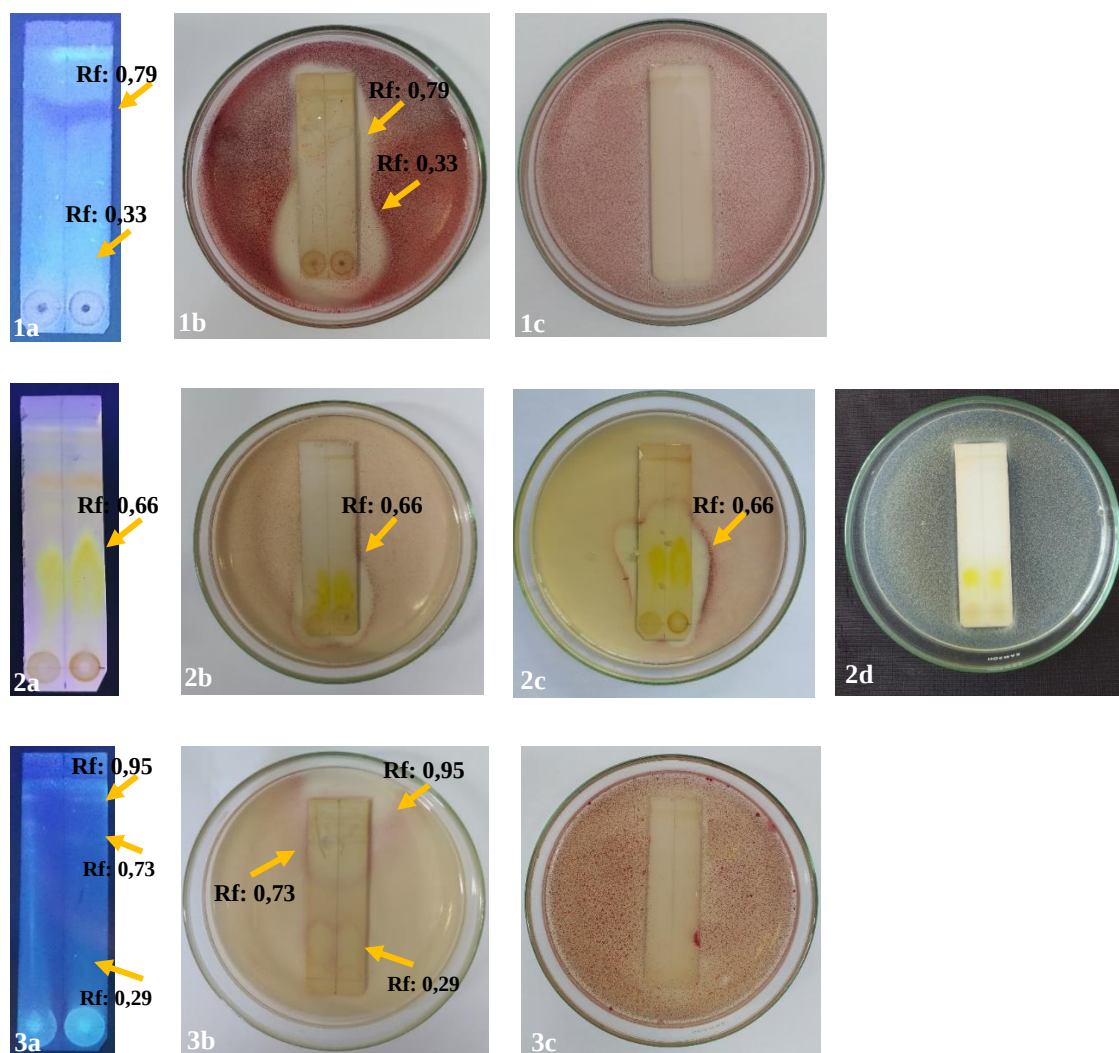


Figura 3. Bioautografia dos metabólitos de extratos de fungos aquáticos com atividade antibacteriana. 1a. Placa de cromatografia *Clonostachys* sp.1 (6.106); 1b, 1c. Bioautografia *Clonostachys* sp. 1 (6.106) – contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*; 2a. Placa de cromatografia *Penicillium pinophilum* (6.313); 2b, 2c, 2d. Bioautografia *Penicillium pinophilum* (6.313) – contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *C. albicans*; 3a. Placa de cromatografia *Gliocladium* sp. 1 (6.419); 3b, 3c. *Gliocladium* sp. 1 (6.419) – contra *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*. Os sistemas eluentes representados foram em hexano-acetato de etila (1:1).

Caracterização Molecular

Os três fungos com melhor atividade antimicrobiana, 6.106, 6.313 e 6.419 foram caracterizados molecularmente, seguindo à etapa de análise de sequenciamento. Entretanto, o material do fungo *Gliocladium* sp. 1 (6.419) não teve amostra satisfatória para tal análise. O fungo 6.106 foi identificado a nível de gênero, *Clonostachys*, e o fungo 6.313 foi identificado como *Penicillium pinophilum*. A similaridade das sequências dos

fungos 6.106 e 6.313 foram estudadas com as sequências depositadas no GenBank, conforme consta na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos fungos com melhor atividade antimicrobiana e similaridade da sequência de dados obtidos de espécies sequenciadas e depositadas no GenBank.

Isolado fúngico	Tamanho	Gênero/Espécie	Similaridade
6.106	510-540 pb	<i>Clonostachys</i> sp.	99,81%
6.313	510-540 pb	<i>Penicillium pinophilum</i>	99,82%

Análise filogenética

A análise filogenética dos isolados fúngicos 6.106 e 6.313 foi realizada e apresentada conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5.

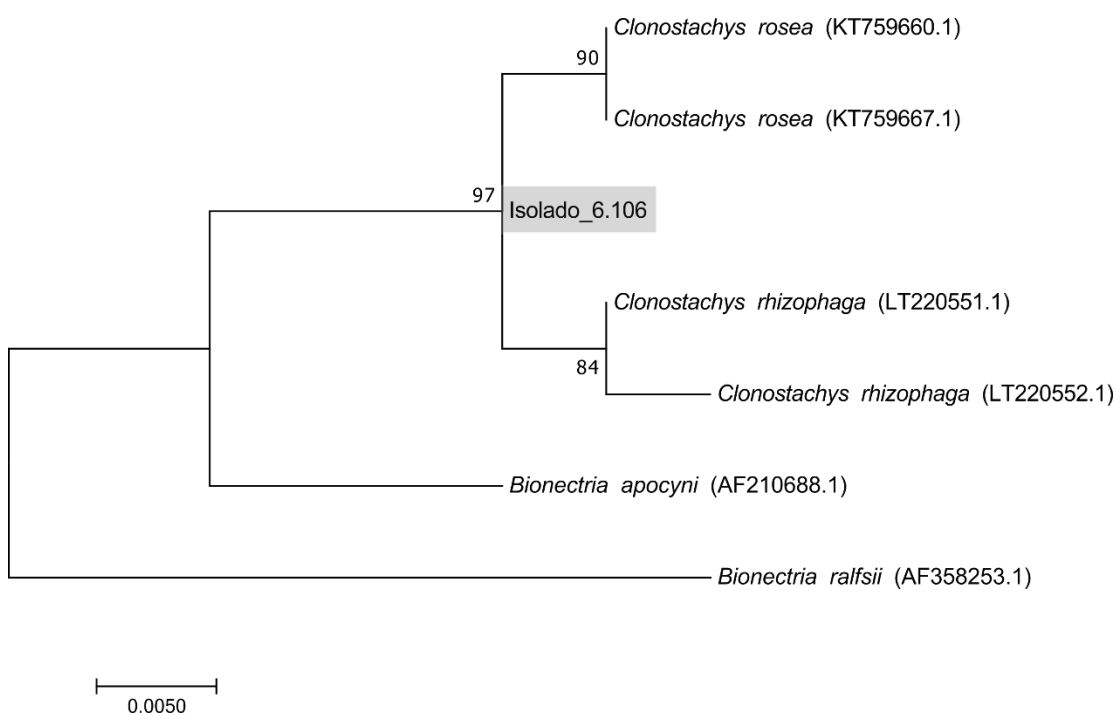


Figura 4. Árvore filogenética por análise de Neighbor-Joining, com alinhamento de dados de sequência ITS1-5.8S-ITS2. Relação do isolado 6.106 e outras espécies recuperadas do GenBank; números nos nós mostram valores percentuais de bootstrap para ramos internos (1000 bootstraps).

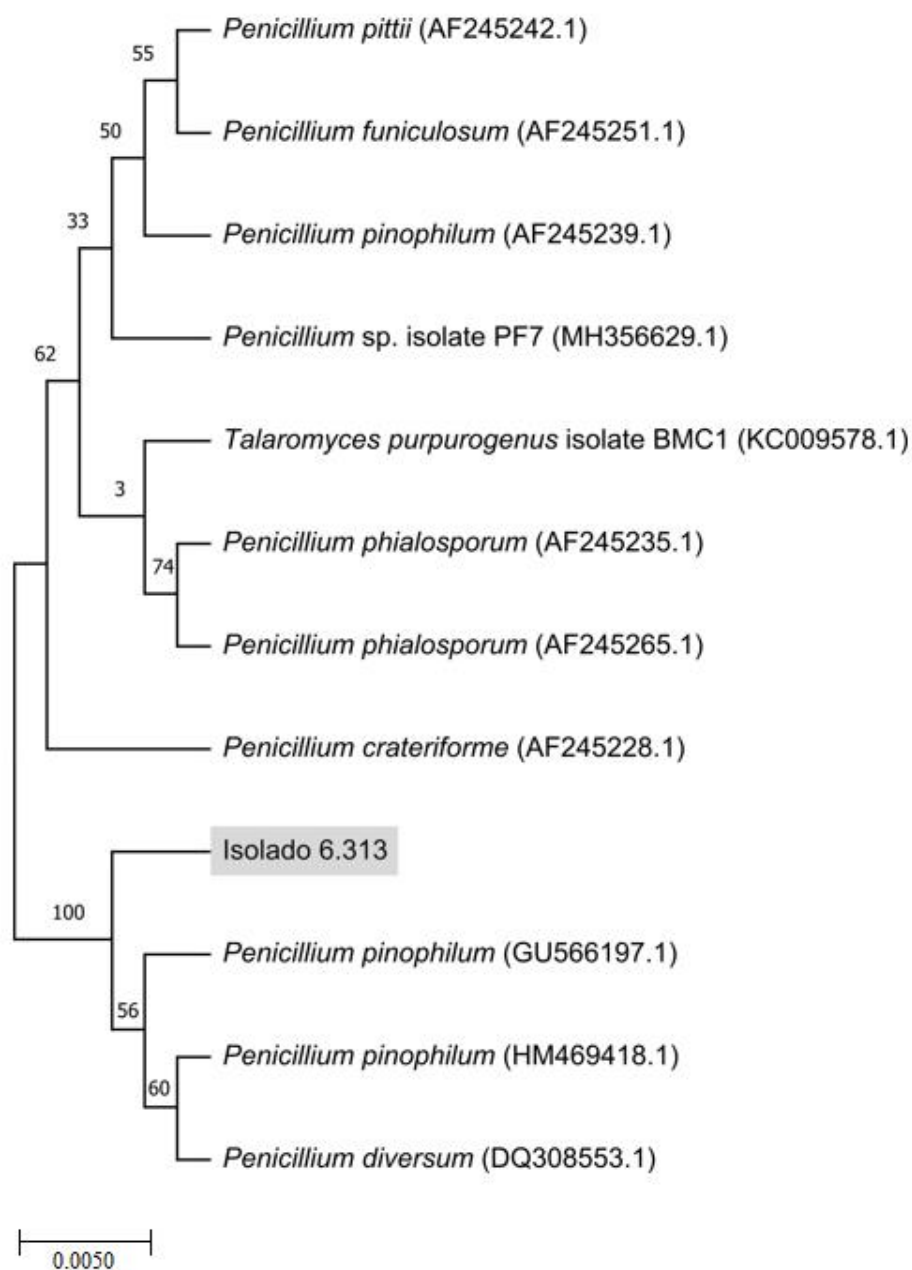


Figura 5. Árvore filogenética por análise de Neighbor-Joining, com alinhamento de dados de sequência ITS1-5.8S-ITS2. Relação do isolado 6.313 e outras espécies recuperadas do GenBank; números nos nós mostram valores percentuais de bootstrap para ramos internos (1000 bootstraps).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a existência de fungos aquáticos com atividade antimicrobiana contra microrganismos de relevância médica, com três morfoespécies pertencentes ao gênero *Acremonium*, três ao gênero *Penicillium*, dois ao gênero

Trichoderma, um ao gênero *Clonostachys* e uma morfoespécie do gênero *Gliocladium* sp.1.

O gênero *Acremonium* é considerado cosmopolita, e relatos sobre isolados desse gênero já foram obtidos de espécies que demonstraram a produção de compostos com diversas bioatividades (SUCIATI et al., 2013; HARDOIM; COSTA, 2014; MARTINS et al., 2021). O primeiro composto de importância médica que derivou de um fungo aquático, isolado de *Acremonium chrysogenum*, deu origem ao antibiótico de amplo espectro Cefalosporina C (ABRAHAM, 1979). Neste trabalho, as três morfoespécies de *Acremonium* tiveram atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*. Esses dados reforçam a necessidade da investigação de compostos naturais produzidos a partir de fungos de ambiente aquático, considerando suas propriedades biológicas.

O fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve atividade antimicrobiana contra a maior quantidade de microrganismos testados, duas bactérias, *S.aureus* e *S. pneumoniae*, e o fungo *Candida albicans*. No gênero *Penicillium*, diversas espécies possuem componentes antimicrobianos ativos, além de estarem associadas a outros organismos aquáticos, demonstrando atividade biológica (WANG et al., 2012). Contribuição importante deste gênero advém da descoberta da penicilina, que permitiu o desenvolvimento científico na antibioticoterapia e produção de novos antibióticos (PEREIRA; PITA, 2005). *Penicillium pinophilum* já foi descrito anteriormente em estudos que demonstram sua atividade antibacteriana, inclusive com identificação de dois novos metabólitos secundários (WANG et al., 2013). Em outro trabalho, foi descrita a presença de atividade contra *S. aureus*, (HE et al., 2019), assim como foi observado neste estudo.

Representantes do gênero *Trichoderma* spp. produzem diversos metabólitos secundários relevantes (MURKHERJEE et al, 2013), com potencial para utilização de substâncias de interesse farmacêutico (FARHA; BROWN, 2016). Neste estudo, o fungo 6.380 *Trichoderma* sp. 2 teve atividade contra *Klebsiella pneumoniae*. Atividade semelhante foi observada no estudo de Sedjati e colaboradores (2020), ao explorarem o potencial antimicrobiano do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, isolado de águas termais no leste da Indonésia, além da presença de atividade contra diversos patógenos bacterianos testados, houve a produção de compostos ativos contra *K. pneumoniae*.

O fungo *Clonostachys* sp. 1 (6.106) teve atividade contra as bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Ele também apresentou o maior halo de inibição contra *S. aureus* (44±0), sendo superior à média calculada da droga controle, Cloranfenicol, para

o mesmo microrganismo. Estudo recente demonstrou atividade de representantes desse gênero com atividade antimicrobiana contra sete bactérias patogênicas humanas, dentre elas *S. aureus*, evidenciando sua ação antibacteriana (DIAS et al., 2019). Fungos do gênero *Clonostachys* são abundantes em diversas classes de metabólitos secundários, tais como terpenoides, policetídeos, além de apresentar atividades biológicas, como antimicrobiana, citotóxica (WANG et al., 2019, ABDEL-WAHAB et al., 2019).

O fungo *Gliocladium* sp. 1 (6.419) teve atividade contra *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*. Fungos do gênero *Gliocladium* já foram descritos como produtores de diversas estruturas metabólicas, como policetídeos, dicetopiperazinas (KOOLEN et al., 2012). Tais estruturas desempenham atividades biológicas bem representadas, por exemplo a nematoide (SONG et al., 2016) e citotóxica, como a desempenhada por metabólitos desse gênero, isolados a partir de um organismo marinho (USAMI et al., 2004). Um estudo de Gamboa-Ângulo e colaboradores (2012) avaliou a atividade de *Gliocladium* sp. isolado de buracos de água doce, com presença de atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. A presença de atividade antibacteriana de fungos desse gênero, isolados em ambientes aquáticos é pouco relatada, e não foram encontrados estudos que indicassem atividade contra *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*.

O teste de difusão em ágar *cup plate* demonstrou que *Klebsiella pneumoniae* foi o organismo mais sensível em relação aos extratos fúngicos com atividade antimicrobiana. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos para controle da *K. pneumoniae* são necessários e considerados prioritários (WHO, 2018), considerando o acometimento de doentes e internações hospitalares decorrentes dessa bactéria gram-negativa.

O microrganismo mais resistente, que não foi inibido por nenhum extratos com atividade antimicrobiana, foi *Candida tropicalis*. Considerada como uma levedura patogênica emergente, com condições clínicas que levam a mesma a ser associada à maiores taxas de mortalidade entre as espécies de *Candida*, além da resistência a determinadas classes de antifúngicos (ARASTEHFAR et al., 2020) Formação de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas e síntese de esterol são fatores que indicam sua capacidade ampla de virulência (PRASATH et al., 2020).

Neste trabalho, o menor valor de CIM encontrado foi do extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313), de 0,0390 mg/mL, o mesmo contra as bactérias as quais teve atividade, *S. aureus* e *S. pneumoniae*, além do fungo *C. albicans*, indicando que esse extrato, numa mesma concentração, demonstrou ação bacteriostática e fungistática contra

diferentes microrganismos. O extrato do fungo *Clonostachys* sp. 1 (6.106) exibiu o mesmo valor de CIM, 0,0390 mg/mL, contra *S. aureus*, demonstrando ação bacteriostática.

O extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve o menor valor de CMM dos extratos com atividade testados, 0,0390 mg/mL, contra *S. pneumoniae*. Observados os valores de CIM e CMM deste extrato contra *S. pneumoniae*, que foram iguais, demonstrando as ações bacteriostática e bactericida.

O extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) também apresentou menor valor de CMM, 0,0390 mg/mL, contra *C. albicans*, demonstrando ação fungicida. Na maioria dos extratos com atividade testados, a CIM e a CMM apresentaram valores similares, indicando a proximidade entre as concentrações com indicativo de ação bacteriostática/bactericida e fungistática/fungicida.

Na bioautografia dos extratos com melhor atividade antimicrobiana, o extrato do fungo *Gliocladium* sp. 1 (6.419) apresentou três zonas de inibição contra *S. pneumoniae*, e o extrato do fungo *Clonostachys* sp. 1 apresentou duas zonas de inibição contra *S. aureus*, sugerindo que ambos os extratos contam com a presença de mais de uma classe de substâncias ativas. O extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) exibiu uma zona de inibição, contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*, mostrando que uma mesma substância ativa foi capaz de inibir diferentes bactérias.

Na bioautografia dos extratos dos fungos *Clonostachys* sp. 1 (6.106) contra *K. pneumoniae*, *Penicillium pinophilum* (6.313) contra *C. albicans* e 6.419 contra *K. pneumoniae*, foi observada a inibição do crescimento em toda a extensão da corrida cromatográfica em camada delgada, indicando que pode ter havido a ação de múltiplas substâncias bioativas, ou então que uma substância tenha maior afinidade pela fase fixa (sílica) da CCD.

A caracterização molecular dos fungos com melhor atividade antimicrobiana mostrou que os isolados fúngicos 6.106 e 6.313 apresentaram sequências de similaridade de mais de 99%, comparados às sequências encontradas no GenBank. Na análise filogenética, o isolado 6.106, pertencente ao gênero *Clonostachys*, acabou não sendo agrupado às espécies *Clonostachys rosea* e *C. rhizophaga*, sugerindo que o mesmo possa ser de outra espécie. Dentre as sequências analisadas, também foi demonstrado que o isolado não se agrupa com a espécie *Bionectra ralfsii*. Quanto ao isolado 6.313, foi verificado que este agrupou-se ao *Penicillium pinophilum*, demonstrando que o mesmo possui similaridade à espécie identificada.

CONCLUSÃO

Os fungos aquáticos que apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos avaliados estão representados entre os gêneros *Acremonium*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Gliocladium*.

O fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve atividade antimicrobiana contra a maior quantidade de microrganismos testados.

Dos microrganismos submetidos aos testes de atividade antimicrobiana, *Klebsiella pneumoniae* foi o mais sensível, e *Candida tropicalis* o mais resistente.

Os extratos dos fungos *Penicillium pinophilum* (6.313) e *Clonostachys* sp. 1 (6.106) tiveram o menor valor de CIM encontrado contra os microrganismos aos quais desempenharam atividade antimicrobiana, indicando ação bacteriostática.

O extrato do fungo *Penicillium pinophilum* (6.313) teve o menor valor de CMM contra microrganismo bacteriano e fúngico, indicando ação bactericida e fungicida.

Na bioautografia, os extratos com melhor atividade antimicrobiana indicaram a presença de zonas de inibição demonstrando várias substâncias bioativas.

A caracterização molecular dos dois fungos com melhor atividade antimicrobiana permitiu a identificação do fungo 6.106, a nível de gênero, *Clonostachys*, e do fungo 6.313 a nível de espécie, *Penicillium pinophilum*.

CONCLUSÕES GERAIS

Fungos aquáticos de igarapés urbanos na Amazônia Sul-Occidental são produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana, denotando a importância na investigação de seus compostos e aplicação tecnológica frente a microrganismos patogênicos.

A identificação dos valores de CIM e CMM desempenhada por extratos de fungos aquáticos é fundamental na avaliação das ações bacteriostática/bactericida e fungistática/fungicida existentes.

A bioautografia permite a indicação de zonas de inibição desempenhadas por extratos de fungos com atividade antimicrobiana, facilitando o posterior isolamento e identificação das classes de compostos com presença de substâncias bioativas.

É fundamental associar características macromorfológicas e moleculares dos fungos aquáticos, permitindo a busca de informações já conhecidas, aliadas a investigação de propriedades que podem ser desenvolvidas.

Fica clara a importância do estudo de fungos aquáticos, a partir de seus metabólitos secundários, por desempenharem atividades biológicas diversas, conferindo alternativas ao uso dos antimicrobianos atuais.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, M. F. et al. Cyclic heptapeptides from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3954-3959, 2019.

ABDEL-WAHAB, M. F. et al. Tanzawaic acid derivatives from freshwater sediment-derived fungus *Penicillium* sp. **Fitoterapia**, v. 128, p. 258-264, 2018.

ABRAHAM, E. P. A. Glimpse of the Early History of the Cephalosporins, **Reviews of Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 99-105, 1979.

AGUIAR, F. C. et al. Plantas aquáticas e florestas ribeirinhas. In: FEIO, M. J.; FERREIRA, V. **Rios de Portugal: comunidades, processos e alterações**. Coimbra: Coimbra University Press, 2019. 446 p.

ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates, **Medical Mycology**, v. 58, n. 6, p. 766–773, 2020.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of *Croton cajucara* Benth, **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 4, p. 351-357, 2012.

BAI, X. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. **Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 31-38, 2015.

BAO, J. Bioactive Pyridone Alkaloids from a Deep-Sea-Derived Fungus *Arthrimum* sp. UJNMF0008. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, 2018.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Amer Phytopathological Society: Upper Saddle River, 1999. 240p.

BEZERRA, A. F. M. et al. Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações enantiosseletivas de cetonas e biorremediação. In: OLIVEIRA, L. A. et al. Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus: INPA, 2016. 445p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018). Brasília: Ministério da Saúde, 2018. p. 307-309.

BUELL, C.B.; WESTON, W.H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures. **American Journal of Botany**, v. 34, p. 555-561, 1947.

BURNHAM, J. P. et al. Infectious Diseases Consultation Reduces 30-Day and 1-Year All-Cause Mortality for Multidrug-Resistant Organism Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, 2018.

CANEIRAS, C. et al. Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary University hospital center over a 31-year period. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 6, p. 387-393, 2019.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CECHINEL, V. F.; YUNES, A. R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-103, 1998.

CHANG, Y-W. et al. Speramides A-B, two new prenylated indole alkaloids from the freshwater-derived fungus *Aspergillus ochraceus* KM007. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 45, p. 4952-4955, 2016.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. 2 ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. v. 22, n. 15, 2002.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 8 ed. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. USA: Pennsylvania, v. 23, n. 1, p. 1987-1898, 2003.

CORTEZ, A. C. A. et al. A comparison of the freshwater fungal community during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 14, n. 2, p. 156-161, 2016.

DE SOUZA, C. M. et al. Adhesion of *Candida tropicalis* to polystyrene and epithelial cell lines: insights of correlation of the extent of adherent yeast cells among distinct surfaces. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 4, 2020.

DIAS, A. C. dos S. et al. Steroids from marine-derived fungi: evaluation of antiproliferative and antimicrobial activities of eburicol. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, 2019.

DONG, J. Y. Ophiocerosol, a novel macrocyclic neolignan from the aquatic fungus *Ophioceras dolichostomum* YMF1.00988, **Natural Product Research**. v. 24, n.11, p.1004-1012, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n. 1, p.11-15, 1987.

EXNER, M. et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?. **German Medical Science Hygiene and Infection Control**, v. 12, n. 5, 2017.

FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Strategies for target identification of antimicrobial natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 5, p. 668-680, 2016.

FOSTER, T. J. *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Second Microbiology, Irlanda: Academic Press. v. 2, p. 655-674, 2015.

FREITAS, G. D. et al. Use of different methods to control the development of *Staphylococcus aureus*: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021.

GAMBOA-ANGULO, M. et al. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2305-2312, 2012.

- HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAN, P. et al. Metabolites from *Clonostachys Fungi* and Their Biological Activities. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 229, p. 2-31, 2020.
- HARADA, S.; DOI, Y. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a call for consensus definition and international collaboration. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 9, 2018.
- HARDOIM, C. C.; COSTA, R. Microbial communities and bioactive compounds in marine sponges of the family Irciniidae - a review. **Marine Drugs**, v. 12, n. 10, p. 5089-5122, 2014.
- HE, F. Secondary metabolites from the mangrove sediment-derived fungus *Penicillium pinophilum* SCAU037. **Fitoterapia**, v. 136, 2019.
- HU, X. et al. Three New Indole Diterpenoids from the Sea-Anemone-Derived Fungus *Penicillium* sp. AS-79. **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, p. 137, 2017.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of Protein Molecules. In: MUNRO, H. N. **Mammalian Protein Metabolism**. New York: Academic Press, 1969. 763 p.
- KOOLEN, H. H. et al. An antimicrobial diketopiperazine alkaloid and co-metabolites from an endophytic strain of *Gliocladium* isolated from *Strychnos* cf. *toxifera*, **Natural Product Research**, v. 26 n. 21, p. 2013-2019, 2012.
- LACAZ, C.S. et al. Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier: São Paulo, 1998. 445 p.
- LIMA, J. M. et al. Fungos produtores de enzimas associados à macrófitas aquáticas do rio Negro, Manaus. **Biota Amazônia**, v. 10, n. 3, p. 52-57, 2020.
- LIU, M. et al. Bioactive secondary metabolites from the marine-associated fungus *Aspergillus terreus*. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 525-530, 2018.
- MARTINS, T. et al. Role of bioactive metabolites from *Acremonium camptosporum* associated with the marine sponge *Aplysina fulva*. **Chemosphere**, v. 274, 2021.
- MEDEIROS, M. A. P. et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: a six-year retrospective study. **Plos One**, v. 14, n. 8, 2019.
- MUKHERJEE, P. K. et al. *Trichoderma* Research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Atividade antifúngica de extratos isolados de *Streptomyces* spp. obtidos em solos paraibanos contra leveduras do gênero *Candida* spp. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 51-58, 2013.

PAGUIGAN, N. D. et al. Acetophenone derivatives from a freshwater fungal isolate of recently described *Lindgomyces madisonensis* (G416). **Phytochemistry**, v. 126, p. 59-65, 2016.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): Da descoberta da penicilina ao Prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PIEDADE, M. T. F. et al. Organismos aquáticos e de áreas úmidas em uma Amazônia em transição. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 34-40, 2014.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assay**. In: SITTAMPALAM, G. S. et al. Assay Guidance Manual. Bethesda-Maryland: NCATS, 2016. 167 p.

RODRIGUEZ, L. et al. A multi-centric study of Candida bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PLoS One**, v. 12, 2017.

ROSE, S. B.; MILLER, R. E. Studies with the Agar Cup-Plate Method: I. A standardized Agar Cup-Plate technique. **Journal of bacteriology**, v. 38 n. 5, p. 539–547, 1939.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. et al. Riqueza dos fungos ingoldianos e aquáticos facultativos no Parque Municipal do Ibirapuera, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 61-76, 2014.

SEDJATI, S. et al. Antibacterial Activities of the Extracts of Sponge-Associated Fungus *Trichoderma longibrachiatum* against Pathogenic Bacteria. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 15, n. 2, 2020.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: An antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819-829, 2018.

SHAALA, L. A; YOUSSEF, D. T. A. Identification and Bioactivity of Compounds from the Fungus *Penicillium* sp. CYE-87 Isolated from a Marine Tunicate. **Marine Drugs**, v. 13, 1698-1709, 2015.

SHETTY, P. R. et al. Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 303-312, 2014.

SILVA, M. G. C. et al. *Candida* species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 3, p. 158-161, 2015.

SONG, H. C. et al. Nematicidal metabolites from *Gliocladium roseum* YMF1.00133. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 52, p. 324-330, 2016.

SUCIATI et al.. Secondary Metabolites of the Sponge-Derived Fungus *Acremonium persicinum*. **Journal of Natural Product**, v. 76, n. 8, p. 1432-1440, 2013.

SURGERS, L. Biofilm formation by ESBL-producing Strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 1, p. 13-18, 2018.

TAMURA, K. et al. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

USAMI, Y. et al. Gliocladins A-C and giloperazine; cytotoxic dioxo- or trioxopiperazine metabolites from a *Gliocladium* sp. separated from a sea hare. **Heterocycles**, v. 63, p. 1123-1129, 2004.

VALLE-JR, D. L. et al. Thin Layer Chromatography-Bioautography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Antimicrobial Leaf Extracts from Philippine *Piper betl* L. against Multidrug-Resistant Bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p.235-239, 2017.

WANG, U. M. H. Secondary Metabolites from *Penicillium pinophilum* SD-272, a Marine Sediment-Derived Fungus. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2230-2238, 2013.

WANG, Y. et al. The disruption of *verM* activates the production of gliocladiosin A and B in *Clonostachys rogersoniana*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 28, p. 6782-6785, 2019.

WEISER, J. N. et al. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *Protocols and Applications: A Laboratory Manual*. Cambridge: Academic Press, 1990.

World Health Organization. “Antimicrobial resistance: global report on surveillance”, 2014. Disponível em: <<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>> Acesso em: Jul. 2020.

ZHENG, Y. Y. et al. New Naphtho- γ -Pyrones Isolated from Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. HK1-22 and Their Antimicrobial Activities. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, 2019.