



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

RAQUEL DE GOUVÊA PORTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA DO PRINCÍPIO ATIVO
CONTIDO NO SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Phaeosphaeriaceae* GV-1

CAMPINAS
2020

RAQUEL DE GOUVÊA PORTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA DO PRINCÍPIO ATIVO
CONTIDO NO SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Phaeosphaeriaceae* GV-1

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para
a obtenção do título de Mestra em
Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

O arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Raquel de Gouvêa Portes e orientada pelo Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Portes, Raquel de Gouvêa, 1991-
P835a Avaliação da atividade antifúngica e inseticida do princípio ativo contido no sobrenadante da cultura de Phaeosphaeriaceae GV-1 / Raquel de Gouvêa Portes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Juliano Lemos Bicas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Antifúngicos. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Fungos patogênicos. 4. Atividade antimicrobiana. I. Bicas, Juliano Lemos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the antifungal and insecticidal activity of the active principle from the supernatant of Phaeosphaeriaceae GV-1 culture

Palavras-chave em inglês:

Antifungal agents

Phytopathogenic fungi

Pathogenic fungi

Antimicrobial activity

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliano Lemos Bicas [Orientador]

Taícia Pacheco Fill

Liliana de Oliveira Rocha

Data de defesa: 30-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6016-0098>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0958773073427163>

Comissão examinadora

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
(Orientador)
FEA – UNICAMP

Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill
IQ - Unicamp

Profa. Dra. Liliana de Oliveira Rocha
FEA - Unicamp

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Agradecimentos

Aos meu pais, Elza e Raimundo, por todo o apoio e suporte.

Ao meu namorado, Eduardo, pelo carinho e compreensão durante esse tempo do mestrado.

Ao meu irmão, Flávio, por todo apoio e incentivo, e também pelo suporte durante as análises na USP.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas, pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Kelly Ishida e sua aluna Thayná Barreto, pela disponibilidade e parceria na realização dos testes contra fungos patogênicos.

Ao Dr. Gabriel Moura Mascarin, pelo ensino e apoio na criação e ensaios com os tenébrios.

À Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill e sua aluna Stephanie Nemesio da Silva, pelo apoio no ensaio com as laranjas e por ceder as cepas de fungos de citros.

Ao CPQBA, a Fundecitrus e ao Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos (FEA/Unicamp) pelas cepas de fungos fitopatogênicos cedidas.

Ao Me. Michel Yudi Shinkai Kanemaru, pelo aprendizado e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (FEA/Unicamp) e aos funcionários Angélica, Nadir, Dora e Débora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 143158/2018-0).

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

Resumo

As infecções fúngicas têm se tornado cada vez mais comuns, afetando principalmente pessoas imunocomprometidas, como pacientes transplantados e oncológicos. No agronegócio, as doenças causadas por fungos e infestações por insetos são duas grandes causas de perdas em plantações no mundo todo, comprometendo a produtividade e qualidade dos produtos finais. A busca por novos compostos antifúngicos e inseticidas se torna extremamente necessária nos dias de hoje, devido ao aumento de casos de resistência e a toxicidade dos compostos já utilizados, tanto na área da saúde quanto na área agroalimentar. Este trabalho teve como objetivo estudar a atividade antifúngica do princípio ativo contido no sobrenadante da cultura de *Phaeosphaeriaceae* GV-1, bem como sua ação contra inseto-modelo. O princípio ativo foi testado contra fungos de relevância biomédica e agroalimentar, por meio da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo, e sua ação contra fungos do pós-colheita de citros em laranjas infectadas. Também foi estudada sua ação contra o inseto-modelo *Tenebrio molitor* em bioensaio com as larvas do mesmo. O princípio ativo GV-1 apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra 13 de 16 cepas de importância médica testadas, sendo a *Candida tropicalis* a cepa mais sensível, com CIM₅₀ de 15,6 µg/mL. O composto estudado também apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra 7 das 8 cepas fitopatogênicas testadas, sendo a mais sensível a cepa de *Alternaria* sp., com CIM de 250 µg/mL. O princípio ativo foi capaz de diminuir o desenvolvimento do bolor azul em laranjas infectadas com *Penicillium italicum*. Assim, o composto em estudo se mostra promissor na sua utilização como agente antifúngico, tanto na área médica como na área agrícola.

Abstract

Fungal infections have become increasingly common, affecting mainly immunocompromised people, such as transplant and cancer patients. In agribusiness, diseases caused by fungi and insect infestations are two major causes of losses worldwide, compromising the productivity and quality of final products. The search for new antifungal compounds and insecticides is extremely necessary nowadays, due to the increase in cases of resistance and the toxicity of the compounds already used, both in the health and agricultural areas. This work aimed to study the antifungal activity of the active ingredient contained in the culture supernatant of Phaeosphaeriaceae GV-1, as well as its action against model insect. The active ingredient GV-1 was tested against fungi of biomedical and agrifood relevance, by determining the minimum inhibitory concentration by the broth microdilution method, and its action against citrus postharvest fungi in infected oranges. It was also studied its action against the insect model *Tenebrio molitor* in bioassay with its larvae. The active ingredient GV-1 showed antifungal activity *in vitro* against 13 of 16 strains of medical importance tested, the most sensitive was *Candida tropicalis*, with MIC₅₀ of 15,6 µg/mL. The active ingredient also showed antifungal activity *in vitro* against 7 of the 8 phytopathogenic strains tested, the most sensitive was the strain *Alternaria* sp., with MIC of 250 µg/mL. The active ingredient was able to decrease the development of blue mold in oranges infected with *Penicillium italicum*. Thus, the compound under study shows promise in its use as an antifungal agent, both in the medical and agricultural areas.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T. molitor</i> : (A) larva, (B) pupa e (C) besouro adulto.	27
Figura 2 – Fungo <i>Septoriella</i> spp. (A) Conidioma <i>in vivo</i> de <i>S. phragmitis</i> . (B) Conídios de <i>S. hirta</i> (MARIN-FELIX et al., 2019)	32
Figura 3 – Estrutura química da cercosporamida (SUSSMAN et al., 2004)	33
Figura 4 – Placa de Petri com o fungo <i>Phaeosphaeriaceae</i> sp. GV-1 em meio sólido YM.	36
Figura 5 – Tratamento <i>in vivo</i> contra <i>P. italicum</i> em laranjas tratadas com cercosporamida. (A) Dados do diâmetro da lesão em laranjas infectadas com o fungo <i>P. italicum</i> . Letras iguais no gráfico, no mesmo dia de tratamento, indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (B) Imagens de laranjas utilizadas no ensaio, com 1 a 7 dias de incubação. Tratamentos controle, 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$ (de cima para baixo).	57
Figura 6 - Tratamento <i>in vivo</i> contra <i>P. digitatum</i> em laranjas tratadas com cercosporamida. (A) Dados do diâmetro da lesão em laranjas infectadas com o fungo <i>P. digitatum</i> . Letras iguais no gráfico, no mesmo dia de tratamento, indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (B) Imagens de laranjas utilizadas no ensaio, com 1 a 7 dias de incubação. Tratamentos controle, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (de cima para baixo).	59
Figura 7 – Exemplos de arenas montadas para ensaio com <i>T. molitor</i> . À esquerda arena com tratamento tópico e à direita arena com tratamento via alimentação.	62

Lista de tabelas

Tabela 1 - Cepas patogênicas utilizadas na avaliação da atividade antifúngica da cercosporamida.....	37
Tabela 2 – Intervalos de concentrações dos compostos testados no ensaio de microdiluição em caldo para fungos patogênicos.....	39
Tabela 3 - Cepas fitopatogênicas utilizadas na avaliação da atividade antifúngica da cercosporamida.....	40
Tabela 4 - Susceptibilidade de diferentes leveduras patogênicas a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão expressos em µg/mL.	44
Tabela 5 - Susceptibilidade de diferentes leveduras patogênicas ao fluconazol (FCZ) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.....	45
Tabela 6 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos patogênicos a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão expressos em µg/mL.....	50
Tabela 7 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos patogênicos a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.....	50
Tabela 8 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos fitopatogênicos a itraconazol (ITZ) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL. ...	53
Tabela 9 – Larvas de <i>T. molitor</i> mortas após tratamento com o sobrenadante da fermentação de <i>Phaeosphaeriaceae</i> GV-1 e diferentes concentrações de cercosporamida. Insetos de diferentes arenas mas mesmo tratamento/repetição foram agrupados para melhor visualização dos dados.	62

Lista de abreviações e siglas

AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Meio batata dextrose agar
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CCP	Cercosporamida
CECT	Spanish Type Culture Collection
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CPG	Caspofungina
FCZ	Fluconazol
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
ITZ	Itraconazol
LBQM	Laboratório de Biologia Química Microbiana
LQA	Laboratório de Quimioterapia Antifúngica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
VCZ	Voriconazol
YES	Meio extrato de levedura e sacarose
YM	Meio extrato de levedura, extrato de malte e glicose

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Os antifúngicos e sua importância na área da saúde	17
3.2. Uso de antifúngicos na agricultura	20
3.2.1. Mecanismos de ação dos antifúngicos.....	23
3.3. Insetos como praga na agroindústria	26
3.4. Uso da biotecnologia na prospecção de novos compostos.....	30
3.4.1. Cercosporamida	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Produção e recuperação do composto antifúngico	35
4.2. Avaliação da atividade antifúngica contra fungos de importância médica	37
4.3. Avaliação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos	39
4.4. Avaliação da atividade inseticida da cercosporamida em larvas de <i>T. molitor</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Produção e recuperação de cercosporamida.....	43
5.2. Atividade antifúngica contra fungos patogênicos	43
5.2.1. Leveduras.....	43
5.2.2. Fungos filamentosos	49
5.3. Atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos	53
5.3.1. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	53
5.3.2. Inibição do crescimento fúngico em laranjas	55

5.4. Atividade inseticida contra larvas de <i>T. molitor</i>	61
6 CONCLUSÃO.....	64
Referências	65

1 INTRODUÇÃO

Os fungos representam um reino de organismos com mais de um milhão de espécies. Eles são usados na produção de alimentos, antibióticos e vacinas, habitando todas as partes da vida humana e sendo fundamentais para o ciclo de toda a matéria orgânica. Porém, a competição pela sobrevivência pode levar os fungos a se adaptarem para se tornarem patogênicos contra o hospedeiro suscetível, tais como seres humanos, animais e plantas (FISHER et al., 2012). Na área médica, houve um incremento nas doenças de origem fúngica nos últimos 40 anos, ocasionado principalmente por um maior número de pacientes com sistema de defesa enfraquecido, o que é uma consequência do próprio avanço da medicina, com aumento de sobrevivência de pacientes com AIDS, transplantados, em tratamentos agressivos contra câncer, e outras doenças que comprometem o sistema imune. Dados epidemiológicos e históricos mostram que doenças fúngicas em humanos, animais e plantas representarão grandes complicações para a saúde em um futuro imediato (PERFECT, 2016).

Os antimicrobianos constituem a base fundamental no tratamento das enfermidades infecciosas. São compostos de origem natural ou sintética capazes de inibir o crescimento microbiano, tendo uma forma de ação específica sobre alguma estrutura ou função microbiana, podendo ter poucos efeitos secundários para o hospedeiro (ZEPEDA, 2002). Quando o microrganismo é afetado pelo antimicrobiano, ele é dito sensível a essa substância, porém quando são necessários níveis elevados da droga e seu efeito é ineficiente, o microrganismo é considerado resistente (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

A resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente ao tratamento efetivo de uma gama de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. A resistência antimicrobiana resulta na redução da eficácia de drogas antibióticas, antiparasíticas, antivirais e antifúngicas, resultando em um tratamento mais caro, difícil ou até mesmo impossível, prolongando doenças e aumentando mortalidades. O desenvolvimento da resistência antimicrobiana pode ser um fenômeno natural em

microrganismos, porém é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso e abuso de agentes antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Nos últimos anos, houve claramente um aumento na resistência aos agentes antifúngicos presentes na clínica médica e na agricultura, acontecendo uma evolução paralela, com os mesmos mecanismos-chave de resistência ocorrendo em ambos (FISHER et al., 2018). Na área média, é observado, por exemplo, um aumento da resistência de leveduras e fungos filamentosos à azóis por meio de diferentes mecanismos, e também um aumento nos casos de leveduras resistentes à equinocandinas, considerada a classe mais nova de antifúngicos (PERFECT, 2016). Na área agrícola, o controle de alguns fungos fitopatógenos por fungicidas químicos está se tornando limitado ou até mesmo indisponível, situação análoga com os antibióticos no controle de doenças humanas, sendo que cada vez mais são reportados casos de resistências envolvendo diferentes patógenos e diferentes culturas (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015).

O uso de antimicrobianos biotecnológicos iniciou-se com a descoberta da penicilina e, desde então, vem salvando vidas de pessoas com infecções por microrganismos, sendo que essa deixou de ser uma das principais causas de morte. Devido a sua importância, a indústria farmacêutica e a comunidade científica estão constantemente em busca de novos compostos cada vez mais eficazes (ZEPEDA, 2002). Importantes compostos com atividade antifúngica foram descobertos a partir do metabolismo de fungos, como as estrobirulinas e as equinocandinas, grupos de compostos amplamente utilizados hoje do mercado agrícola e na medicina, respectivamente (BALBA, 2007; ESCHENAUER; DEPESTEL; CARVER, 2007).

Em estudos anteriores, o fungo *Phaeosphaeriaceae* GV-1 foi isolado de goiaba e identificado como capaz de inibir o crescimento de fungos de relevância agroalimentar (KANEMARU, 2014, 2017). Atualmente, o princípio ativo em questão foi recuperado e purificado do sobrenadante desta cultura, e o composto foi identificado como cercosporamida por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas e RMN (dados ainda não publicados). São poucos os estudos na literatura sobre essa substância, e assim esse trabalho tem como objetivo continuar a explorar a

atividade antifúngica deste composto, avaliando sua ação contra fungos de importância médica e agroalimentar, e avaliar também uma possível ação inseticida.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Efetuar ensaios exploratórios para avaliar a atividade da cercosporamida produzida por *Phaeosphaeriaceae* GV-1 contra fungos patogênicos das áreas da saúde e agrícola, e também sua ação contra inseto-modelo *Tenebrio molitor*.

2.2. Objetivos específicos

- i. Produzir o composto antifúngico de *Phaeosphaeriaceae* GV-1 em quantidade suficiente para realização dos ensaios, por meio de fermentação submersa em biorreator de bancada.
- ii. Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima da cercosporamida contra fungos de relevância biomédica e agroalimentar e compará-los com dados da literatura.
- iii. Avaliar o potencial da cercosporamida na inibição do crescimento de fungos em laranjas infectadas com fungos causadores de doenças no pós-colheita de citros.
- iv. Determinar o efeito inseticida da cercosporamida por meio de bioensaio com larvas de *T. molitor*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Os antifúngicos e sua importância na área da saúde

Infecções fúngicas superficiais acometem cerca de 25% da população mundial, levando a doenças bastante conhecidas, como pé-de-atleta, micose do couro cabeludo e infecção nas unhas, sendo comum também infecções orais e genitais. Essas infecções superficiais são causadas principalmente por espécies de *Candida* e a incidência de cada infecção em particular varia de acordo com condições socioeconômicas, regiões geográficas e hábitos culturais. Infecções fúngicas invasivas tem uma incidência muito menor do que as superficiais, porém elas estão associadas a altas taxas de mortalidades, sendo assim um objeto de grande preocupação (BROWN et al., 2012).

As infecções fúngicas invasivas são as infecções que acometem locais estéreis do corpo, como corrente sanguínea, sistema nervoso central e órgãos como fígado, rins e pulmão. Muitos dos fungos que causam doenças invasivas infectam a maioria dos seres humanos, mas a maior parte das doenças clinicamente significativas ocorrem em pessoas com o sistema imunológico comprometido (ROEMER; KRYSAN, 2014). O aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas pode ser correlacionado com o aumento no número de pessoas vivendo em condições ou tratamentos que afetam o sistema imunológico, como por exemplo HIV/AIDS, quimioterapia contra câncer, transplante de órgãos, prematuridade e medicamentos imunomoduladores (RICHARDSON, 2005).

No Brasil, estimativas do Ministério da Saúde em 2016, apontam que mais de 3,8 milhões de pessoas sofram de alguma infecção fúngica séria. O custo estimado durante todo o tratamento, de um único paciente com micose disseminada, pode chegar ao valor de 250 mil reais. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2016 as mortes causadas por infecções fúngicas foram a quinta maior causa de mortalidade no mundo, atrás apenas de tuberculose, diarreia, acidentes de trânsito e diabetes. As infecções sistêmicas, que são as mais severas, causam cerca de 1,6 milhão de mortes por ano (MOROSINI, 2019).

Espécies de *Candida* são as causas mais frequentes de infecções fúngicas no mundo, incluindo infecções superficiais e doenças invasivas, sendo uma grande ameaça para pacientes em unidades de terapia intensiva. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada no cenário clínico, sendo responsável pelo rápido aumento de infecções invasivas adquiridas em hospitais, sendo relatado isolados clínicos resistentes à três diferentes classes de antifúngicos (LOCKHART et al., 2017). Diversas espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, são bem conhecidas por causarem infecções na corrente sanguínea, em diferentes regiões geográficas. A *C. glabrata* é comumente resistente ao fluconazol, mas também há o registro de cepas resistentes à equinocandinas (ALEXANDER et al., 2013). A *C. auris*, uma levedura multirresistente que exibe resistência ao fluconazol e susceptibilidade variável a outros azóis, anfotericina B e equinocandinas, emergiu globalmente como um patógeno hospitalar, se espalhando em um curto período por vários países e causando uma grande gama de infecções invasivas associadas à assistência médica (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017). Há também uma crescente ameaça de fungos filamentosos patogênicos que são intrinsicamente resistentes a uma ampla gama de antifúngicos, como *Aspergillus terreus*, *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp. e membros dos Mucorales (FISHER et al., 2018).

Atualmente, as escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas invasivas são limitadas a três principais classes de antifúngicos, sendo elas as classes dos polienos, azóis e equinocandinas. Análogos de pirimidina também são utilizados, mas devido à resistência ser comum, é usado como adjuvante e não tratamento primário. Entretanto, essas drogas possuem diversas desvantagens em relação à toxicidade, ao espectro de ação, à segurança e a propriedades farmacocinéticas (CAMPOY; ADRIO, 2017).

A classe mais antiga de antifúngicos é a dos polienos, que também é uma das mais tóxicas. A anfotericina B, que faz parte desse grupo, tem ação fungicida e é um dos antifúngicos de mais largo espectro. Essa droga se liga ao ergosterol, um esterol de membrana único dos fungos, como parte do seu mecanismo de ação. Apesar de formulações lipídicas com a anfotericina B terem reduzido problemas com toxicidade, essas formulações ainda são caras e não estão disponíveis em algumas

regiões (ROEMER; KRYSAN, 2014). O uso de anfotericina B com o adjuvante flucitosina é comumente utilizada no tratamento de meningite causada por espécies de *Cryptococcus*, tendo também atividade clinicamente útil contra *Candida* spp. (BENNETT, 2012; DAY et al., 2013).

Os azóis correspondem à classe de antifúngicos mais utilizada, sendo fluconazol, voriconazol e posaconazol os mais comumente utilizados para tratar infecções fúngicas invasivas. Eles comprometem a biossíntese de ergosterol na membrana citoplasmática e geralmente possuem ação fungistática. Os azóis são extremamente bem tolerados, mas causam interferência no metabolismo de diversas outras drogas devido à sua capacidade interagir com os citocromos P450 hepáticos, podendo elevar o nível plasmático do outro fármaco ou ainda ter sua concentração plasmática reduzida. Geralmente, o fluconazol possui ampla atividade contra leveduras clinicamente relevantes, incluindo *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., porém ele não tem importância clínica contra fungos filamentosos. Por outro lado, voriconazol, itraconazol e posaconazol tem ação contra leveduras e bolores, sendo o voriconazol o tratamento de referência para *Aspergillus* spp. (BENNETT, 2012; ROEMER; KRYSAN, 2014).

As equinocandinas compreendem a classe de antifúngicos mais recentemente descoberta, sendo aprovada para uso no início dos anos 2000 (ROEMER; KRYSAN, 2014). As equinocandinas em uso clínico atualmente são a caspofungina, micafungina e anidulafungina, sendo a primeira opção no tratamento para candidíases invasivas. Elas geralmente são bem toleradas, apresentando poucas interações medicamentosas e reações adversas, porém seu uso é limitado devido à necessidade de administração intravenosa diária, falta de formulações orais e espectro limitado. As equinocandinas têm como mecanismo de ação a inibição da síntese de 1,3- β -glucano, um componente-chave na parede celular dos fungos, tendo ampla ação fungicida contra *Candida* spp. (CHANG; SLAVIN; CHEN, 2017).

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de novos antifúngicos para uso terapêutico é a similaridade do alvo com o hospedeiro, o que não acontece no desenvolvimento de antibacterianos. Muitos processos biológicos e bioquímicos fundamentais são semelhantes em fungos e humanos, assim sendo, muitas moléculas

que são tóxicas para fungos também acabam sendo tóxicas para humanos. As três principais classes de antifúngicos têm como alvo estruturas específicas dos fungos (ROEMER; KRYSAN, 2014). O uso combinado de drogas que já são amplamente utilizadas se mostra mais eficaz do que seus usos isolados, devido a um efeito sinérgico. Mas, ainda assim, é necessário o desenvolvimento de novos antifúngicos que sejam mais eficientes e com menores custos, para também suprir as deficiências dos atuais medicamentos, como toxicidade, interações medicamentosas indesejáveis, baixa disponibilidade em certas regiões, alto custo, vias de administração e surgimento de cepas resistentes (BROWN et al., 2012).

3.2. Uso de antifúngicos na agricultura

Um dos principais danos às plantações são as doenças causadas por vários organismos fitopatogênicos, sendo que os fungos são a principal causa de perdas em plantações no mundo todo (MCGRATH, 2016). Os impactos causados por doenças fúngicas são claramente manifestados nas lavouras e trazem consigo um impacto econômico mensurável e uma ameaça à segurança alimentar. As doenças em plantas causadas por fungos atingem grande parte das culturas no mundo todo, incluindo as maiores culturas mundiais de produtos agrícolas, como arroz, trigo, milho, batata e soja. Levando em consideração apenas essas cinco maiores culturas agrícolas, e considerando apenas infecções com baixa persistência, essas doenças seriam responsáveis por perdas que, se fossem evitadas, seriam suficientes para alimentar 8,5% das 7 bilhões de pessoas presentes no mundo em 2011 (FISHER et al., 2012).

O uso de antifúngicos é necessário para controlar grande parte de doenças em plantas, pois estas afetam a produtividade e qualidade dos produtos agrícolas, causando impactos econômicos por seu valor de mercado reduzido e queda na produtividade. Também, são importantes no pós-colheita, onde há grandes perdas de frutas, vegetais, tubérculos e sementes. Sendo assim, o uso de antifúngicos é de grande importância na evolução da agricultura, colaborando assim no aumento do rendimento das colheitas, melhora da qualidade dos produtos e estabilidade na produção (MCGRATH, 2016; RUSSELL, 2005). No Brasil, o mercado de fungicidas

movimentou em 2019 cerca de 4,3 bilhões de dólares, representando 31% do mercado total de defensivos agrícolas. Neste mesmo ano foram aplicadas cerca de 189 mil toneladas de fungicidas em 284 milhões de hectares (SINDIVEG, 2019).

Os fungos fitopatogênicos têm sua relevância econômica, científica e social de acordo com cada região. Mundialmente, podemos citar o *Magnaporthe oryzae*, agente causador de brusone em arroz, a doença mais destrutiva em arroz mundialmente. É uma cultura de grande importância econômica e social, pois metade da população mundial tem o arroz como sua principal fonte de calorias. O *Botrytis cinerea*, conhecido como mofo cinzento, tem seu impacto devido à grande variedade de hospedeiros que ele pode atacar, podendo infectar mais de 200 espécies de plantas, causando sérios danos, tanto no pré quanto no pós-colheita. O *Fusarium oxysporum* é o patógeno que causa a murcha vascular, podendo infectar mais de 100 hospedeiros diferentes, provocando severas perdas em culturas como melão, tomate, algodão e banana. O *Colletotrichum* é um dos gêneros mais comuns e importantes de fungos fitopatogênicos, sendo que praticamente todas as culturas estão susceptíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum*. Esses fungos causam antracnose e podridões pós-colheita, podendo causar grande perdas em culturas de frutas, vegetais e plantas ornamentais (DEAN et al., 2012).

No cenário nacional, o Brasil é o principal exportador de suco de laranja, açúcar e café, e o segundo maior de soja e milho (EMBRAPA, 2018). Com essas grandes produções, o controle de alguns fitopatógenos se torna um grande desafio. Como exemplo, podemos citar a ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, que em áreas não tratadas pode causar perdas de produtividade de até 90%. Seu controle é feito principalmente com triazóis e estrobirulinas, mas tem sido relatada uma menor sensibilidade do fungo a esses compostos (GODOY et al., 2016). Outro grande problema é a ferrugem do café, causado por *Hemileia vastatrix*, que em regiões cafeeiras mais propícias podem causar diminuição do rendimento da produção entre 30 e 50%. Seu controle atualmente é feito com o uso de antifúngicos cúpricos e sistêmicos, porém essa prática representa um risco ambiental e aumento de custos, devendo seguir boas práticas nas aplicações para que se reduza os riscos de desenvolvimento de cepas resistentes (TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM, 2016).

A citricultura é uma das culturas de grande importância econômica para o Brasil, sendo o segundo maior produtor de citros no mundo, chegando a 16,6 milhões de toneladas em 2016, e também o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017). Diversas doenças comprometem a qualidade dos citros na lavoura, como, por exemplo, a pinta preta, causada por *Phyllostica citricarpa*, a gomose do citros, causado por diferentes espécies do gênero *Phytophthora*, e a podridão floral, causada por *Colletotrichum acutatum*, sendo responsáveis por grandes perdas e reduções nas produções (GAMA et al., 2019; TONIAL et al., 2017; URASHIMA; MISTURA; GONÇALVES, 2016).

As perdas no pós-colheita também são representativas na produção agrícola, principalmente para produtos frescos. Estima-se que entre 15 e 50% das frutas e vegetais produzidos em escala global são perdidos após a colheita, tendo como principal causa a deterioração microbiológica. Esse valor pode ser ainda maior em países em desenvolvimento, onde faltam tecnologias adequadas para o armazenamento de frutas e vegetais. Esses produtos sofrem mudanças fisiológicas e bioquímicas após a colheita, favorecendo assim o desenvolvimento de patógenos pós-colheita e a incidência de doenças, sendo essa a principal causa de perdas na cadeia produtiva (ROMANAZZI et al., 2017)

Doenças no pós-colheita de citros podem causar perdas econômicas significativas e ainda levar a formação de micotoxinas, representando um risco para a saúde humana. As principais doenças no pós-colheita de citros são o bolor verde, o bolor azul e a podridão azeda, causados por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Geotrichum citri-aurantii*, respectivamente. Somente o *P. digitatum* sozinho é responsável por 90% das perdas no pós-colheita em citros. Os frutos são contaminados por meio de danos causados na casca, e a doença se manifesta durante o beneficiamento, armazenamento, transporte e comercialização (BAZIOLI et al., 2019). Fungicidas como tiabendazol, imazalil e pirimetanil são utilizados no controle dos bolores verde e azul, porém esses compostos não são eficazes contra a podridão azeda. Para o controle do *G. citri-aurantii*, guazatina e propiconazol podem ser utilizados, mas o primeiro não é registrado no Brasil, e o segundo não tem seu uso

indicado para podridão azeda pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No Brasil ainda não foi registrado nenhum fungicida que seja eficiente e recomendado para o controle da podridão azeda (FERRAZ et al., 2016; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2020).

3.2.1. Mecanismos de ação dos antifúngicos

Os antifúngicos químicos foram, por muito tempo, efetivos contra uma gama de diferentes patógenos com uma baixa dosagem de uso, e assim seu uso teve um crescimento notório ao longo dos anos (RUSSELL, 2005). Porém, o uso prolongado e contínuo de antifúngicos podem acarretar o desenvolvimento de cepas resistentes e ser prejudicial ao meio ambiente, além disso, os resíduos presentes nas cascas de frutos podem ser prejudiciais à saúde humana. Os fungicidas usados na agricultura atualmente correm o risco de perderem sua eficácia devido à seleção de cepas resistentes dos patógenos-alvo, assim, o desenvolvimento de novos compostos mais seguros e com melhor eficiência é extremamente necessário (CHEN et al., 2019; GRIMMER et al., 2014).

Os fungicidas inibem o crescimento celular interferindo em processos cruciais para o desenvolvimento da célula, sendo que a maneira como um processo celular específico é inibido é chamado de modo de ação. Atualmente, são descritos pelo Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) 11 modos de ação para os fungicidas já conhecidos, sendo que alguns ainda não tiveram seu modo de ação completamente elucidado. A disponibilidade de fungicidas com diferentes modos de ação, e ainda com sites de ação específicos, é crucial para o controle de grandes doenças em plantações, sendo benéfico para o meio ambiente e para mitigar problemas com resistência. O uso de um único ou poucos tipos de fungicidas durante anos representa um risco muito maior de efeitos colaterais e favorece a resistência dos fungos alvos (FRAC, 2020).

Os agentes antifúngicos mais importantes e mais utilizados na agricultura incluem as classes dos benzimidazóis, inibidores de succinato desidrogenase, as anilopirimidinas, as estrobirulinas, as morfolinas e os azóis, sendo que essa última classe, principalmente os triazóis, os mais utilizados em campo. O benzimidazol

apresenta, além de sua atividade fungicida, diversas atividades biológicas como, por exemplo, atividade antiparasitário, antihelmíntico e antiviral, e assim ele vem sendo amplamente utilizado para o manejo de culturas desde a sua descoberta. Ele atua inibindo a formação de microtúbulos no citoesqueleto das células, o que prejudica a divisão celular, podendo levar à morte celular (BRAUER *et al.*, 2019). A resistência ao benzimidazol foi reportada em aproximadamente 115 espécies de fungos, sendo considerado pela FRAC um fungicida com alto risco de desenvolvimento de cepas resistentes (FRAC, 2020; HAWKINS; FRAAIJE, 2016).

Os inibidores de succinato desidrogenase, atuam na inibição da respiração fúngica, bloqueando o local de ligação da ubiquinona (Q-site) no complexo II da mitocôndria. A carboxina, um inibidor de succinato desidrogenase de primeira geração, foi o primeiro fungicida desta classe, introduzido no mercado em 1966, tendo como alvo os basidiomicetos. Os antifúngicos boscalida, fluxapiroxade e fluopiram, de segunda geração, exibem alta atividade antifúngica em cereais, árvores frutíferas e vegetais (BRAUER *et al.*, 2019). Essa classe de fungicidas apresenta amplo espectro de ação, porém sua aplicação intensiva pode levar ao desenvolvimento de cepas patogênicas resistentes, sendo classificado pela FRAC como médio a alto risco para o aparecimento de cepas resistentes (FRAC, 2020).

As anilopirimidinas foram introduzidas no mercado no início dos anos 90 e são usadas contra ascomycetos, sendo utilizada no controle do bolor cinza causado por *Botrytis cinerea* em frutas, vegetais e flores ornamentais. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de metionina e secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, cutinases e lipases) (MOSBACH *et al.*, 2017). É considerado como risco médio no desenvolvimento de resistência (FRAC, 2020).

A classe das estrobirulinas recebe esse nome por serem derivados da estrobirulina A, um composto natural produzido por cogumelos do gênero *Strobirulus* que são instáveis na presença de luz, não sendo úteis para o manejo de plantações. Com modificações em sua estrutura química, é possível obter derivados fotoestáveis e com atividade antifúngica, possibilitando sua utilização, sendo encontrado hoje no mercado 18 fungicidas pertencentes a esta classe. As estrobirulinas inibem a cadeia de transferência de elétrons da respiração mitocondrial, atuando no complexo III (complexo

enzimático do citocromo bc_1) (BRAUER *et al.*, 2019; FISHER *et al.*, 2018). As estrobirulinas tem um amplo espectro de ação contra fungos, mas é considerada pela FRAC como alto risco para desenvolvimento de cepas resistentes (FRAC, 2020).

As morfolinas são compostos orgânicos que são utilizados no controle de oídio e doenças foliares em cereais. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição de duas enzimas envolvidas na síntese de ergosterol, a $\Delta 14$ -redutase e $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerase (MAZU *et al.*, 2016). A FRAC classifica as morfolinas com baixo a médio risco de desenvolvimento de cepas resistentes, porém tem sido relatado uma diminuição na sensibilidade dessa classe de fungicidas contra oídio, com mecanismo ainda desconhecido (FISHER *et al.*, 2018; FRAC, 2020).

Os azóis correspondem à classe de antifúngico mais utilizada em plantações. Seu mecanismo de ação envolve a alteração da enzima lanosterol 14α -demetilase, que converte lanosterol em ergosterol, componente essencial da membrana citoplasmática, suprimindo assim o crescimento e multiplicação do fungo alvo. Os azóis são amplamente utilizados, pois são compostos de baixo custo e com amplo espectro de ação, sendo utilizados no pré- e pós-colheita para prevenir a contaminação por leveduras e fungos filamentosos. Porém, seu uso excessivo pode causar a contaminação do solo, ar e plantas, podendo permanecer inalterado no ambiente e nos alimentos por meses, devido a sua alta estabilidade (BRAUER *et al.*, 2019). É considerado com um médio risco para o desenvolvimento de cepas resistentes (FRAC, 2020).

O uso extensivo de azóis na agricultura pode afetar fitopatógenos com relevância médica, sendo que diversas doenças em humanos são causadas por fungos que sobrevivem no ambiente e em alimentos, como *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (AZEVEDO *et al.*, 2015). *Aspergillus fumigatus*, um fungo sapófito que pode viver no solo, produz esporos que são transportados pelo ar, podendo ser inalados por humanos. A resistência do *A. fumigatus* tem sido observada em pacientes que receberam longos tratamentos com azóis, uma vez que são os principais antifúngicos utilizados no tratamento de aspergiloses (MISCH; SAFDAR, 2016). Porém, a resistência do *A. fumigatus* também tem sido reportada em vários casos onde os pacientes nunca foram tratados com azóis, sendo levantada então a

hipótese de que possa haver outras fontes de exposição a fungos resistentes a azóis, como culturas agrícolas (BERGER et al., 2017).

Os fungicidas variam muito em seu potencial de causar efeitos colaterais em humanos. Muitos têm baixa toxicidade inerente em mamíferos e utilizam métodos de aplicação de maneira que poucos indivíduos são expostos. Historicamente, as intoxicações agudas ocorreram por ingestão acidental, mas mesmo assim, fungicidas podem causar irritações na pele e mucosas e sensibilização dérmica, sendo um risco maior para aqueles que manipulam os produtos em campo, o que em países movidos pela agricultura, como o Brasil, é um número considerável de pessoas expostas (ROBERTS; REIGART, 2013). Além disso, diversos antifúngicos são considerados possíveis carcinogênicos para humanos (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2018).

Para que não ocorra um colapso global no controle das infecções fúngicas e para evitar falhas na medicina e segurança alimentar, é necessário melhorar a administração dos produtos existentes e também incentivar e promover a descoberta de novos compostos antifúngicos com diferentes mecanismos de ação em relação aos já descritos, com a finalidade de desenvolver tratamentos eficientes contra fungos resistentes, tanto na área agrícola quanto na área da saúde humana (FISHER *et al.*, 2018).

3.3. Insetos como praga na agroindústria

Os insetos são considerados os mais diversos seres de todas as espécies no mundo, representando cerca de 75% de todos os animais, sendo os mais adaptáveis a qualquer condição e forma de vida. Insetos tem impactos positivos no meio ambiente, como predadores de pragas, polinizadores, decompositores e fabricantes de produtos como seda e mel. Apesar de apenas 1% de todos os insetos serem considerados pragas, esses causam grandes danos às plantações, produtos estocados e prédios, podendo ainda serem vetores de doenças em pessoas e animais (NAWAZ; GOGI; SUFYAN, 2016). Estima-se que os artrópodes são responsáveis por destruir entre 18 e

26% da produção anual agrícola mundial, causando um prejuízo de US\$ 470 bilhões, com a maior parte das perdas ocorrendo ainda no campo (CULLINEY, 2014).

O *Tenebrio molitor*, também conhecido como larva da farinha, pertence à ordem Coleoptera e a família Tenebrionidae. É um inseto que apresenta metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e besouro adulto (Figura 1). Ele pode ser encontrado em ambientes extremamente secos, conseguindo sobreviver por longos períodos sem acesso a água, sendo capaz de absorver água da atmosfera quando a umidade é relativamente alta (GILLOTT, 2005). Devido a essas características, ele consegue sobreviver em armazéns de produtos secos, sendo uma praga que atinge cereais, massas e rações animais. Sua presença em grãos e farelos pode levar a uma contaminação dos alimentos com fragmentos e fezes do inseto e, indiretamente, com microrganismos saprófitos, causando assim perda de qualidade no produto final. O *T. molitor* pode causar perdas de até 15% da produção de grãos e farinhas em todo o mundo (MARTÍNEZ et al., 2018).

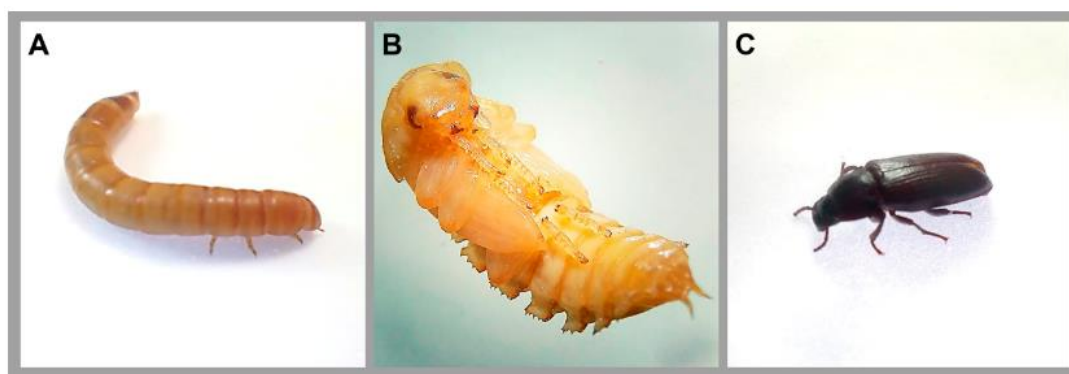


Figura 1 - Ciclo de vida do *T. molitor*: (A) larva, (B) pupa e (C) besouro adulto.
(SOUZA et al., 2018)

O controle de infestações por *T. molitor* é usualmente feito com inseticidas químicos, porém esse método tem suas restrições, como toxicidade residual e resistência do inseto. A fosfina é comumente utilizada no controle de *T. molitor*, mas por se tratar de um fumegante, o mesmo não é capaz de eliminar os ovos de insetos, além de outras questões que vem sendo discutidas sobre o uso de inseticidas químicos, como resíduos, impacto ambiental e toxicidade para humanos (MARTÍNEZ et al., 2018).

Os inseticidas sintéticos são na maioria das vezes eficazes contra pragas no agronegócio, porém seu uso pode trazer perigo para seres humanos e animais domésticos. O uso indiscriminado e ilegítimo de pesticidas sintéticos, especialmente inseticidas, levaram nas últimas décadas a diferentes problemas com pragas, como resistência dos insetos aos compostos utilizados, ressurgimento de pragas, resíduos em alimentos, água e solo, além dos riscos toxicológicos aos humanos e animais (BUNERI et al., 2019).

O uso de inseticidas orgânicos sintéticos teve início na década de 1940, o que trouxe grande melhoria na eficácia e espectro dos inseticidas, e houve então a expansão em larga escala do uso desses novos compostos como ferramenta no controle de insetos pragas. Consequentemente, devido ao uso repetitivo e extensivo desses produtos, houve um rápido aumento no número insetos resistentes a esses compostos, e esse número continua aumentando, sendo que o número de casos de resistência a inseticidas é muito maior que os casos de resistência a antifúngicos e herbicidas (SPARKS; NAUEN, 2015).

Os inseticidas organofosforados são possivelmente os mais utilizados mundialmente, mas também são os que mais causam intoxicações e grande número de mortes, sejam acidentais, ocupacionais ou intencionais. Existem mais de 35 mil formulações de compostos organofosforados em uso nos últimos 40 anos. Os carbamatos também possuem um grande espectro de uso, sendo conhecido mais de 50 compostos desse grupo. Os organofosforados e os carbamatos pertencem a diferentes grupos químicos mas possuem um mesmo mecanismo de ação, causando disfunções no sistema nervoso autônomo, por meio da inibição da enzima colinesterase (PARANÁ, 2018).

O sistema nervoso é o principal órgão alvo de inseticidas e, consequentemente, eles podem causar neurointoxicações agudas, mas uma exposição a longo prazo também pode causar danos, como em trabalhadores do setor agropecuário e pessoas que residem próximo a lavouras. Há hipóteses que essa exposição crônica tem um envolvimento significativo na patogênese de doenças neurológicas multifatoriais (CASSEREAU et al., 2017).

Inseticidas podem ter um efeito subletal em artrópodes benéficos, como abelhas produtoras de mel, polinizadores e inimigos naturais de pragas. Esses efeitos incluem alterações no desenvolvimento larval, capacidade imunológica, fecundidade, proporção sexual, mobilidade, entre outros, podendo assim ter um impacto nas comunidades desses insetos. Os insetos polinizadores são de grande importância para algumas culturas, e sem eles, ou com sua comunidade reduzida, pode-se ter redução na produtividade dessas culturas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Alternativas aos inseticidas sintéticos podem ser obtidas, por exemplo, de compostos ativos extraídos de plantas, no uso de microrganismos no combate a pragas, e de compostos produzidos por fungos. Óleos essenciais de canela e cravo e o óleo extraído de cedro-do-himalaia têm se mostrado promissores para serem usados no manejo de pragas (BUNERI et al., 2019; MARTÍNEZ et al., 2018). A bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente conhecida e utilizada comercialmente como bioinseticida. Ela forma um cristal parasporal durante a fase estacionária do seu ciclo de crescimento, sendo sua atividade inseticida atribuída a esses cristais, sendo assim uma alternativa ou complemento ao uso de pesticidas químicos na agricultura, manejo florestal e controle de mosquitos (SCHNEPF et al., 1998).

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários com efeito inseticida, como, por exemplo, espécies do gênero *Trichoderma*, que produzem os metabólitos tricontermina, tricontermol, harzianum A, harzianolide e peptaibols, que apresentaram atividade contra *T. molitor*; e as quitinases produzidas por *Alternaria alternata*, que apresentaram atividade contra mosca das frutas. Os gêneros *Muscodor* sp. e *Gliocadium* sp., produzem compostos inseticidas voláteis, podendo assim serem usados como fumigantes no controle de pragas (KUMARI et al., 2014).

Em face dos diversos problemas citados, é necessária uma busca por compostos como uma alternativa dos pesticidas em uso. Com uma população mundial estimada em 10 bilhões de pessoas até o final do século, é de extrema importância a melhora de produtividade agrícola, e uma das estratégias envolve a redução de perdas causadas por pragas, como insetos, fungos e plantas daninhas (CULLINEY, 2014).

3.4. Uso da biotecnologia na prospecção de novos compostos

A definição de biotecnologia envolve o uso de microrganismos ou enzimas para obtenção de produtos utilizados em diversos setores, como saúde, agricultura, alimentos e meio ambiente. Os processos biotecnológicos têm um papel histórico e tecnológico relevantes, visto que muitos processos consagrados nos dias de hoje utilizam microrganismos, nativos ou modificados geneticamente, que foram a base dos primeiros processos industriais (PEREIRA JR; BON; FERRARA, 2008).

Um marco na produção de compostos bioativos derivados de fungos foi a descoberta da produção de penicilina a partir de *Penicillium crysogenum*, em 1929 por Alexandre Fleming (FLEMING, 1929). Muitos compostos de grande importância foram posteriormente descobertos, como o primeiro imunossupressor, a ciclosporina A, que é produzido pela espécie *Tolypocladium inflatum*, e também a lovastatina e mevastatina, que atuam na redução colesterol e foram obtidos de *Aspergillus terreus* e *Penicillium* spp., respectivamente (LAUPACIS et al., 1982; SINGH; PELAEZ, 2008). O primeiro antifúngico produzido por fungo foi a griseofulvina, isolada do fungo *Penicillium griseofulvum* em 1939 (OXFORD; RAISTRICK; SIMONART, 1939), sendo um dos medicamentos essenciais nos sistemas básicos de saúde, segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em um estudo anterior de membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (FEA/Unicamp), o fungo Phaeosphaeriaceae GV-1 foi isolado de goiaba e identificado como capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium expansum* (KANEMARU, 2014). Na sequência, o efeito antifúngico do Phaeosphaeriaceae GV-1 foi avaliado contra fungos de relevância agroalimentar. Foram testadas 16 cepas de fungos de diferentes gêneros, sendo que *Phyllostica citricarpa*, *Moniliophthora perniciosa* e *Colletotrichum nymphaeae* foram os fungos mais susceptíveis ao efeito antifúngico. Apenas o gênero *Penicillium* sp. não teve seu crescimento inibido por Phaeosphaeriaceae GV-1, sendo o único resistente nas condições avaliadas (KANEMARU, 2017). A identificação do fungo foi realizada em parceria com Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os resultados obtidos até agora

mostram similaridade com os fungos *Septoriella hirta*, *S. agrostina* e *S. hubertusii*, porém ainda não é possível afirmar o gênero e espécie, sendo necessário novos estudos utilizando sequenciamento de outras regiões e análises morfológicas para a identificação em nível de espécie. Contudo, pode-se afirmar que a cepa isolada GV-1 pertence à família Phaeosphaeriaceae.

A família Phaeosphaeriaceae é uma das maiores famílias dentro da ordem Pleosporales, possuindo mais de 20 gêneros e centenas de espécies, com sua taxonomia sendo sujeita a mudanças nos últimos anos. As espécies dessa família incluem importantes fitopatógenos, como por exemplo *Parastagonospora nodorum* que causa manchas nas folhas e glume de cereais como cevada e trigo, e *Parastagonospora avenae* que causa manchas nas folhas de cevada e centeio. Algumas espécies são endofíticos e outras parasitas obrigatórios de algas (CROUS et al., 2015; MARIN-FELIX et al., 2019; PHOOKAMSAK et al., 2014). Recentemente, também houve a inclusão de um novo gênero, o *Tintelnotia*, contendo duas espécies capazes de causar infecções nos olhos e unhas de humanos (AHMED et al., 2017). A maioria das espécies do gênero *Septoriella* (Figura 2), pertencente à família Phaeosphaeriaceae, são saprófitos. *S. hirta* é considerado um fitopatógeno secundário de importância econômica, sendo frequentemente encontrado em associação com outros fungos, como *Gaeumannomyces graminis* e *Oculimacula yullandae*. As plantas infectadas por *S. hirta* estão predispostas a um colapso prematuro, uma vez que o fungo gera uma fragilidade no colmos das plantas, aumentando os custos e diminuindo a qualidade da produção agrícola (CROUS et al., 2015).

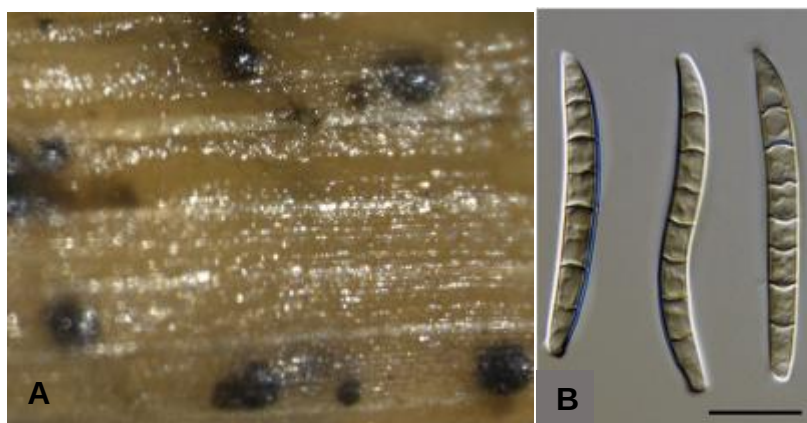


Figura 2 – Fungo *Septoriella* spp. (A) Conidioma *in vivo* de *S. phragmitis*. (B) Conídios de *S. hirta* (MARIN-FELIX et al., 2019)

Atualmente, o princípio ativo em questão já foi recuperado e purificado do sobrenadante desta cultura, estando disponível para teste em quantidade da ordem de dezenas de miligramas a alguns gramas. O composto foi identificado como cercosporamida, utilizando Espectrometria de Massas MS/MS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). São poucos os estudos na literatura sobre a cercosporamida, mas os existentes relatam propriedades biológicas de grande interesse, como atividade anticâncer, redução da glicose sanguínea, atividade herbicida, além da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos.

3.4.1. Cercosporamida

A cercosporamida foi primeiramente descrita em 1991 por Sugawara e colaboradores, e sua estrutura química é mostrada na Figura 3. Ela foi isolada do sobrenadante da fermentação de *Cercosporidium henningsii*, um fitopatôgeno que afeta as folhas da mandioca, e teve sua estrutura deduzida por análises de difração de raio-x e espectroscopia por ressonância magnética nuclear. A cercosporamida apresentou fitotoxicidade contra mandioca, milho e beldroega, mas não teve efeito em dente de leão, tomate e pepino, sendo assim descrita como uma toxina seletiva. A cercosporamida também foi testada contra várias leveduras patogênicas humanas,

dermatófitos e fungos oportunistas, utilizando teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* que deu valores tão baixos quanto 1 µg/mL (SUGAWARA et al., 1991).

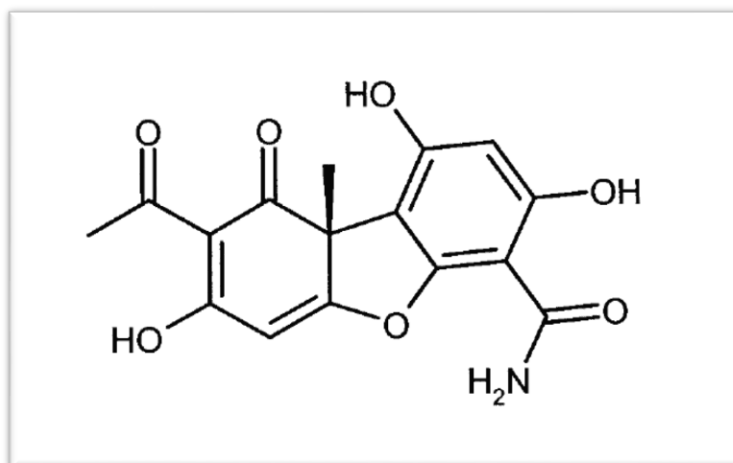


Figura 3 – Estrutura química da cercosporamida (SUSSMAN et al., 2004)

São poucos os estudos encontrados na literatura sobre o efeito antifúngico da cercosporamida. Entre eles podemos citar o trabalho de Conover e colaboradores (1992), que testaram a atividade antifúngica da cercosporamida contra diversas cepas patogênicas, com valores de CIM entre 1 µg/mL, para *Trichophyton tonsurans*, e 128 µg/mL, para *C. tropicalis*. A cercosporamida também apresentou atividade antifúngica contra diversos fungos fitopatogênicos, com redução de 50% do crescimento radial em concentrações de $5,29 \times 10^{-3}$ µg/mL, para *Pestalotia diospyri*, a 6,7 µg/mL para *P. digitatum* (WANG et al., 2019). Atividade antibacteriana também foi descrita para a cercosporamida, apresentando CIM de 2 µg contra *Staphylococcus aureus*, mas sem efeito contra *Escherichia coli* (CIM >500 µg) (HOFFMAN et al., 2008).

A cercosporamida é um inibidor altamente seletivo da Pkc1 (Protein kinase C-like 1), uma proteína cinase que medeia a manutenção da integridade da parede celular, sendo fundamental para a biossíntese dessa estrutura. A via de sinalização mediada pela Pkc1 é altamente conservada em fungos, e a perda da função dessa proteína leva a uma rápida autólise da célula, apresentando assim um grande potencial de alvo molecular para o desenvolvimento de antifúngicos (SUSSMAN et al., 2004). Compostos exibindo atividade antifúngica associada à inibição de Pkc1 não são

encontrados na literatura, exceto a cercosporamida, apresentando assim uma nova estratégia para o desenvolvimento de antifúngicos (DAO et al., 2018).

Outras atividades biológicas também são descritas para a cercosporamida e seus derivados, como a redução da glicose plasmática em camundongos hiperglicêmicos. A cercoposramida foi capaz de reduzir a glicose plasmática, porém isso foi acompanhado de efeitos tóxicos, como diminuição da ingestão de alimentos e perda de peso corporal. Compostos sintéticos derivados de cercosporamida foram capazes de reduzir a glicose plasmática sem efeitos tóxicos (FURUKAWA et al., 2009). A atividade anticâncer também é descrita em alguns estudos com cultura de células e animais, apresentando resultados iniciais promissores contra câncer de pulmão, fígado, rins e leucemia, se mostrando um potente inibidor de Mnk quinases e apresentando biodisponibilidade oral (ALTMAN et al., 2013; CHEN et al., 2020b; KONICEK et al., 2011; LIU et al., 2016). A cercosporamida apresentou efeito sinérgico com sunitinib e tensirolimo no tratamento de camundongos com tumores renais, não apresentando nenhum sinal evidente de toxicidade no grupo de tratamento (CHEN et al., 2020b). Em comparação com as células de carcinoma hepatocelular, observou-se que as células normais do fígado foram significativamente menos sensíveis ao tratamento com cercosporamida, demonstrando a toxicidade seletiva da cercosporamida contra carcinoma hepatocelular versus células normais do fígado (LIU et al., 2016).

Espera-se que o presente estudo possa ampliar o conhecimento acerca das propriedades da cercosporamida, diversificando suas possíveis aplicações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção e recuperação do composto antifúngico

Para a produção e extração da cercosporamida foi utilizado o fungo GV-1, previamente isolado de goiaba (KANEMARU, 2014) e identificado por meio da comparação por BLAST da sequência ITS por parceiros do nosso grupo de pesquisa. Como as espécies mais semelhantes foram *Septoriella hirta* (NR145192), *Poaceicola agrostina* (NR157533) (sinônimo *Septoriella agrostina*) e *Septoriella hubertusii* (NR157586), todas com similaridade pouco acima de 95% (dados ainda não publicados), não foi possível nem mesmo a confirmação do gênero, sendo preferível a classificação desta cepa como Phaeosphaeriaceae GV-1. Para armazenamento, o fungo é mantido a -18 °C em microtubos contendo sílica gel azul estéril.

A fermentação foi realizada em biorreator de bancada (New Brunswick Bioflo 310; 5 L volume de trabalho; impelidor tipo *pitched blade*), utilizando meio líquido YM (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de malte e 3 g/L de extrato de levedura), a 25 °C/100 rpm por 96 horas, tempo com melhor resultado de atividade antifúngica. A inoculação foi realizada com o fungo previamente ativado em placa de Petri contendo meio sólido YM (20 g/L de agar), como mostrado na Figura 4, na proporção de 1 cm² de cultura fúngica por 100 mL de meio YM, triturados com Ultra Turrax IKA T25. Todo material foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.



Figura 4 – Placa de Petri com o fungo Phaeosphaeriaceae GV-1 em meio sólido YM.

A recuperação e purificação do princípio ativo (cercosporamida) foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida em nosso laboratório, técnica que utiliza acetato de etila e soluções ácidas e básicas para sua recuperação e é um processo que se encontra em fase de depósito de patente. Para a extração, 200 mL de acetato de etila foram adicionados a 200 mL do meio fermentado filtrado em filtro de 0,22 μm (sem células). Após a homogeneização, a fase aquosa foi separada em funil de separação e a fase aceto etílica obtida foi adicionada de 40 mL de solução de NaOH 0,1 M. Após a homogeneização, foi realizada a separação das fases em funil de separação, e na fase aquosa obtida (NaOH + cercosporamida) foi adicionado 8 mL de solução de HCl 2 M. Após homogeneização, a mistura foi filtrada em filtro de 0,45 μm e seca em estufa a 50 °C *overnight*. Após a secagem, o pó obtido foi armazenado em microtubos a -18 °C. Resultados do nosso grupo apontam que este processo resulta em uma cercosporamida com uma pureza próxima a 94% (dados ainda não publicados). Para os ensaios, a cercosporamida foi solubilizada em solução de NaOH 0,1 M, o pH foi corrigido para 7 com solução de HCl 1 M, e o ajuste para a concentração desejada foi feito com água destilada estéril.

4.2. Avaliação da atividade antifúngica contra fungos de importância médica

A atividade antifúngica da cercosporamida foi avaliada contra 15 espécies de leveduras e fungos filamentosos patogênicos para humanos, sendo as cepas testadas descritas na Tabela 1. Os ensaios de sensibilidade antifúngica foram realizados no Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA), Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, na Universidade de São Paulo. As cepas foram gentilmente cedidas pela Prof. Kelly Ishida e fazem parte da coleção de cultura do LQA/USP.

Tabela 1 - Cepas patogênicas utilizadas na avaliação da atividade antifúngica da cercosporamida.

Espécie	Cepa
<i>Candida albicans</i>	SC5314
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 200956
<i>Candida auris</i>	CBS 10913
<i>Candida auris</i>	CBS 12766
<i>Candida duobushaemulonii</i>	CBS 7799
<i>Candida pseudohaemulonii</i>	CBS 10004
<i>Cryptococcus gatti</i>	56990
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H99
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 16913
<i>Aspergillus flavus</i>	998
<i>Fusarium solani</i>	CBS 224.34
<i>Cunninghamella</i> sp.	Caso clínico - 196
<i>Lomentospora prolificans</i>	Isolado clínico

Para armazenamento, todas as cepas são mantidas a -80 °C. Para os experimentos, antes de cada ensaio as leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose a 37 °C/150 rpm por 24 horas, e os fungos filamentosos em tubo inclinado com ágar batata dextrose (BDA) a 37 °C por 7 dias.

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados utilizando a técnica de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo M27-A3 para leveduras e M38 para fungos filamentosos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008, 2017). Esse ensaio consiste na avaliação da capacidade do composto em inibir o crescimento fúngico na presença de diferentes concentrações do composto em meio RPMI 1640. Em uma microplaca de 96 poços foram feitas dez diluições em série, de razão 2, para cada droga a ser testada (cercosporamida e padrões), sendo que o intervalo de concentrações testadas para cada composto se encontra na Tabela 2. O inóculo foi padronizado a 1×10^3 células/mL para leveduras e 1×10^4 células/mL para fungos filamentosos, utilizando câmara de Neubauer. Como controle positivo, foi feita a inoculação do fungo alvo em poço com ausência de droga, e para controle negativo foi utilizado poço somente com antifúngico e meio RPMI, sem microrganismo. Após a inoculação com os microrganismos alvos, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para leveduras e 48 horas para fungos filamentosos, e o crescimento foi avaliado visualmente e pela absorbância a 492 nm (Epoch 2, Biotek Instruments, USA). Como resultado, obtiveram-se os valores de concentração dos antifúngicos que inibiram em 50% o crescimento fúngico quando comparado ao controle positivo, exceto para Anfotericina B onde se utilizou 90% de inibição, como preconizado nos protocolos utilizados. Para validação do ensaio, foram utilizados como padrões os antifúngicos Anfotericina B, Voriconazol, Fluconazol e Caspofungina.

Tabela 2 – Intervalos de concentrações dos compostos testados no ensaio de microdiluição em caldo para fungos patogênicos.

Composto	Concentração (µg/mL)
Anfotericina B	16 a 0,03
Voriconazol	16 a 0,03
Fluconazol	64 a 0,13
Caspofungina	16 a 0,03
Cercosporamida	1000 a 1,95

Para avaliar a concentração fungicida mínima (CFM), alíquotas de 10 µL de cada poço do ensaio de CIM que não apresentarem crescimento visível foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA, ou seja, meio com ausência de compostos antifúngicos, e foram incubadas a 37 °C por 48 h. O CFM é definido como a mais baixa concentração que inibe completamente a formação de colônias. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas independentes.

4.3. Avaliação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos

A atividade antifúngica da cercosporamida também foi avaliada contra fungos fitopatogênicos, sendo as cepas testadas descritas na Tabela 3. Antes de cada ensaio, os fungos foram cultivados em placas de Petri, utilizando o meio BDA, a 25 °C por 7 dias. Foram realizadas análises de CIM e CFM, *in vitro*, seguindo a metodologia descrita no item 4.2 para fungos filamentosos, com algumas modificações. Foi utilizado o meio líquido YES (20 g/L de extrato de levedura, 150 g/L de sacarose, 0,5 g/L de sulfato de magnésio), temperatura de incubação em 25 °C, como padrão foi utilizado o antifúngico itraconazol (concentração de 32 a 0,6 µg/mL) e a concentração da cercosporamida testada foi de 2000 a 3,9 µg/mL. Como resultado, obtiveram-se os valores de concentração dos antifúngicos que inibiram em 100% o crescimento fúngico em comparação com o controle positivo.

Tabela 3 - Cepas fitopatogênicas utilizadas na avaliação da atividade antifúngica da cercosporamida.

Espécie	Cepa	Fonte
<i>Alternaria</i> sp.	CBMAI 0723	CBMAI
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 3941	Bioaromas
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Ca142a	Fundecitrus
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBMAI 0864	CBMAI
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCT7620	Bioaromas
<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	Centro de Citricultura Sylvio Moreira	LBQM
<i>Penicillium digitatum</i>	CECT20796	LBQM
<i>Penicillium italicum</i>	CECT20909	LBMQ

Para os fungos causadores de doenças no pós-colheita de citros que foram sensíveis à cercosporamida no ensaio de microdiluição em caldo (*P. digitatum* e *P. italicum*), foi realizado um ensaio *in vivo* utilizando laranjas infectadas. Para isso, foi utilizada a metodologia descrita por Feng et al. (2011), com algumas modificações. Laranjas peras maduras (*Citrus sinensis* cv. Pera) obtidas comercialmente foram lavadas, sanitizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, enxaguadas duas vezes com água destilada estéril e secas em temperatura ambiente. Utilizando um bisturi estéril, foi feito um corte de 2 mm de largura por 4 mm de comprimento e 2 mm de profundidade na casca de cada fruto, na região equatorial. Uma alíquota de 20 µL de solução aquosa de cercosporamida a uma concentração conhecida (CIM e 2xCIM) foi aplicada. Após 10 minutos, tempo suficiente para a absorção da solução de cercosporamida, uma alíquota de 15 µL de solução de esporos padronizada (1×10^6 esporos/mL) de cada fungo alvo (*P. digitatum* ou *P. italicum*) foi inoculada. Para o controle, os frutos foram tratados com água destilada estéril ao invés da solução de cercosporamida. Todos os frutos (tratados e controle) foram individualmente armazenados em béqueres estéreis e incubados a 25 °C por 7 dias. Durante esse período, foram determinados diariamente o número de frutos infectados e o diâmetro das lesões. Para cada tratamento foram utilizados 20 frutos.

Os dados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas aplicando o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software Action Stat (<http://www.portalaction.com.br/>).

4.4. Avaliação da atividade inseticida da cercosporamida em larvas de *T. molitor*

Uma colônia de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente conhecido como bicho-da-farinha ou tenébrio, foi estabelecida em laboratório (escotofase total e 26-32 °C) para fornecer, principalmente, larvas aos bioensaios com diferentes concentrações de cercosporamida obtida do sobrenadante da cultura de *Phaeosphaeriaceae* GV-1.

As concentrações de cercosporamida testadas foram: 0 (controle), 0,1, 1, 5 e 10 mg/mL, em solução aquosa, e também se testou o sobrenadante da fermentação puro, sem passar pelo processo de extração/purificação ou ser diluído. Foi realizado um teste preliminar para verificar se essas concentrações seriam adequadas, e assim optou-se por utilizar a maior concentração que por ora conseguimos obter com o composto, pois valores maiores que 10 mg/mL o composto precipita em solução aquosa. A diluição da cercosporamida foi feita com solução de NaOH e neutralizada com solução de HCl, até obter pH 7, e assim ajustado a concentração desejada com água destilada estéril.

Cada solução do composto foi testada em quatro repetições independentes, sendo cada repetição (arena) composta por 10 larvas variando entre 0,5 e 1 cm de comprimento. A arena foi composta por uma placa de Petri de plástico (90 x 15 mm) forrada na base com papel pardo e, sobre este, foi colocada a dieta à base de aveia (oriundo de produto comercial). Foram usados dois métodos de aplicação: a) aplicação tópica, por submersão das larvas nas soluções a serem testadas durante 30 segundos; b) aplicação via oral, a partir da mistura das diferentes concentrações de cercosporamida na dieta do inseto; sendo usado água destilada estéril para o controle em ambos os métodos. As placas foram mantidas a 28 °C e com escotofase total. Os

ensaios foram repetidos duas vezes em diferentes ocasiões. Todos os ensaios seguiram um delineamento inteiramente casualizado.

Com base nestes ensaios, tanto via oral (ingestão) como contato tópico (imersão das larvas nas soluções do composto), a mortalidade das larvas de *T. molitor* foi avaliada diariamente por 15 dias após incubação. Foi observado também, mesmo após os 15 dias, a formação de pupas, para avaliar se houve algum efeito subletal que modificasse a viabilidade larval e interrompesse o ciclo de vida do inseto. Desta forma, calculou-se a concentração letal mediana (CL_{50}) e 90% (CL_{90}), bem como os tempos letais medianos (TL_{50}) e 90% (TL_{90}), sendo ambos parâmetros necessários para inferir sobre a toxicidade aguda oral e tópica deste composto antifúngico às larvas de *T. molitor*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e recuperação de cercosporamida

Para a produção da cercosporamida, a fermentação e extração foram realizadas em quatro bateladas, com volume de trabalho de 5 litros de meio de cultura por batelada. Foram obtidos ao final 1,54 g de cercosporamida para utilização nos ensaios, com um rendimento global médio de 77 mg de cercosporamida por litro de cultura.

5.2. Atividade antifúngica contra fungos patogênicos

5.2.1. Leveduras

Os resultados para a avaliação da susceptibilidade de diferentes leveduras patogênicas à cercosporamida estão mostrados nas Tabelas Tabela 4 e Tabela 5, sendo que os resultados para a análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para leveduras estão resumidos na Tabela 4, e na Tabela 5 tem-se os resultados de Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as leveduras testadas.

Podemos observar que apenas as leveduras *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* não tiveram seu crescimento inibido pela cercosporamida, dentro da faixa de concentração testada. Todas as outras leveduras foram sensíveis ao composto, com CIM₅₀ variando entre 500 e 15,6 µg/mL, sendo a levedura *C. tropicalis* a mais sensível dentre as cepas estudadas. Vale ressaltar que esta cepa foi uma das mais resistentes frente aos antifúngicos comerciais, pois não foi inibida por voriconazol nem por fluconazol nas concentrações testadas. A cercosporamida apresentou efeito fungicida contra as cepas de *C. auris* CBS 12766, *C. parapsilosis*, *C. duobushaemulonii*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans*, com concentrações de 1000 a 15,6 µg/mL (Tabela 5). Em outros estudos com cercosporamida, obtiveram-se resultados diferentes, sendo esse composto capaz de inibir o crescimento de cepas de

C. albicans, com CIM de 10 e 81 µg/mL, e *C. krusei*, com CIM 45 µg/mL (CONOVER et al., 1992; SUSSMAN et al., 2004).

Tabela 4 - Suscetibilidade de diferentes leveduras patogênicas a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão expressos em µg/mL.

Cepas	CIM ₉₀		CIM ₅₀		
	AMB	VCZ	FCZ	CPG	CCP
<i>Candida albicans</i>	<0,03	<0,03	<0,12	0,06	>1000
<i>Candida glabrata</i>	<0,03	0,50	4	0,12	>1000
<i>Candida krusei</i>	0,12	0,5	32	0,25	>1000
<i>Candida auris</i> CBS 12766	0,25	0,50	>64	0,25	500
<i>Candida parapsilosis</i>	<0,03	0,06	1	0,50	250
<i>Candida auris</i> CBS 10913	0,06	<0,03	2	<0,03	125
<i>Candida pseudohaemulonii</i>	2	0,12	4	0,12	125
<i>Candida duobushaemulonii</i>	0,50	2	8	0,06	62,5
<i>Candida tropicalis</i>	0,50	>16	>64	0,12	15,6
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<0,03	0,06	2	>16	62,5
<i>Cryptococcus gatti</i>	<0,03	0,12	2	8	125

Tabela 5 - Susceptibilidade de diferentes leveduras patogênicas ao fluconazol (FCZ) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.

Cepas	CFM	
	FCZ	CCP
<i>Candida albicans</i>	>64	>1000
<i>Candida glabrata</i>	32	>1000
<i>Candida krusei</i>	32	>1000
<i>Candida auris</i> CBS 12766	>64	1000
<i>Candida parapsilosis</i>	2	500
<i>Candida auris</i> CBS 10913	>64	>1000
<i>Candida pseudohaemulonii</i>	>64	>1000
<i>Candida duobushaemulonii</i>	>64	500
<i>Candida tropicalis</i>	>64	15,6
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	500
<i>Cryptococcus gatti</i>	8	125

As cepas de *C. auris* testadas apresentaram uma sensibilidade intermediária à cercosporamida. A cepa de *C. auris* CBS 12766 teve a inibição de seu crescimento pela cercosporamida com uma CIM₅₀ de 500 µg/mL e CFM de 1000 µg/mL e essa cepa se mostrou resistente ao fluconazol dentro da concentração testada. Já a cepa *C. auris* CBS 10913 se mostrou sensível a todos os compostos usados, sendo inibida pela cercosporamida a 125 µg/mL, porém sem efeito fungicida. A *C. auris* é um patógeno emergente que surgiu na última década em diferentes partes do mundo ao mesmo tempo. Muitos dos isolados clínicos de *C. auris* são cepas multirresistentes, havendo relatos de algumas serem resistentes às três principais classes de antifúngicos utilizadas: equinocandinas, azóis e polienos. Seu tratamento efetivo ainda é um desafio, pois ela é capaz de persistir e sobreviver em superfícies por um longo tempo e sua patogenicidade é mantida mesmo em altas temperaturas, se mostrando assim de grande interesse a descoberta de novos compostos eficazes contra a *C. auris* (ELBARADEI, 2020). Novos compostos sintéticos têm se mostrado efetivos contra *C.*

auris, como o MYC-03 que apresentou uma CIM de 4 µg/mL contra cepas de *C. auris* (TETZ et al., 2019), e APX001A, um pró-fármaco de fostato solúvel em água, que se mostrou altamente efetivo contra cepas de *C. auris*, com uma CIM₅₀ de 0,004 µg/mL (HAGER et al., 2018). Compostos naturais também podem ser promissores na busca por novos antifúngicos. A crotamina, um polipeptídeo nativo isolado do veneno da cascavel Sul-Americana *Crotalus durissus terrificus*, apresentou atividade antifúngica contra *C. auris*, chegando a inibição de 50% de crescimento da levedura com concentrações de 400 a 800 µg/mL de crotamina (COLOMBO et al., 2019).

A cepa de *C. parapsilosis* teve seu crescimento inibido pela cercosporamida, com CIM₅₀ de 250 µg/mL e CFM de 500 µg/mL. Esta é uma espécie de *Candida* do grupo não-*albicans*, causadora de candidíase invasiva, sendo uma das mais incidentes deste grupo, a depender da região geográfica (XIAO et al., 2015). Um único estudo que avaliou a atividade antifúngica de cercosporamida contra *C. parapsilosis* encontrou valor de MIC de 64 µg/mL (CONOVER et al., 1992). Diversos outros compostos foram testados contra essa levedura. Derivativos sintéticos de arilquinuclidinas, que são inibidores de esqualeno sintase, enzima envolvida na biossíntese de esterol, mostraram atividade antifúngica contra *C. parapsilosis*, sendo o composto testado que foi mais eficaz apresentou CIM₅₀ de 2 µg/mL, mas sem apresentar efeito fungicida (ISHIDA et al., 2011). Em outro estudo, Licosina-I, um peptídeo antimicrobiano isolado do veneno da aranha *Lycosa singoriensis*, apresentou atividade antifúngica contra diversos isolados clínicos de espécies de *Candida*, sendo que contra *C. parapsilosis* a CIM₅₀ foi de 128 e 256 µg/mL para cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente (TAN et al., 2018). A quitosana extraída do caranguejo chileno de água doce *Aegla cholchol* apresentou atividade antifúngica contra 4 espécies de *Candidas*, dentre elas a *C. parapsilosis*, com valores de CIM entre 2,4 e 625 µg/mL (BERNABÉ et al., 2020).

Foram testadas duas cepas do complexo *C. haemulonii*, sendo uma cepa de *C. pseudohaemulonii*, que teve seu crescimento inibido pela cercosporamida com uma CIM₅₀ de 125 µg/mL, mas sem efeito fungicida, e uma cepa de *C. duobushaemulonii*, que também teve seu crescimento inibido pelo composto em teste, com CIM₅₀ de 62,5 µg/mL e CFM de 500 µg/mL. As leveduras do complexo *C. haemulonii* são

principalmente conhecidas por causar infecções em feridas, mas também alguns casos de infecções invasivas no sistema sanguíneo são descritos. Essas espécies pertencem à família Metschnikowiaceae, que inclui espécies que costumam ser resistentes a medicamentos antifúngicos, e mesmo ainda não sendo uma frequente causa de candidemia, similaridades genéticas com a *C. auris* levantam a possibilidade de que espécies desse grupo também possam começar a emergir como patógenos resistentes a drogas em populações humanas (GADE et al., 2020). Na Coreia, cepas de *C. pseudohaemulonii* isoladas de pacientes apresentaram CIM de 32 µg/mL para anfotericina B, sendo considerada uma resistência de alto nível para essa droga (KIM et al., 2009). Isolados clínicos de *C. duobushaemulonii* na Argentina apresentaram CIM de 8, 128, 6,34, 5,03 µg/mL para anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina, respectivamente (ISLA et al., 2017).

A levedura que se apresentou mais sensível à cercosporamida foi a *C. tropicalis*, sendo inibida à concentração de 15,6 µg/mL, esta mesma concentração apresentando efeito fungicida. A cepa de *C. tropicalis* utilizada se mostrou resistente ao Voriconazol e Fluconazol, dentro das concentrações testadas. A *C. tropicalis* é a segunda espécie patogênica de *Candida* mais prevalente, ficando atrás apenas da *C. albicans* e sendo a mais prevalente no grupo de espécies de *Candida* não-*albicans*. O número de infecções por *C. tropicalis* tem aumentado dramaticamente no mundo todo, caracterizando-se como uma levedura patogênica emergente, sendo que dados clínicos e experimentais sugerem que as taxas de morbidade e mortalidade são maiores nas infecções por *C. tropicalis* do que por *C. albicans*, e cada vez mais tem sido relatado o aumento no número de casos de isolados clínicos de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol (KOTHAVADE et al., 2010). Assim, é de muito interesse a pesquisa por novos compostos antifúngicos capazes de inibir e principalmente cessar o crescimento da *C. tropicalis*, tais como a cercosporamida.

Podemos encontrar na literatura diversos estudos em busca de novos compostos que apresentem atividade antifúngica contra *C. tropicalis*, e apenas um único estudo que avaliou a atividade antifúngica de cercosporamida contra *C. tropicalis*, encontrando o valor de CIM de 128 µg/mL (CONOVER et al., 1992). Derivativos sintéticos de arilquinuclidinas, também apresentaram atividade antifúngica contra *C.*

tropicalis, sendo o composto testado que foi mais eficaz apresentou CIM₅₀ de 2 µg/mL, mas sem apresentar efeito fungicida (ISHIDA et al., 2011). Em outro estudo, Licosina-I, um peptídeo antimicrobiano isolado do veneno da aranha *Lycosa singoriensis*, apresentou atividade antifúngica contra diversos isolados clínicos de espécies de *Candida*, sendo mais eficaz contra os isolados *C. tropicalis*, com CIM₅₀ de 8 µg/mL (TAN et al., 2018). Óleos essenciais também podem ser uma potencial fonte na busca por compostos antimicrobianos. Souza e colaboradores (2016) testaram óleos essenciais provenientes de 15 espécies de plantas, sendo que o melhor resultado foi com o óleo essencial de *Pelargonium graveolens*, apresentando atividade antifúngica contra diversos isolados clínicos odontológicos de *C. tropicalis*, com uma CIM₅₀ de 125 µg/mL, sendo a menor CIM₅₀ obtida dentre os óleos essenciais testados. Podemos considerar que a cercosporamida se mostra com grande potencial para uso como agente antifúngico, a CIM encontrada pode ser considerada como forte atividade para compostos de origem natural, e também é de grande valia sua ação fungicida a essa mesma concentração.

A cepa de *Cryptococcus neoformans* testada teve seu crescimento inibido pela cercosporamida com uma CIM₅₀ de 62,5 µg/mL e CFM de 500 µg/mL. O *C. neoformans* é uma levedura oportunista, agente causador da criptococose, uma infecção sistêmica que se manifesta clinicamente como meningoencefalite, de subaguda a crônica, em pacientes imunocomprometidos. Normalmente é tratada com anfotericina B e flucitosina, porém a alta incidência da doença, a resistência antifúngica e os efeitos colaterais causados pelas drogas utilizadas têm incentivado a busca por alternativas a esse tratamento. Timol, um terpeno presente no óleo essencial de *Thymus vulgaris*, apresentou CIM de 20 a 51 µg/mL contra diferentes cepas de *C. neoformans*, com CFM na faixa de 40 a 102 µg/mL (TEIXEIRA et al., 2018). Dois novos derivados de tetraidrofurano, isolados dos metabólitos da cepa *Aspergillus* sp. LS78, obtido do tecido da esponja *Haliclona* sp., apresentaram atividade antifúngica contra *C. neoformans*, com CIM de 50 e 128 µg/mL (LIU et al., 2020).

A cepa de *Cryptococcus gattii* teve seu crescimento inibido pela cercosporamida, com CIM₅₀ de 125 µg/mL, com efeito fungicida nessa mesma concentração. *C. gattii* pode causar infecções em pacientes imunocomprometidos e

imunocompetentes, podendo deixar sequelas neurológicas severas (HAIDAR; SINGH, 2015). O óleo essencial extraído das folhas de *Lippia sidoides*, planta utilizada na medicina popular brasileira como antisséptico, foi testado contra *C. gatti*. A fração solúvel em hexano foi a que apresentou melhor efeito antifúngico contra *C. gattii*, com CIM de 62,5 µg/mL (MORAIS et al., 2016). Outra planta que também é utilizada na medicina popular brasileira, a *Eugenia calycina*, teve os extratos e frações das folhas e cascas testados contra diversas bactérias e fungos, entre eles o *C. gatti*. A fração das folhas solúvel em hexano foi a que apresentou melhor resultado contra *C. gattii*, com CIM de 31,2 µg/mL, sendo que o extrato etanólico das cascas e folhas tiveram CIM de 250 e 2000 µg/mL, respectivamente (FERREIRA et al., 2014).

5.2.2. Fungos filamentosos

Os resultados para a análise de CIM para fungos filamentosos patogênicos estão resumidos na Tabela 6, enquanto que na Tabela 7 tem-se os resultados de CFM. Os fungos filamentosos apresentaram uma sensibilidade intermediária à cercosporamida, variando entre 500 e 62,5 µg/mL, todos eles se mostraram resistentes ao fluconazol, e apenas o *L. prolificans* não apresentou resistência à caspofungina nas concentrações testadas (Tabela 6). A cepa *Cunninghamella* sp. foi a mais sensível à cercosporamida. A cercosporamida teve efeito fungicida sobre todos os fungos filamentosos testados, exceto para o *F. solani* (Tabela 7). Vale ressaltar que contra *L. prolificans* a cercosporamida foi o único composto que apresentou efeito fungicida, dentro das concentrações testadas.

Tabela 6 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos patogênicos a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão expressos em µg/mL

Cepas	CIM ₉₀		CIM ₅₀		
	AMB	VCZ	FCZ	CPG	CCP
<i>Aspergillus flavus</i>	0,12	0,06	>64	>16	500
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,12	0,50	>64	>16	500
<i>Fusarium solani</i>	0,50	>16	>64	>16	250
<i>Lomentospora prolificans</i>	4	1	>64	8	250
<i>Cunninghamella</i> sp.	0,5	1	>64	>16	62,5

Tabela 7 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos patogênicos a anfotericina B (AMB), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), caspofungina (CPG) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL

Cepas	CFM				
	AMB	VCZ	FCZ	CPG	CCP
<i>Aspergillus flavus</i>	1	>16	>64	>16	500
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	4	>64	>16	1000
<i>Fusarium solani</i>	0,50	>16	>64	>16	>1000
<i>Lomentospora prolificans</i>	>16	>16	>64	>16	250
<i>Cunninghamella</i> sp.	4	>16	>64	>16	500

A cercosporamida inibiu o crescimento das duas cepas de *Aspergillus* testadas, com CIM₅₀ de 500 µg/mL. A CFM foi de 500 µg/mL para o *A. flavus* e 1000 µg/mL para o *A. fumigatus*. A aspergilose inclui uma grande variedade de doenças causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, afetando principalmente o trato respiratório de pessoas imunocomprometidas. As espécies mais comuns que causam aspergiloses são o *A. fumigatus*, seguido pelo *A. flavus* (DENARDI et al., 2018). Um único estudo

que avaliou a atividade antifúngica de cercosporamida contra *Aspergillus* sp. encontrou valor de CIM de 32 µg/mL (CONOVER et al., 1992), mas diferentes compostos já foram estudados em busca de atividade antifúngica contra *Aspergillus* sp. Diversos óleos essenciais foram testados contra isolados clínicos de fungos filamentosos de pacientes com onicomicose. Para o *A. flavus*, a CIM dos óleos essenciais variou entre 40 e 255 µg/mL, sendo que os óleos essenciais mais eficientes foram os de *Zataria multiflora* e *Artemisia sieberi* (CIM de 40 µg/mL). Para o *A. fumigatus*, o óleo essencial com maior atividade antifúngica foi o de *Artemisia sieberi*, com CIM de 20 µg/mL, sendo que as CIM obtidas variaram de 20 a 310 µg/mL (KHOSRAVI; SHOKRI; SAFFARIAN, 2020). Nanolipossomos contendo extrato de gengibre apresentaram efeito antifúngico contra *A. flavus*, com MIC de 38 µg/mL e MFC de 100 µg/mL (MOHAMMADI et al., 2020).

A cepa de *Fusarium solani* testada foi inibida com CIM₅₀ de 250 µg/mL de cercosporamida, sendo a única que não sofreu efeito fungicida. Podemos observar também que o *F. solani* se mostrou resistente ao fluconazol, voriconazol e caspofungina, dentro das concentrações testadas. Os fungos que pertencem ao complexo de espécies *F. solani* são os mais frequentemente isolados em casos de fusariose, e esses apresentam elevadas CIM para os principais antifúngicos utilizados na medicina (D'AGOSTINO et al., 2018). Assim a busca de novos compostos com atividade contra *F. solani* se mostra extremamente importante. Alguns compostos que apresentaram atividade contra esse fungo foram o óleo essencial de *Artemisia sieberi*, com CIM de 20 µg/mL (KHOSRAVI; SHOKRI; SAFFARIAN, 2020), e o antibiótico polimixina B, que apresentou efeito antifúngico contra dois isolados clínicos de *F. solani*, com CIM de 32 e 64 µg/mL e CFM de 32 e 128 µg/mL (HSU et al., 2017).

A cepa de *L. proliferans* se mostrou sensível à cercosporamida, com CIM₅₀ e CFM de 250 µg/mL. Vale ressaltar que a cercosporamida foi o único composto que apresentou efeito fungicida, todas as outras drogas testadas não apresentaram efeito fungicida contra *L. proliferans*, somente fungistático, e o Fluconazol não apresentou nem mesmo efeito fungistático. O *L. proliferans* é comumente encontrado no solo e em águas poluídas, sendo cada vez mais reconhecido como agente causal de infecções fúngicas invasivas graves, principalmente em pacientes de transplante de células troncos e órgãos, com taxa de mortalidade chegando a 90%. O tratamento dessas

infecções é desafiador, uma vez que os isolados de *L. prolificans* são frequentemente resistentes às drogas, com CIM elevadas para todos os agentes antifúngicos disponíveis. O tratamento com combinações de drogas disponíveis é uma opção (voriconazol e terbinafina) (JENKS et al., 2020), e também há a busca por novos compostos, como o F901318, um inibidor de diidroorotato desidrogenase com potencial antifúngico, que apresentou atividade antifúngica contra isolados de *L. prolificans*, com CIM de 0,12 a 0,25 µg/mL (WIEDERHOLD; LAW; BIRCH, 2017).

O fungo filamentosso que se apresentou mais sensível à cercosporamida foi o *Cunninghamella* sp., sendo inibido à concentração de 62,5 µg/mL, com efeito fungicida à 500 µg/mL. As espécies de *Cunninghamella* incluem fungos filamentosos ubíquos, e, apesar de serem menos frequentes, as infecções causadas por espécies de *Cunninghamella* tem altas taxas de mortalidade (UNO et al., 2019). Nos poucos casos reportados na literatura, frequentemente o tratamento é realizado com combinações de drogas, como anfotericina B, caspofungina e isavuconazol (POMORSKA et al., 2019), ou drogas sozinhas, como a anfotericina B, que comprometeu a função renal do paciente (JAYASURIYA et al., 2006).

As concentrações de cercosporamida que foram testadas ainda são maiores que as concentrações das drogas utilizadas como padrão, que são compostos que já são utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas. Porém, podemos perceber que os resultados para a cercosporamida foram próximos aos obtidos com compostos de origem natural. Assim, o composto em questão se mostra muito promissor, por ter atividade contra fungos com um grande histórico de cepas resistentes, e também por apresentar efeito fungicida contra diversas cepas. Ainda não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais, mas alguns autores consideram que uma CIM de até 500 µg/mL como uma forte inibição, valores que foram utilizados como referência em estudos de óleos essenciais e extratos de plantas (DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2016).

5.3. Atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos

5.3.1. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Os resultados obtidos nas análises de CIM e CFM contra fungos fitopatogênicos estão resumidos na Tabela 8. A cepa testada do fungo *G. citri-aurantii* não teve seu crescimento inibido pela cercosporamida e nem pelo itraconazol, sendo o único resistente à cercosporamida. Com exceção do *F. oxysporum*, a cercosporamida teve efeito fungicida sobre todos os fungos testados.

Tabela 8 - Susceptibilidade de diferentes fungos filamentosos fitopatogênicos a itraconazol (ITZ) e cercosporamida (CCP). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.

Cepas	CIM (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
	ITZ	CCP	ITZ	CCP
<i>Alternaria</i> sp.	2	250	4	500
<i>Aspergillus niger</i>	2	500	16	500
<i>Colletotrichum acutatum</i>	8	1000	16	1000
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	>32	1000	>32	1000
<i>Fusarium oxysporum</i>	>32	500	>32	>2000
<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	>32	>2000	>32	>2000
<i>Penicillium digitatum</i>	0,5	500	4	500
<i>Penicillium italicum</i>	>32	1000	>32	2000

O fungo que se mostrou mais sensível à cercosporamida foi o *Alternaria* sp., com CIM de 250 µg/mL e CFM de 500 µg/mL. O gênero *Alternaria* é um patógeno de plantas com importância econômica para a agricultura. As lignanas presente no extrato da folha de *Magnolia liliflora* apresentaram efeito antifúngico contra cepas fitopatogênicas, dentre elas *A. alternata*, com CIM de entre 32 e 128 µg/mL (WU et al., 2018). Em outro estudo, um dos extratos orgânicos produzidos por fungos isolados na Península de Iucatã apresentaram atividade antifúngica contra *A. chrysanthemi* com

CIM de 500 µg/mL (PÉREZ et al., 2016). Assim, o resultado que obtivemos com CIM para *Alternaria* sp. fica dentro do obtido por outros compostos de origem natural e produzidos por fungos, testados contra cepas de *Alternaria*.

Contra o *A. niger*, obteve-se uma CIM de 500 µg/mL para a cercosporamida, com ação fungicida na mesma concentração. O *A. niger* é comumente encontrado em plantações de alimentos, sendo uma espécie capaz de produzir as micotoxinas fumonisina e ocratoxina, e é também a causa do bolor preto em cebolas, sendo uma das mais relevantes doenças no pós-colheita desse vegetal (SUSCA et al., 2016). O óleo essencial extraído de *Lallemantia royleana* Benth. apresentou atividade antifúngica contra *A. niger*, com CIM 2,5 µg/mL (SHARIFI-RAD et al., 2015). O óleo essencial de *Pulicaria vulgaris* apresentou um CIM de 15,5 µg/mL contra *A. niger* (SHARIFI-RAD et al., 2014).

As duas cepas de *Colletotrichum* testadas foram inibidas pela cercosporamida com CIM de 1000 µg/mL, com efeito fungicida na mesma concentração. O *Colletotrichum* é um importante fungo fitopatogênico, sendo praga de diversas culturas, causando antracnose e podridões pós-colheita (DEAN et al., 2012). Metabolitos antagonistas de um fungo marinho, *Trichoderma longibrachiatum*, apresentaram efeito antifúngico contra duas cepas de *Colletotrichum*, *C. lagrnarium* e *C. fragariae*, com CIM variando entre 8 e 128 µg/mL (DU et al., 2020).

A cepa de *F. oxysporum* testada teve uma CIM de 500 µg/mL para a cercosporamida, sem efeito fungicida. Essa espécie pode infectar mais de 100 hospedeiros diferentes, provocando severas perdas agrícolas (DEAN et al., 2012). Cercosporamida, produzida pelo fungo *Cadophora orchidicola*, apresentou redução de 50% do crescimento radial em placas de petri a 0,93 µg/mL contra *F. oxysporum* (WANG et al., 2019). Metabolitos do fungo marinho *Trichoderma longibrachiatum* também apresentaram efeito antifúngico contra duas cepas de *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, com CIM entre 32 e 256 µg/mL (DU et al., 2020). O extrato bruto de *Streptomyces* sp. cepa FJAT-31547 apresentou atividade antifúngica contra *F. oxysporum*, com CIM de 6,25 µg/mL (ZHENG et al., 2019).

As duas cepas testadas de *Penicillium* se mostraram sensíveis à cercosporamida, sendo que essas duas espécies são os principais causadores de perdas no pós-colheita de citros (BAZIOLI et al., 2019). A cepa de *P. digitatum* testada foi inibida com CIM de 500 µg/mL, com efeito fungicida nessa mesma concentração, e a cepa de *P. italicum* foi inibida com CIM de 1000 µg/mL e CFM de 2000 µg/mL. Comparando com outros estudos, um composto obtido do fruto de *Ficus hirta* Vahl. apresentou atividade antifúngica contra o crescimento micelial de *P. italicum*, apresentando CIM de 200 µg/mL e CFM de 800 µg/mL (CHEN et al., 2020a). Em outro estudo, *P. digitatum* foi inibido com extratos de folha e caule de *Buddleja salviifolia*, com CIM entre 31,25 a 500 µg/mL (PILLAI; MATAMANE; MEKBIB, 2019). A cercosporamida produzida pelo fungo *Cadophora orchidicola* foi capaz de reduzir 50% do crescimento radial de *P. digitatum* a uma concentração de 6,7 µg/mL (WANG et al., 2019).

5.3.2. Inibição do crescimento fúngico em laranjas

Como as cepas de *P. italicum* e *P. digitatum* se mostraram sensíveis à cercosporamida, foi realizado um ensaio para avaliar a inibição do crescimento destes dois fungos em laranjas, fruta esta comumente atacada por estas duas espécies durante o pós-colheita.

Os testes foram realizados com duas concentrações, a CIM e duas vezes a CIM, sendo assim 1000 e 2000 µg/mL para *P. italicum*, e 500 e 1000 µg/mL para *P. digitatum*. Os frutos foram incubados por 7 dias a 25 °C, e o acompanhamento da evolução da doença foi feita durante esse período, sendo registrado o número de frutos em que a doença se desenvolveu e o diâmetro da lesão existente.

A Figura 5 mostra evolução do crescimento fúngico em laranjas infectadas com o *P. italicum*, incluindo o tratamento controle e as duas concentrações de cercosporamida testadas. No gráfico com os diâmetros das lesões (Figura 5A), os dois primeiros dias foram omitidos, pois até o segundo dia somente duas laranjas do grupo controle haviam apresentado desenvolvimento da doença. Ao final dos 7 dias, todos os frutos de todos tratamentos tinham desenvolvido a doença, em diferentes níveis, o que foi observado pelo registro do diâmetro das lesões (Figura 5B). Podemos observar que

para o *P. italicum*, os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, ou seja, nas laranjas tratadas com cercosporamida houve um menor desenvolvimento da doença, descrito pelos menores valores de diâmetro das lesões nas frutas. Assim, ao final do tempo de tratamento proposto nesse ensaio, as laranjas tratadas apresentaram menores diâmetros de lesões que o grupo controle, não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos com cercosporamida (1000 e 2000 µg/mL) (Figura 5A).

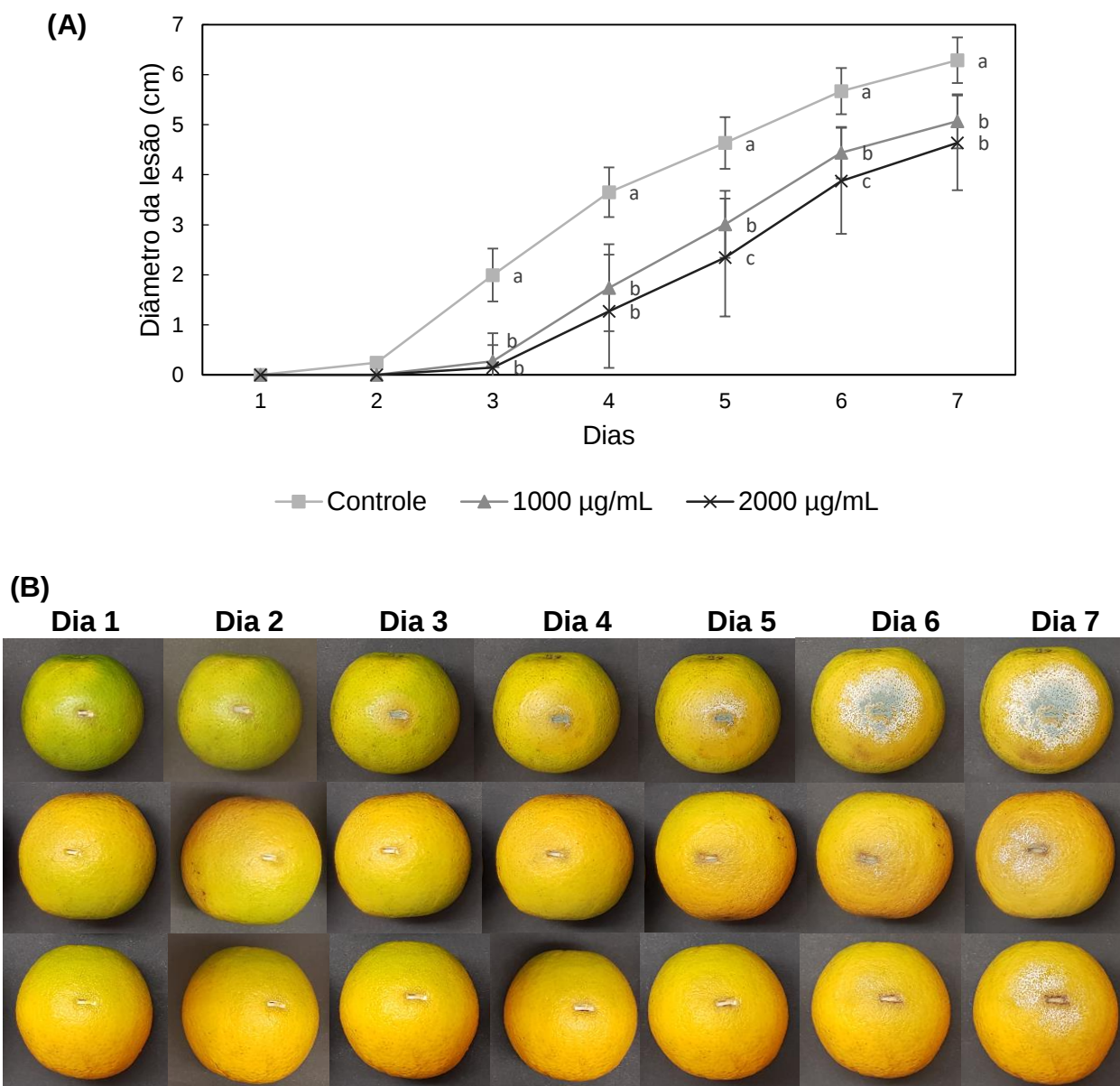


Figura 5 – Tratamento *in vivo* contra *P. italicum* em laranjas tratadas com cercosporamida. (A) Dados do diâmetro da lesão em laranjas infectadas com o fungo *P. italicum*. Letras iguais no gráfico, no mesmo dia de tratamento, indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (B) Imagens de laranjas utilizadas no ensaio, com 1 a 7 dias de incubação. Tratamentos controle, 1000 µg/mL e 2000 µg/mL (de cima para baixo).

A Figura 6 mostra evolução do crescimento fúngico em laranjas infectadas com o *P. digitatum*, incluindo o tratamento controle e as duas concentrações de cercosporamida testadas. No gráfico (Figura 6A), os diâmetros das lesões para os dois primeiros dias também foi omitido, pois somente duas laranjas do grupo controle haviam apresentado desenvolvimento da doença neste período. Após 7 dias, todos os frutos controle haviam desenvolvido a doença, e 19 dos 20 frutos de cada tratamento também haviam desenvolvido a doença (Figura 6B). Ao final dos 7 dias de tratamento, não houve diferença significativa no diâmetro das lesões dos frutos entre os tratamentos e controle, mas podemos observar que houve diferença nos dias de 3 a 5, ocorrendo assim um retardamento no desenvolvimento da doença (Figura 6A).

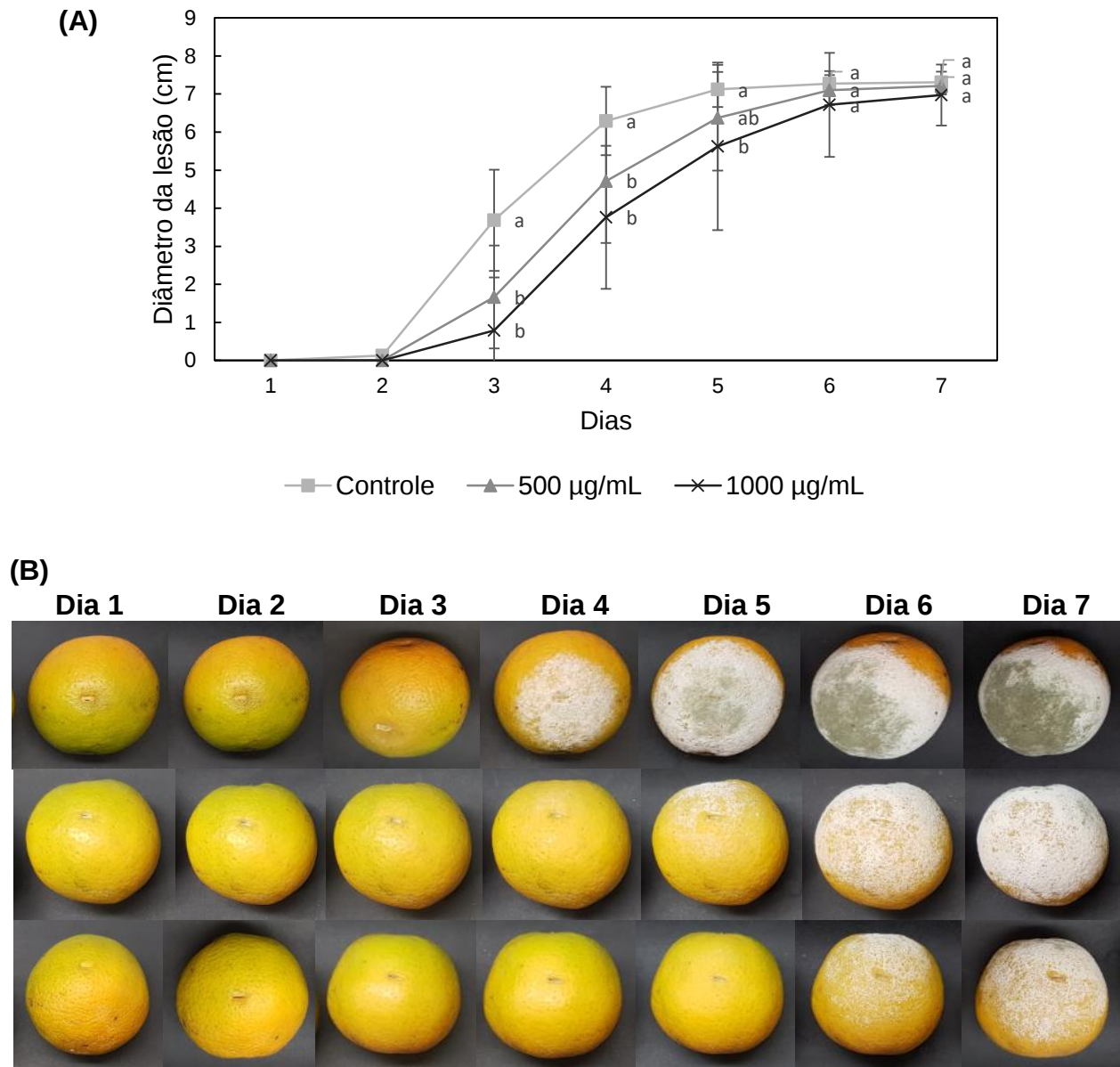


Figura 6 - Tratamento *in vivo* contra *P. digitatum* em laranjas tratadas com cercosporamida. (A) Dados do diâmetro da lesão em laranjas infectadas com o fungo *P. digitatum*. Letras iguais no gráfico, no mesmo dia de tratamento, indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (B) Imagens de laranjas utilizadas no ensaio, com 1 a 7 dias de incubação. Tratamentos controle, 500 µg/mL e 1000 µg/mL (de cima para baixo).

Podemos observar que a cercosporamida se mostrou mais eficiente na inibição de *P. italicum* em laranjas infectadas do que na inibição de *P. digitatum*,

resultado inverso ao obtido no ensaio *in vitro*, onde o *P. digitatum* foi inibido a uma concentração menor quando comprado ao *P. italicum*. Uma possível explicação para esse resultado seria que o limoneno, a baixas concentração, estimula a germinação de esporos de *P. digitatum*, favorecendo assim o desenvolvimento do bolor verdes nas laranjas (TAO et al., 2019). Vale ressaltar que a cercosporamida foi capaz de retardar o desenvolvimento do bolor azul e do bolor verde em laranjas.

Em comparação com estudos semelhantes, HAO e colaboradores (2010) avaliaram a saponina do chá, um surfactante natural presente em diversas plantas, no controle dos bolores verde e azul em tangerinas Shatang. A saponina do chá sozinha foi capaz de reduzir a severidade da doença em relação ao controle, apresentando efeito sinérgico e melhora dos resultados quando usado com prochloraz e imazalil, todos com concentração de 200 µg/mL. Em outro estudo, o PAF56, um peptídeo antimicrobiano catiônico, foi capaz de inibir a progressão dos bolores verde e azul em laranjas, com concentração de 64 µM (WANG et al., 2018). Nestes estudos, ocorreu redução na incidência da doença (número de fruto infectados), e também, nos frutos que a doença se desenvolveu e não ocorreu uma completa inibição dos microrganismos, ocorreu a diminuição no desenvolvimento da doença, observado pela redução significativa dos diâmetros das lesões.

Outros estudos também analisaram o efeito antifúngico de compostos em frutos cítricos inoculados, mas com metodologias diferentes. O polihexametileno guanidina, um membro da família da guanidina polimérica, apresentou efeito antifúngico no tratamento curativo de limões inoculados com *P. digitatum* (inoculação com *P. digitatum*, incubação por 24h, tratamento), causando redução na incidência da doença, mas não apresentou efeito no tratamento preventivo (tratamento, incubação por 24h, inoculação com *P. digitatum*) (OLMEDO et al., 2018). Os óleos essenciais carvacrol e timol foram testados contra *P. digitatum*, onde limões foram mergulhados em soluções de cera contendo os óleos essenciais, e então inoculados com o fungo alvo. Os óleos essenciais mostraram redução significativa na porcentagem de superfície do fruto infectada, sendo que a 250 µL/L de timol e 500 µL/L de carvacrol não foi observada incidência de micélio fúngico na superfície do limão (PÉREZ-ALFONSO et al., 2012). Podemos observar outras possibilidades de aplicação a serem testadas, buscando uma

maior efetividade dos tratamentos, como a utilização de solução de cera, uma vez que as superfícies de citros tendem a ser oleosas, e também estudar o efeito de um tratamento curativo nos frutos.

5.4. Atividade inseticida contra larvas de *T. molitor*

A criação de *T. molitor* estabelecida no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos foi suficiente para fornecer larvas para os ensaios a serem realizados. Na Figura 7 são mostrados dois exemplos de arena que foram montados para realização do experimento, conforme foi descrito no item 4.4. A Tabela 9 mostra resumidamente os resultados obtidos nas duas repetições do ensaio com *T. molitor*, onde foram testados o sobrenadante da fermentação puro e quatro concentrações de cercosporamida. Podemos observar que poucas larvas morreram durante o ensaio (total de 40 larvas por tratamento/repetição) e de maneira aleatória, e assim essas mortes não podem ser atribuídas aos tratamentos realizados. Assim sendo, a cercosporamida não apresentou atividade inseticida contra as larvas de *T. molitor* dentro das concentrações testadas, independentemente do tipo de tratamento (tópico ou oral).

Após os 15 dias de ensaio, as larvas continuaram a ser observadas e elas continuaram seu ciclo de vida, ou seja, tanto as larvas do controle como as tratadas com cercosporamida aumentaram de tamanho e passaram de larvas para pupa e besouro.



Figura 7 – Exemplos de arenas montadas para ensaio com *T. molitor*. À esquerda arena com tratamento tópico e à direita arena com tratamento via alimentação.

Diversos compostos de origem natural têm apresentado atividade inseticida contra *T. molitor*, pavimentando assim a busca por alternativas aos inseticidas convencionais. Assim, podemos citar alguns estudos que avaliaram o efeito inseticida de óleos essenciais e de compostos produzidos por fungos. O óleo essencial de *Cedrus deodara*, comumente utilizado como repelente, teve seu efeito inseticida testado contra larvas de *T. molitor*, via alimentação. Esse óleo essencial se mostrou eficaz, chegando a uma mortalidade de 87% na concentração de 12% de óleo essencial (BUNERI et al., 2019). Os óleos essenciais de cravo e canela também foram estudados contra larvas de *T. molitor*, via tratamento tópico. Ambos os óleos essenciais se mostraram tóxicos para esse inseto, com uma LC_{50} (concentração letal que causa 50% de mortalidade) de 30,4 μg e 35,1 μg para o óleo essencial de canela e cravo, respectivamente (MARTÍNEZ et al., 2018). Peptaibols produzidos por *Trichoderma harzianum* apresentaram efeito inseticida contra larvas de *T. molitor* em ensaio via alimentação e tópico, a uma concentração de 10 mg/mL (SHAKERI; FOSTER, 2007).

Tabela 9 – Larvas de *T. molitor* mortas após tratamento com o sobrenadante da fermentação de Phaeosphaeriaceae GV-1 e diferentes concentrações de cercosporamida. Insetos de diferentes arenas mas mesmo tratamento/repetição foram agrupados para melhor visualização dos dados.

Tratamento		Larvas mortas após 15 dias	
		1ª repetição	2ª repetição
Alimentação	Controle	0	0
	Sobrenadante	1	3
	0,1 mg/mL CCP	2	3
	1 mg/mL CCP	0	2
	5 mg/mL CCP	0	0
	10 mg/mL CCP	0	2
Tópico	Controle	0	0
	Sobrenadante	0	0
	0,1 mg/mL CCP	0	0
	1 mg/mL CCP	0	0
	5 mg/mL CCP	1	0
	10 mg/mL CCP	4	0

6 CONCLUSÃO

A busca por novos compostos com atividade antifúngica é extremamente necessária visto as limitações encontradas atualmente, seja na área da saúde ou agrícola. A toxicidade dos compostos utilizados atualmente, a falta de eficácia e, principalmente, o aumento dos casos de resistência aos antifúngicos nos leva a uma urgente busca por novos compostos e desenvolvimento de uma nova geração de antifúngicos.

Neste estudo, a cercosporamida apresentou atividade antifúngica contra importantes cepas de fungos patogênicos, cepas emergentes e com grande histórico de resistência as drogas utilizadas comercialmente, que são responsáveis por causar infecções invasivas severas em pacientes imunocomprometidos, e também fungos fitopatogênicos, capazes de afetar diversas e importantes culturas agrícolas. Também se obteve resultados positivos no ensaio *in vivo* contra *P. italicum*, retardando o desenvolvimento do bolor azul em laranjas infectadas, sendo o primeiro ensaio *in vivo* em plantas descrito para a cercosporamida. Isso confirma sua bioatividade descrita em estudos anteriores, se mostrando assim um composto promissor na sua utilização como agente antifúngico.

A cercosporamida ainda é o único composto descrito que atua na inibição da Pkc1, com uma inibição altamente seletiva, podendo pavimentar assim o estudo de uma nova classe de antifúngicos, por meio da sua utilização e também no desenvolvimento de derivados baseados em sua estrutura, visando possíveis aplicações tanto na área da saúde quanto na área agrícola.

Referências

- AHMED, S. A. et al. Tintelnotia, a new genus in Phaeosphaeriaceae harbouring agents of cornea and nail infections in humans. **Mycoses**, v. 60, n. 4, p. 244–253, 2017.
- ALEXANDER, B. D. et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 2013.
- ALTMAN, J. K. et al. Inhibition of Mnk kinase activity by cercosporamide and suppressive effects on acute myeloid leukemia precursors. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3675–3681, 2013.
- AZEVEDO, M. M. et al. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 34, p. 7463–7468, 2015.
- BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 441–451, 2007.
- BAZIOLI, J. M. et al. Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins**, v. 11, n. 460, p. 1–22, 2019.
- BENNETT, J. E. Agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 1571-1591.
- BERGER, S. et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–6, 2017.
- BERNABÉ, P. et al. Chilean crab (*Aegla chilchol*) as a new source of chitin and chitosan with antifungal properties against *Candida* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 962–975, 2020.
- BRAUER, V. S. et al. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. **Biomolecules**, v. 9, n. 521, p. 1–21, 2019.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1–10, 2012.

BUNERI, I. D. et al. A comparative toxic effect of *Cedrus deodara* oil on larval protein contents and its behavioral effect on larvae of mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 281–285, 2019.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CASSEREAU, J. et al. Neurotoxicity of Insecticides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2988–3001, 2017.

CHANG, C. C.; SLAVIN, M. A.; CHEN, S. C. A. New developments and directions in the clinical application of the echinocandins. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 1613–1621, 2017.

CHEN, C. et al. A flavonone pinocembroside inhibits *Penicillium italicum* growth and blue mold development in ‘Newhall’ navel oranges by targeting membrane damage mechanism. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 165, p. 1–7, 2020a.

CHEN, J. et al. Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and *in vivo*: A review. **Plants**, v. 8, n. 26, p. 1–19, 2019.

CHEN, S. et al. Preclinical evidence that MNK/eIF4E inhibition by cercosporamide enhances the response to antiangiogenic TKI and mTOR inhibitor in renal cell carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 530, n. 1, p. 142–148, 2020b.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–10, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3. ed., 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M38 - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 3. ed., 2017.

COLOMBO, A. L. et al. Effects of the natural peptide crotamine from a south american rattlesnake on *Candida auris*, an emergent multidrug antifungal resistant

human pathogen. **Biomolecules**, v. 9, n. 205, p. 1–10, 2019.

CONOVER, M. A. et al. Usnic acid amide, a phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidium henningsii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 2999–3001, 1992.

CROUS, P. et al. The Genera of Fungi - fixing the application of the type species of generic names - G2: *Allantophomopsis*, *Latorua*, *Macrodiplodiopsis*, *Macrohilum*, *Milospium*, *Protostegia*, *Pyricularia*, *Robillarda*, *Rotula*, *Septoriella*, *Torula*, and *Wojnowicia*. **IMA Fungus**, v. 6, n. 1, p. 163–198, 2015.

CULLINEY, T. W. Crop losses to arthropods. In: PIMENTEL, D.; PESHIN, R. **Integrated pest management**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. v. 3: Pesticide problems. p. 201–225. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-94-007-7796-5.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.

D'AGOSTINO, M. et al. Overinduction of CYP51A Gene after Exposure to Azole Antifungals Provides a First Clue to Resistance Mechanism in *Fusarium solani* Species Complex. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 768–773, 2018.

DAO, V. H. et al. Benzofuro[3,2-d]pyrimidines inspired from cercosporamide CaPkc1 inhibitor: Synthesis and evaluation of fluconazole susceptibility restoration. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 13, p. 2250–2255, 2018.

DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 14, p. 1291–1302, 2013.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DENARDI, L. B. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 30–36, 2018.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81–106, 2007.

DU, F. et al. Sesquiterpenes and Cyclodepsipeptides from Marine-Derived Fungus *Trichoderma longibrachiatum* and Their Antagonistic Activities against Soil-Borne Pathogens. **Marine Drugs**, v. 18, n. 165, p. 2–10, 2020.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

ELBARADEI, A. A decade after the emergence of *Candida auris*: what do we know? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1617–1627, 2020.

EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

ESCHENAUER, G.; DEPESTEL, D. D.; CARVER, P. L. Comparison of echinocandin antifungals. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 1, p. 71–97, 2007.

FENG, L. et al. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, p. 160–164, 2011.

FERRAZ, L. P. et al. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188–189, p. 72–79, 2016.

FERREIRA, F. P. S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89–96, 2014.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of experimental pathology**, v. X, n. 3, p. 226–236, 1929.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Citrus Fruit Fresh and Processed – Statistical Bulletin 2016**. Roma: FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2020.

FRAC. **Fungicide Resistance Action Committee**. Disponível em: <https://www.frac.info>. Acesso em: 16 jul. 2020.

FURUKAWA, A. et al. (-)-Cercosporamide derivatives as novel antihyperglycemic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 724–726, 2009.

GADE, L. et al. Understanding the Emergence of Multidrug-Resistant *Candida*: Using Whole-Genome Sequencing to Describe the Population Structure of *Candida haemulonii* Species Complex. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1–15, 2020.

GAMA, A. B. et al. A Threshold-Based Decision-Support System for Fungicide Applications Provides Cost-Effective Control of Citrus Postbloom Fruit Drop. **Plant disease**, v. 103, n. 9, p. 2433–2442, 2019.

GILLOTT, C. **Entomology**. 3 ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005. 835 p. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F1-4020-3183-1.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.

GODOY, C. V. et al. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407–421, 2016.

GRIMMER, M. K. et al. Evaluation of a matrix to calculate fungicide resistance risk. **Pest Management Science**, v. 70, n. 6, p. 1008–1016, 2014.

HAGER, C. L. et al. In vitro and in vivo evaluation of the antifungal activity of APX001A/APX001 against *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 1–7, 2018.

HAIDAR, G.; SINGH, N. *Cryptococcus*: Shedding new light on an inveterate yeast. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 2, p. 115–129, 2015.

HAO, W. et al. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 39–43, 2010.

HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Predicting resistance by mutagenesis: Lessons from 45 years of MBC resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

HOFFMAN, A. M. et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1049–

1056, 2008.

HSU, L. H. et al. The antibiotic polymyxin B exhibits novel antifungal activity against *Fusarium* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 6, p. 740–748, 2017.

ISHIDA, K. et al. Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, p. 1–10, 2011.

ISLA, G. et al. *Candida haemulonii* sensu lato: Update of the Determination of Susceptibility Profile in Argentina and Literature Review. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 4, p. 203–208, 2017.

JAYASURIYA, N. S. S. et al. An unusual presentation of rhinofacial zygomycosis due to *Cunninghamella* sp. in an immunocompetent patient: A case report and literature review. **Oral Diseases**, v. 12, n. 1, p. 67–69, 2006.

JENKS, J. D. et al. Clinical characteristics and outcomes of invasive *Lomentospora prolificans* infections: Analysis of patients in the FungiScope® registry. **Mycoses**, v. 63, n. 5, p. 437–442, 2020.

KANEMARU, M. Y. S. **Soro de Leite como meio de cultivo de micro-organismo antagonista a fungos micotoxigênicos**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2014.

KANEMARU, M. Y. S. **Determinação do efeito antifúngico de *Phaeosphaeria* sp. isolado de goiaba contra fungos de relevância agroalimentar**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; SAFFARIAN, Z. Anti-fungal activity of some native essential oils against emerging multi-drug resistant human nondermatophytic moulds. **Journal of Herbal Medicine**, v. 23, p. 1–6, 2020.

KIM, M. N. et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 6, p. 57–61, 2009.

KONICEK, B. W. et al. Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting

kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1849–1857, 2011.

KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873–880, 2010.

KUMARI, B. R. et al. Microbes as interesting source of novel insecticides: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 26, p. 2582–2592, 2014.

LAUPACIS, A. et al. Cyclosporin A: A powerful immunosuppressant. **Canadian Medical Association Journal**, v. 126, n. 9, p. 1041–1046, 1982.

LIU, Y. et al. Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation by cercosporamide selectively suppresses angiogenesis, growth and survival of human hepatocellular carcinoma. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 237–243, 2016.

LIU, Y. et al. New antifungal tetrahydrofuran derivatives from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. LS78. **Fitoterapia**, v. 146, p. 1–5, 2020.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 134–140, 2017.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The Evolution of Fungicide Resistance. In: **Advances in Applied Microbiology**. Elsevier Ltd, 2015. v. 90p. 29–92.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. **Studies in Mycology**, v. 94, p. 1–124, 2019.

MARTÍNEZ, L. C. et al. Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, p. 716–725, 2018.

MAZU, T. K. et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016.

MCGRATH, M. T. **What are Fungicides?**. The American Phytopathological Society, 2016. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicides.aspx>. Acesso em: 28 jul. 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**
 – **Consulta** **Aberta.** Disponível em:
https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 23 jul.
 2020.

MISCH, E. A.; SAFDAR, N. Updated guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 12, p. E1771–E1776, 2016.

MOHAMMADI, M. et al. Synthesis, Characterization and Evaluation of Liponiosome Containing Ginger Extract as a New Strategy for Potent Antifungal Formulation. **Journal of Cluster Science**, v. 31, n. 5, p. 971–981, 2020.

MORAIS, S. DE et al. Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* cham. (verbenaceae) from São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 262–270, 2016.

MOROSINI, L. Avanço dos fungos. **Revista Radis**, n. 196, p. 26-33, jan. 2019. Disponível em:
https://radis.ensp.fiocruz.br/phocadownload/revista/Radis196_web.pdf.

MOSBACH, A. et al. Anilinopyrimidine resistance in *Botrytis cinerea* is linked to mitochondrial function. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, 2017.

NAWAZ, A.; GOGI, M. D.; SUFYAN, M. Insect-pests in dryland agriculture and their integrated management. In: FAROOQ, M.; SIDDIQUE, K. H. M. **Innovations in Dryland Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 143-186. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-47928-6.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.

OLMEDO, G. M. et al. Polyhexamethylene guanidine as a fungicide, disinfectant and wound protector in lemons challenged with *Penicillium digitatum*. **Food Microbiology**, v. 76, p. 128–134, 2018.

OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H.; SIMONART, P. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. **The Biochemical journal**, v. 33, n. 2, p. 240–248, 1939.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. **Intoxicações agudas por agrotóxicos: Atendimento inicial do paciente intoxicado.** Curitiba, 2018. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/IntoxicacoesAgudasAgrotoxicos2018.pdf>.

Acesso em: 27 fev. 2019.

PEREIRA JR, N.; BON, E. P. DA S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos.** Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. v. I

PÉREZ-ALFONSO, C. O. et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 101–106, 2012.

PÉREZ, M. et al. Antimicrobial evaluation of extracts obtained from tropical micromycetes against phytopathogens. **International Journal of Experimental Botany**, v. 85, n. 1, p. 7–14, 2016.

PERFECT, J. R. Is there an emerging need for new antifungals? **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 21, n. 2, p. 129–131, 2016.

PHOOKAMSAK, R. et al. Revision of Phaeosphaeriaceae. **Fungal Diversity**, v. 68, n. 1, p. 159–238, 2014.

PILLAI, M. K.; MATAMANE, R. P.; MEKBIB, S. B. Antimicrobial activities of extracts from leaves and stem-bark of *Buddleja salviifolia*. **Food Research**, v. 3, n. 6, p. 761–767, 2019.

POMORSKA, A. et al. Isavuconazole in a Successful Combination Treatment of Disseminated Mucormycosis in a Child with Acute Lymphoblastic Leukaemia and Generalized Haemochromatosis: A Case Report and Review of the Literature. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 81–88, 2019.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, 1, p. 5–11, 2005.

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. **Recognition and management of pesticide poisonings.** 6. ed. Washington: United States Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, 2013.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, 2014.

ROMANAZZI, G. et al. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 579–601, 2017.

RUSSELL, P. E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 1, p. 11–25, 2005.

SAMPAIO, P. DA S.; SANCHO, L. G.; LAGO, R. F. DO. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 15–22, 2018.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SINDIVEG. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal**. Disponível em: <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 14 jul. 2020.

SINGH, S. B.; PELAEZ, F. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. In: PETERSEN, F.; AMSTUTZ, R. **Natural Compounds as Drugs**. Basel: Birkhäuser, 2008. p. 141-174. Disponível em: <https://link-springer-com.ez88.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2F978-3-7643-8117-2.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SHAKERI, J.; FOSTER, H. A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 961–968, 2007.

SHARIFI-RAD, J. et al. Chemical composition and biological activity of pulicaria vulgaris essential oil from Iran. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1633–1636, 2014.

SHARIFI-RAD, J. et al. Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential Oil from *lallelantia royleana* (benth. in wall.) benth. **Journal of Food Safety**, v. 35, p. 19–25, 2015.

SOUZA, C. M. C. et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 515–523, 2016.

SOUZA, P. C. DE et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 125, p. 1–

12, 2018.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.

SUGAWARA, F. et al. The Structure and Biological Activity of Cercosporamide from *Cercosporidium henningsii*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 909–910, 1991.

SUSCA, A. et al. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–15, 2016.

SUSSMAN, A. et al. Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 932–943, 2004.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, 2017.

TAN, L. et al. Antifungal activity of spider venom-derived peptide lycosin-I against *Candida tropicalis*. **Microbiological Research**, v. 216, p. 120–128, 2018.

TAO, N. et al. The terpene limonene induced the green mold of citrus fruit through regulation of reactive oxygen species (ROS) homeostasis in *Penicillium digitatum* spores. **Food Chemistry**, v. 277, p. 414–422, 2019.

TEIXEIRA, A. P. DE C. et al. Antifungal activity study of the monoterpene thymol against *Cryptococcus neoformans*. **Natural Product Research**, v. 34, n. 18, p. 2630–2633, 2018.

TETZ, G. et al. *In Vitro* Activity of a Novel Antifungal Compound , MYC-053 , against Clinically Significant Antifungal-Resistant Strains of *Candida glabrata*, *Candida auris*, *Cryptococcus neoformans*, and *Pneumocystis* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 1–8, 2019.

TONIAL, F. et al. Biological activity of Diaporthe terebinthifolii extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 5, p. 1–7, 2017.

UNO, K. et al. Case of endobronchial metastasis from breast cancer accompanied with *Cunninghamella bertholletiae* tracheobronchial mycetoma. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 12, p. 1065–1069, 2019.

URASHIMA, A. S.; MISTURA, T. DE F.; GONÇALVES, C. R. N. C. B. Diversity of citrus gummosis in São Paulo State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 209–215, 2016.

WANG, L. et al. A metabolite of endophytic fungus *Cadophora orchidicola* from *Kalimeris indica* serves as a potential fungicide and TLR4 agonist. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1383–1390, 2019.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Agency Office of Pesticide Programs. **Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential**: Annual Cancer Report. 2018. Disponível em: http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf. Acesso em: 23 jul. 2020.

WANG, L. et al. A metabolite of endophytic fungus *Cadophora orchidicola* from *Kalimeris indica* serves as a potential fungicide and TLR4 agonist. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1383–1390, 2019.

WANG, W. et al. Control of green and blue mold and sour rot in citrus fruits by the cationic antimicrobial peptide PAF56. **Postharvest Biology and Technology**, v. 136, p. 132–138, 2018.

WIEDERHOLD, N. P.; LAW, D.; BIRCH, M. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent *in vitro* activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 7, p. 1977–1980, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**: Global Report on Surveillance. 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=B21F91C09C7A80B345168C1881CA30B6?sequence=1. Acesso em: 07 ago. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Model list of essential medicines**. 20. ed., 2017. Disponível em:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273826/EML-20-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 02 fev. 2019.

WU, H. BO et al. Leaves of *Magnolia liliflora* Desr. as a high-potential by-product: Lignans composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-phytopathogenic fungal and phytotoxic activities. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 416–424, 2018.

XIAO, M. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 802–810, 2015.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2016.

ZHENG, X. et al. A *Streptomyces* sp. strain: Isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against soilborne diseases of tomato plants. **Biological Control**, v. 136, p. 1–10, 2019.