

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos

HECTOR MAURICIO CASANOVA NAVARRO

Fungos filamentosos associados a recifes de coral na Zona Econômica Exclusiva (Amazônia Azul) da costa nordeste do Brasil: Bioprospecção de metabólitos secundários antimicrobianos e potenciais mecanismos de ação

MACEIÓ - ALAGOAS
12/2023

HECTOR MAURICIO CASANOVA NAVARRO

Fungos filamentosos associados a recifes de coral na Zona Econômica Exclusiva (Amazônia Azul) da costa nordeste do Brasil: Bioprospecção de metabólitos secundários antimicrobianos e potenciais mecanismos de ação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Fontes Landell
Co-orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

MACEIÓ - ALAGOAS

12/2023

AGRADECIMENTOS

A mi familia: Existen caminos que emprendemos solos, sin embargo, ustedes siempre estuvieron a mi lado, en las alegrías, las dificultades y los momentos de profunda reflexión. Para ti madre, que hiciste posible el hoy estar aquí, todos mis logros han sido siempre pensando en darte alegrías y hacerte sentir orgullosa mi blancura de chocolate. Gracias por levantarme del polvo cuando caí, limpiar mis ropas, mis lágrimas y darme siempre el apoyo para continuar, siempre vas a ser la luz y el amor más grande de mi vida. A mis hermanos Jaz, Johan, Duwan y Andrés gracias por siempre estar en este camino, a mis sobrinos que son mi motivación Juan, Male, Sarita, Victoria, Adrián. A mi papá por siempre exhortarme a salir del nido.

A Ivón, mi amiga, compañera, pasión y dolor de cabeza (jajaja), sería pretensioso saber por todo lo que pasaste, los sacrificios, la distancia, las luchas, la soledad. Solo nosotros sabemos todo lo que esto significa y lo que vendrá de aquí en adelante. A Simón por abrirme su corazón y permitirme entrar en sus vidas, siempre ha sido un orgullo compartir con ustedes. Finalmente, al Sr. Jairo y en especial a la Sra. Anita con quien en esta carrera los caminos se separaron y espero que desde la otra vida nos esté guiando, prometo los cuidaré como míos.

Ao PPG-DIBICT, aos professores que me ajudaram e compartilharam o conhecimento durante todos estes anos, aos meus amigos Ciro, Gustavo, Victor, Bruno, a meus colegas do laboratório Julio, Maxsuel, Vitoria, Orlando, Walter e todos os demais colegas que contribuíram direta ou indiretamente. Aos professores Edeildo Ferreira, Johnnatan Duarte, Denise Brenta por todos os aportes neste trabalho. Um especial agradecimento à professora Dra. Melissa Fontes, por todos estes anos de conhecimento compartilhado, de luta, paciência, e por me abrir as portas do LDMB, sempre serei grato, a meu coorientador Dr. João Xavier de Araújo Júnior. Finalmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) e Organização dos Estados Americanos pelo apoio financeiro através de bolsas de doutorado pelo acordo PAEC OEA-GCUB.

SUMÁRIO

1 RESUMO	9
2 APRESENTAÇÃO	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Ecologia e diversidade do ambiente marinho: perspectivas e realidade	14
3.2 O Holobionte: associações entre o hospedeiro animal e sua microbiota	16
3.3 Fungos: Evolução, diversidade e seu rol no ambiente marinho	20
3.3.1 Evolução e classificação de fungos marinhos	20
3.3.2 Ecologia dos fungos marinhos	27
3.3.3 Quimiodiversidade de Produtos Naturais de Micro-organismos marinhos (PNMMs): Fungos, além das suas rotas biossintéticas	33
3.3.3.1 Rotas biossintéticas de metabólitos secundários em fungos	33
3.3.3.2 Principais Produtos Naturais de Micro-organismos marinhos (PNMMs) em fungos	39
I. Policetídeos (PKs) e Policetídeos não ribossomais (NRPs)	42
a. Policetídeos	43
b. Peptídeos não ribossomais (NRPs)	45
II. Terpenoides	47
a. Monoterpenos	47
b. Sesquiterpenos	49
c. Meroterpenos	49
III. Diketopiperazinas (DKPs)	50
IV. Alcaloides	52
a. Alcaloides derivados de diketopiperazinas (DKPs)	53
b. Alcaloides derivados de indol	54
c. Alcaloides derivados de quinazolonas	56
d. Alcaloides derivados de quinolinas	56
V. Pigmentos	56

3.3.4 Os MSs de fungos marinhos e seus mecanismos de ação: Células fúngicas e bacterianas	58
3.3.4.1 Mecanismos de ação em células de leveduras	59
3.3.4.2 Mecanismos de ação em células de bactérias	63
a. Parede celular - β -lactâmicos	66
b. Agentes antimicrobianos com alvo nas membranas citoplasmáticas bacterianas	68
c. Agentes atuantes sobre a sínteses do DNA e processos metabólicos	68
4 MÉTODOS	71
4.1 Seleção das linhagens fúngicas.....	71
4.2 Preparação dos extratos fúngicos	72
4.3 Atividade antimicrobiana	73
4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana: Ensaio de difusão em disco	73
4.3.2 Ensaio para determinar a concentração inibitória mínima (CIM)	75
4.3.3 Teste de determinação da concentração mínima bactericida/fungicida (MBC/MFC)	76
4.4 Desreplicação dos extratos de fungos filamentosos marinhos.....	76
4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-VIS SPD-20A (CLAE - UV) no modo semipreparativo	76
4.4.2 Análise por cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa (CG-MS)	77
4.5 Identificação dos fungos marinhos	78
4.5.1 Identificação Molecular	78
4.5.2 Caracterização morfológica	79
CAPÍTULO I - Fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos na Amazônia azul: Triagem do potencial biotecnológico e descrições morfológica e molecular da espécie <i>Epicoccum chloridis</i> FMPV 05	81
Resumo	81
1 Introdução	82

2 Metodologia	84
3 Resultados	85
3.1 Seleção das espécies de fungos filamentosos marinhos com potenciais biotecnológicos	85
3.2 Obtenção dos extratos e avaliação de atividade antimicrobiana	86
3.2.1 Produção e obtenção dos extratos	86
3.2.2 Triagem para determinação da atividade antimicrobiana	88
3.3 Caracterização Morfológica e Molecular de <i>Epicoccum chloridis</i> FMPV 05	89
3.3.1 Macro e micromorfologia	89
3.3.2 Análises molecular	91
4 Discussão	94
5 Conclusões	97
6 Referências	99

CAPÍTULO II - Secondary metabolites from the marine fungus *Epicoccum chloridis* FMPV 05: biological activity and potential modes of action against emerging pathogens123

Abstract	124
1 Introduction	125
2 Material and Methods	127
2.1 Strain screening and molecular taxonomy	127
2.2 Extract obtention	128
2.3 Chemical analysis of fungal extracts	128
2.3.1 Preparative high-performance liquid chromatography with UV-VIS SPD-20A detector (HPLC- UV) for fractionation	128
2.3.2 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis	129
2.4 Antimicrobial activity assay	130

2.4.1 Determination of the minimum bactericidal/fungicide concentration (MBC/MFC)	131
2.5 Cellular toxicity and virulence factor assessment	132
2.5.1 Evaluation of disruption and inhibition of biofilm formation	132
2.5.2 Hemolytic activity assay	133
2.5.3 Antioxidant assay	134
2.5.4 Effect of <i>E. chloridis</i> FMPV 05 secondary metabolites on mitochondrial function (MTT assay)	135
2.5.5 Study of inhibition of the development of <i>C. albicans</i> filaments	136
2.5.6 Evaluation of the polysaccharide capsule through India ink stain and melanin productions of <i>Cr. neoformans</i>	136
2.6 Potential mode of action	137
2.6.1 Sorbitol protection assay	137
2.6.2 Ergosterol binding assay-MIC	138
2.7 Statistical analysis	139
3. Results	140
3.1 Chemical analysis of fungal extracts	140
3.2 Antimicrobial activity	142
3.3 Cellular toxicity and virulence factor assessment	144
3.3.1 Hemolytic and antioxidant activities	144
3.3.2 Effect on mitochondrial function (MTT assay)	144
3.3.3 Disruption and inhibition of biofilm formation	145
3.3.4 Inhibition of pseudohyphae and hyphae formation	147
3.3.5 Polysaccharide capsule and melanin production by <i>Cr. neoformans</i>	148
3.4 Antimicrobial mode of action	149

3.4.1 Sorbitol protection	149
3.4.2 Ergosterol binding	149
4. Discussion	150
4.1 Secondary metabolites and antimicrobial activity	150
4.2 Hemolytic activity and cellular toxicity	153
4.3 Control of virulence factors and potential modes of action	154
4.4 Antimicrobial potential modes of action	156
5. Conclusions	158
6. References.....	159

CAPÍTULO III - Metabolic constituents of the marine fungus *Aspergillus sydowii* FMPV 10 and its antifungal activity and chemodiversity.....174

Abstract	175
1. Introduction.....	176
2. Material and Methods.....	178
2.1 Strain and screening.....	178
2.2 Metabolites extraction for the OSMAC strategy.....	178
2.3 Analysis chemical of fungal extracts.....	179
2.3.1 Liquid chromatography–mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS).....	180
2.4 Antimicrobial activity assay.....	180
2.5 Determination of the minimum fungicide or fungistatic concentration.....	181
3. Results	182
3.1 Chemical and biological profiles of extracts of fungal <i>A. sydowii</i> FMPV 10.....	182

3.2 Antimicrobial Activity Assay.....	184
4. Discussion.....	186
4.1. Chemical and biological profiles of SMs annotated of <i>A. sydowii</i> FMPV 10.....	186
4.2 Metabolic comparison of AsGli and AsChi extracts obtained through the OSMAC strategy for <i>A. sydowii</i>.....	190
5. Conclusions.....	191
References.....	192
5 DISCUSSÃO GERAL	200
6 CONCLUSÕES GERAIS	203
7 REFERÊNCIAS	205

1. RESUMO

Ecossistemas marinhos entre eles os recifes de coral, são impactados pelas mudanças climáticas globais induzidas principalmente pela atividade antrópica. A Zona Econômica Exclusiva (Amazônia Azul) que abrange regiões tropicais, contém importantes ecossistemas de recifes de corais onde acontecem diversas interações entre macro e micro-organismos incluindo fungos. A riqueza de espécies de fungos no ambiente marinho é de aproximadamente 1900 que corresponde a 1% das espécies descritas. As funções dos fungos no ecossistema marinho estão relacionadas à produção de produtos naturais (PNs), obtidos de rotas biossintéticas especializadas relacionados a agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs), apresentando diversas atividades biológicas. Os metabólitos secundários (MSs) de fungos marinhos estão envolvidos no mecanismo de defesa própria como de seu hospedeiro, e também na comunicação com outros micro-organismos. PNs de fungos marinhos são foco pela demanda crescente de moléculas com potenciais antimicrobianos contra patógenos emergentes. Diversas técnicas baseadas em ativação ou em fermentação comum, contribuem de maneiras diferentes na obtenção destes PNs. Objetivou-se, portanto, a avaliação de bioprospecção de metabólitos secundários e potenciais atividades biológicas de fungos filamentosos isolados de esponjas e corais associados a recifes de coral na região nordeste da Zona Econômica Exclusiva (Amazônia Azul). Foram aplicadas metodologias contemplando o uso de meios de cultura tradicionais, assim como de técnicas baseadas em ativação das rotas biossintéticas, para elucidar os MSs produzidos por fungos pertencentes à micoteca do laboratório de diversidade e biotecnologia microbiana - UFAL. Técnicas cromatográficas de análises químicas foram usadas para determinar os compostos sintetizados e posteriormente anotados. Além disso foi feita avaliação das atividades biológicas contra os patógenos emergentes *Candida albicans* ATCC ® 90028, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC ® 208821, e as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC ® 25904, *Escherichia coli* ATCC ® 25922, *Proteus mirabilis* ATCC ® 25933 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC ® 27853. Análises moleculares e morfológicas foram realizadas para estabelecer as relações filogenéticas da espécie *Epicoccum chloridis* FMPV 05. A partir de 43 espécies presentes na micoteca do LDBM-UFAL, foram selecionadas sete linhagens de fungos filamentosos, *Aspergillus ruber* FMPV 02; *E. chloridis* FMPV 05; *A. sydowii* FMPV 10; *Aspergillus flavus* FMPV 11; *Curvularia* sp. FMPV 12; *Penicillium pedernalense* FMS 066; *Pyrenochaetopsis* sp. FMS 104. Foram avaliadas cinco extratos brutos e/ou suas frações obtidos a partir do micélio e sobrenadante do cultivo. Os fungos *E. chloridis* FMPV 05; *A. sydowii* FMPV 10 mostraram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *C. neoformans* e a bactéria *S. aureus*, as análises químicas dos extratos e das frações destes, mostraram que a linhagens FMPV 05 os compostos anotados como dicetopiperazinas cyclo Leu-Pro (12.62 %) e seu isomer (21.15%), cyclo Phe-Val (6.22%) y cyclo Pro-Phe (4.50%) foram como os possíveis responsáveis pelas atividade antimicrobiana e

controladores dos fatores de virulência dos patógenos. Em relação a *A. sydowii* FMPV 10 a técnica de ativação metabólica através da estratégia uma linhagem muitos compostos (OSMAC), mostrou 95% de diferença nos compostos sintetizados entre dois meios de cultura, o extrato obtido a partir do meio com glicose (AsGli) como fonte de carbono, mostrou atividade antifúngica contra *C. albicans*, e *C. neoformans*, o extrato obtido do meio com quitosana (AsChi), não mostrou atividade contra estes patógenos. Corroborando que diferentes estratégias de cultivo potencializam a produção de MSs com perfis químicos e biológicos diferentes. As linhagens *E. chloridis* FMPV 05 e *A. sydowii* FMPV 10 produzem moléculas com atividade antimicrobiana e controladoras de fatores de virulência, contra bactérias e fungos patogênicos de alto risco para a saúde humana. Fungos marinhos da ZEE-Amazônia azul são promissores na obtenção de MSs diversos, no entanto se faz necessário entender o papel destes micro-organismos nos ecossistemas marinhos.

Palavras chave: Biossíntese de produtos naturais; Recifes de coral; Fatores de virulência; produtos naturais marinhos.

ABSTRACT

Marine ecosystems, including coral reefs, are impacted by global climate change, primarily induced by anthropogenic activity. The Exclusive Economic Zone (also known as the Blue Amazon), which spans tropical regions, houses significant coral reef ecosystems. These ecosystems are sites of various interactions between macro and micro-organisms, including fungi. The species richness of fungi in the marine environment is approximately 1,900, accounting for 1% of the described species. The roles of fungi in the marine ecosystem are tied to the production of natural products (NPs). These NPs are derived from specialized biosynthetic pathways associated with biosynthetic gene clusters (BGCs) and exhibit diverse biological activities. Secondary metabolites (SMs) of marine fungi play a part in their own defense mechanisms, the defense of their hosts, and communication with other microorganisms. Marine fungal NPs have become a focus due to the increasing demand for molecules with antimicrobial potential against emerging pathogens. Techniques based on activation or common fermentation, contribute differently to the production of these NPs. The aim was to evaluate the bioprospecting of secondary metabolites and potential biological activities of filamentous fungi isolated from sponges and corals associated with coral reefs in the northeastern region of the Exclusive Economic Zone (Blue Amazon). Methodologies were employed, including the use of traditional culture media and techniques based on the activation of biosynthetic pathways, to elucidate the SMs produced by fungi from the microbial diversity and biotechnology laboratory's mycotheque library - UFAL. Chromatographic chemical analysis techniques were utilized to identify synthesized compounds. In addition, biological activities were assessed against the emerging pathogens *Candida albicans* ATCC ® 90028, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*

ATCC ® 208821, and the bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC ® 25904, *Escherichia coli* ATCC ® 25922, *Proteus mirabilis* ATCC ® 25933, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC ® 27853. Molecular and morphological analyses were conducted to establish the phylogenetic relationships of the species *E. chloridis* FMPV 05. From the 43 species present in the LDBM-UFAL mycotheque, seven strains of filamentous fungi were selected: *Aspergillus ruber* FMPV 02; *E. chloridis* FMPV 05; *Aspergillus sydowii* FMPV 10; *Aspergillus flavus* FMPV 11; *Curvularia* sp. FMPV 12; *Penicillium pedernalense* FMS 066; *Pyrenochaetopsis* sp. FMS 104. Five crude extracts and/or their fractions obtained from mycelium and culture supernatant were evaluated. The fungi *E. chloridis* FMPV 05 and *A. sydowii* FMPV 10 demonstrated antimicrobial activity against *C. albicans*, *C. neoformans*, and the bacterium *S. aureus*. Chemical analyses of the extracts and their fractions revealed that in strain FMPV 05, the compounds identified as diketopiperazines cyclo Leu-Pro (12.62%) and its isomer (21.15%), cyclo Phe-Val (6.22%), and cyclo Pro-Phe (4.50%) were potentially responsible for the antimicrobial activity and control of the virulence factors of the pathogens. Regarding *A. sydowii* FMPV 10, metabolic activation techniques using the One Strain Many Compounds (OSMAC) strategy demonstrated a 95% difference in the compounds synthesized between two culture media. The stratum obtained from the medium with glucose (AsGli) as a carbon source exhibited antifungal activity against *C. albicans* and *C. neoformans*. However, the extract obtained from the medium with chitosan (AsChi) did not show activity against these pathogens. This corroborates that different cultivation strategies enhance the production of secondary metabolites (SMs) with varying chemical and biological profiles. The strains *E. chloridis* FMPV 05 and *A. sydowii* FMPV 10 produce molecules with antimicrobial activity and control virulence factors, acting against pathogenic bacteria and fungi that pose a high risk to human health. Marine fungi from the Blue Amazon Exclusive Economic Zone (EEZ) show promise in obtaining diverse secondary metabolites (SMs). However, it is necessary to understand the role of these microorganisms in marine ecosystems.

Keywords: Biosynthesis of natural products; Coral reefs; Virulence factors; Marine natural products.

2. APRESENTAÇÃO

Ecossistemas marinhos e em particular os recifes de coral são um dos ambientes mais afetados pelas mudanças climáticas globais induzidas pelas atividades humanas. Grandes metrópoles costeiras, a indústria, a falta de saneamento básico, assim como a sobre exploração desmedida de produtos da pesca, afetam a estrutura e o funcionamento destes ecossistemas marinhos em diferentes escalas, o que por sua vez, impactam os padrões de biodiversidade, e os serviços ecossistêmicos que estes ambientes oferecem para as comunidades marinhas e suas contrapartes terrestres, incluindo ao homem.

Brasil é um dos 15 países com maior extensão costeira no qual a região litorânea abrange regiões temperadas e tropicais constituindo o que hoje é considerada como a Amazônia azul, esta região se constitui num ponto estratégico descrito como zona econômica exclusiva (ZEE), onde se encontram grandes reservas de minerais, petróleo e uma vasta biodiversidade incluindo importantes recifes de coral, estuários, manguezais, e uma grande variedade de espécies marinhas. Estes sistemas ecológicos se caracterizam pela presença de importantes extensões de recifes de coral considerados *hotspots* de biodiversidade. Nestes ecossistemas, interações ecológicas contribuem com o equilíbrio no ambiente marinho. Uma dessas associações ocorre entre um hospedeiro animal principalmente invertebrado e sua microbiota associada composta por microalgas simbióticas, bactérias, vírus, arqueias e fungos, o que é descrito como holobionte.

Os fungos de ambiente marinho fazem parte de diversas associações, no entanto sua diversidade nestes ambientes é pouco estudada. A origem dos fungos no mar data de eras pré-históricas e o que se conhece da riqueza de espécies de este grupo taxonômico atualmente só chega a ser próximo ao 1% (pouco mais de 1,800 espécies), destacando-se o filo *Ascomycota* com 90% das espécies descritas. Porém, a diversidade de fungos marinhos é estimada em 10 mil espécies, o que indica que potencialmente se têm uma maior riqueza de fungos deste ambiente para

ser explorada, revelando o pouco que sabemos no que diz respeito aos papéis que estes organismos desempenham nestes ambientes.

Fungos de ambiente marinho se estabelecem em diferentes nichos, como corais, esponjas, leito marinho e manguezais, fazendo parte de sua microbiota e desempenhando papéis essenciais nos hospedeiros. Se sabe, no entanto, que participam dos processos que contribuem com a defesa, fotoproteção, decomposição, disponibilização de nutrientes mineralização, e ciclagem de nutrientes. Além disso, atuam como marcadores biológicos das condições ambientais, da saúde dos seus hospedeiros e dos ecossistemas onde estão presentes.

Conhecer a diversidade biológica e a quimiodiversidade de fungos marinhos é vital para o entendimento do seu papel como integrantes da microbiota nas associações no ecossistema marinho. Estudos no Brasil e no mundo focados na obtenção de moléculas biossintetizadas por fungos marinhos, vêm ganhando cada vez mais destaque. Produtos naturais de micro-organismos marinhos (PNMMs) em particular de fungos que são responsáveis por entre 35 - 40% dos PNMMs neste ambiente, os quais pertencentes a diversas classes químicas, como policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos, alcaloides, dicetopiperazinas, pigmentos entre outras. Estes metabólitos são originados de rotas biossintéticas especializadas que possibilitam a produção de moléculas com estruturas mais complexas e com potenciais atividades biológicas, auxiliando na demanda crescente novas moléculas com potenciais antimicrobianos contra patógenos emergentes.

Isso faz necessário identificar e caracterizar os fungos de ambiente marinho, assim como os Metabólitos secundários (MSs) e outros produtos naturais que eles sintetizam, com o objetivo de entender e elucidar possíveis hipóteses sobre seus papéis nos ecossistemas marinhos e a utilidade para a humanidade principalmente no controle de patologias de alto impacto, sendo fundamental elucidar os

mecanismos de ação e determinar o controle dos fatores de virulência sobre patógenos emergentes que estes MSs de fungos marinhos apresentam.

Diante do potencial biotecnológicos de produtos naturais, principalmente MSs de fungos marinhos, e da necessidade de explorar as capacidades de sínteses de novas moléculas com ação antimicrobiana, este estudo teve como objetivo: I) Determinar o potencial antimicrobiano de fungos filamentosos associados a corais e esponjas de dois pontos na região Nordeste de Brasil, presentes na micoteca do Laboratório de Diversidade e Biotecnologia Microbiana, da Universidade Federal de Alagoas (LDMB-UFAL). II) Avaliar a produção de MSs produzidos por fungos marinhos selecionados, assim como a realização da anotação/identificação dos mesmos por meio de técnicas químicas analíticas. III) Elucidar os potenciais mecanismos de ação e controle dos fatores de virulência dos MSs de fungos marinhos como controle de patógenos emergentes fúngicos e bacterianos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Ecologia e diversidade do ambiente marinho: perspectivas e realidade

Os oceanos estão submetidos a uma intrincada gama de fatores abióticos como temperatura, salinidade, pressões hidrostáticas, pH, que por sua vez modulam as comunidades existentes neste ambiente (Earp; Liconti, 2020; Feng *et al.*, 2022; Mohamed *et al.*, 2023). Este ecossistema tem um ambiente dinâmico, caracterizado por ser um importante reservatório de diversidade única, marcando por um forte impacto da atividade antrópica. Um total de 12 das 15 metrópoles na terra são costeiras, o que mostra um crescimento demográfico nestas porções continentais (duplicado nos últimos 50 anos), levando consigo uma desenfreada demanda em termos de agricultura, indústrias e tecnologias (Ramírez-Rendón *et al.*, 2022; Visbeck, 2018). Não é estranho então, que um total de 40% da população global está concentrada em áreas dentro de 200 km próximos ao oceano, o que tem

impactado cada vez mais estes ambientes de forma local e global, gerando uma degradação do ambiente marinho, particularmente nas regiões costeiras (Hatje *et al.*, 2021; Ramírez-Rendón *et al.*, 2022; Visbeck, 2018).

Os impactos gerados pelas atividades antropogênicas como a eutrofização e a superexploração dos recursos marinhos e costeiros, têm sido relatados com preocupação na literatura científica nas últimas décadas, focalizadas em grande parte no lançamento e pela presença de metais-traço (ex. chumbo – Pb, zinco – Zn, cobre – Cu e mercúrio – Hg) (Hatje *et al.*, 2021; Visbeck, 2018), que são amplamente usados em processos industriais e descartados de forma inadequada, os quais tem difícil ou nula degradação como são os pesticidas, compostos bromados e organofosforados, que têm se mostrado substâncias ou subprodutos, potencializando a contaminação dos ecossistemas costeiros e de mar aberto (Hatje *et al.*, 2021; Ramírez-Rendón *et al.*, 2022; Visbeck, 2018).

Muitos desses poluentes, têm mostrado impactos profundos e exacerbados por ciclos de feedback negativo no ambiente marinho, um deles é a presença de micro plásticos que atuam como veículos de bactérias patogênicas, genes de resistência antimicrobiana assim como inúmeros produtos químicos que têm atividade desreguladora do sistema endócrino e outros sistemas biológicos, os quais estão vinculados às redes alimentares (Hatje *et al.*, 2021; Lou *et al.*, 2023).

Por outro lado, os ecossistemas marinhos são considerados vitais para o funcionamento dos seus pares continentais, já que suportam a vida e fornecem inúmeros serviços ecossistêmicos, regulando o clima, armazenando dióxido de carbono e absorvendo a maior parte do excesso de calor das emissões de gases de efeito estufa (Earp; Liconti, 2020; Hattam *et al.*, 2015; Ramírez-Rendón *et al.*, 2022; Vanwonterghem; Webster, 2020). Na atualidade a ciência oceânica, têm promovido ferramentas e premissas voltadas para o desenvolvimento sustentável visando a proteção dos mares através de monitoramento contínuo voltado para a compreensão dos processos e inter-relações nos ecossistemas, favorecendo a

formulação de estratégias para a preservação ou conservação principalmente de recifes de corais (Ramírez-Rendón *et al.*, 2022; Visbeck, 2018).

No Brasil, os ecossistemas marinhos compreendem a maior zona litoral de um único país no mundo, com uma extensão de 8 mil km e uma área equivalente a 67% da porção continental do país, abrangendo regiões tropicais e temperadas, e hoje considerada a Amazônia azul (Ab´Saber, 2001; Wilke *et al.*, 2021). O país conta com um dos ecossistemas únicos de recifes de corais, onde se destacam o sistema de recifes na foz do rio Amazonas, o Grande Recife Amazônico (GARS), abrigando comunidades de macro e micro-organismos, que por meio de suas interações promovem a manutenção do equilíbrio desses ecossistemas (Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022), e que por sua vez é ameaçado por ser uma região de importância para exploração de petróleo e gás na região determinada como Zona Econômica Exclusiva (ZEE) (Banha *et al.*, 2022; de Mahiques *et al.*, 2019).

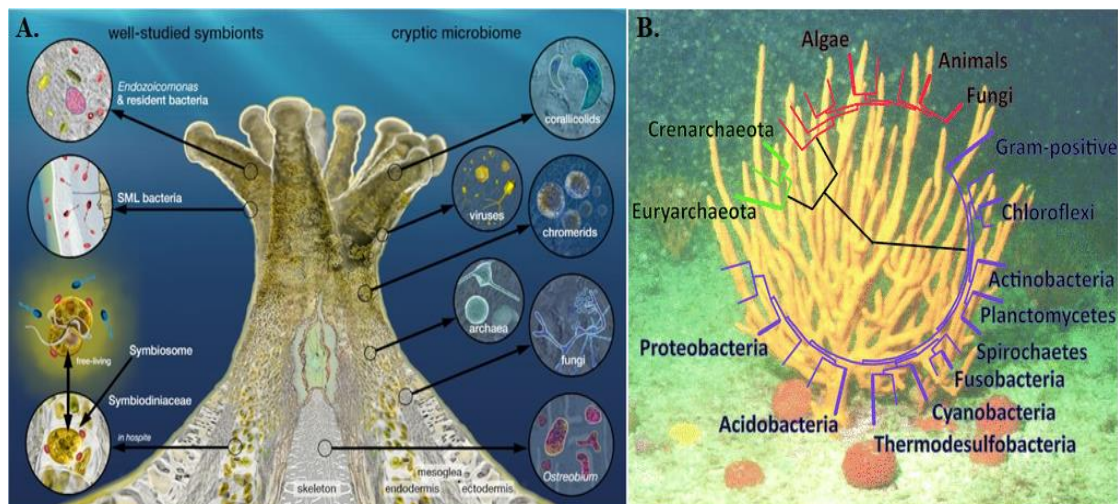
3.2. O Holobionte: associações entre o hospedeiro animal e sua microbiota

Um dos ecossistemas marinhos que estão sendo mais afetados pelas atividades antrópicas e os ciclos na terra são os recifes de corais, os quais são muito mais sensíveis às mudanças de temperatura e químicas nos oceanos (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2017; <https://www.epa.gov/coral-reefs/threats-coral-reefs>). Recifes de coral se caracterizam por concentrar a maior biodiversidade estudada no ambiente marinho. Estima-se que acolhem uma diversidade biológica associada próxima a nove milhões de espécies, o que corresponde a cerca de 25% da diversidade do ambiente marinho, constituindo-se, desta maneira, num dos ecossistemas mais diversos na Terra (Earp; Liconti, 2020; Shabana *et al.*, 2021; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2017; Vanwonderghem; Webster, 2020).

Os recifes de corais ocupam 0,1% da superfície oceânica do mundo, e funcionam como fonte primária na obtenção de recursos, tanto para espécies

marinhas como para o homem. Atuam como uma intrincada teia alimentar que sustenta diversos invertebrados marinhos como, esponjas, corais entre outros que funcionam como hospedeiros de uma ampla gama de micro-organismos (microbioma simbiótico) (Li, 2019). Estas associações constituem o que é chamado de “Holobionte” (Figura 1).

Figura 1. Microbioma nos tecidos dos corais (A) e esponjas (B). O microbioma associado ao coral e esponjas é distribuído em tecidos e locais específicos dos invertebrados. As bactérias simbiotas mais estudadas, outros grupos como arqueias, vírus, algas e fungos, também estão presentes e envolvidos em diversos processos fisiológicos. (Fonte: Mohamed *et al.*, 2023 (A); Trewick; Morgan, 2016 (B)).



O potencial papel dos micro-organismos associados aos benefícios à saúde dos corais é recentemente estudado (Peixoto *et al.*, 2017). Principalmente porque a microbiota conta com a capacidade de estabelecer associações no coral, como as que acontecem entre planta-fungo do solo (micorrizas), além disso, participam de interações no holobionte, entre as quais destacam-se a capacidade de fornecer substâncias úteis para o coral, assim como a inibição de possíveis competidores e patógenos, o que promove seu papel benéfico na melhora da aptidão do coral (Mohamed *et al.*, 2023; Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022; Thompson *et al.*, 2015).

Partindo da premissa que comunidades microbianas distintas podem colonizar vários microhabitats do coral, como a camada superficial de mucopolissacarídeo, tecido do coral, cavidade gastrovascular e esqueleto do coral, assim como as diversas estruturas nas esponjas (**Figura 1**), pode se estabelecer que estas comunidades participam ativamente da manutenção do holobionte exercendo funções únicas, agrupadas e complexas (Mohamed *et al.*, 2023). Por outro lado, existe uma porção dessa microbiota do holobionte que é como a base de micro-organismos no hospedeiro (*core microbiome*), que promove ativamente a estabilidade do holobionte contra às perturbações bióticas e abióticas (Peixoto *et al.*, 2017; 2019; Sweet; Bulling, 2017).

O holobionte de coral pode ser definido como uma associação na qual participa o hospedeiro animal e sua microbiota associada (microalgas simbióticas, bactérias, vírus, arqueias e fungos) (de Mahiques *et al.*, 2019; Lajeunesse *et al.*, 2018). As relações ecológicas do holobionte têm sido foco de estudo na última década, e a mais característica ocorre entre corais e algas fotossintéticas (zooxantelas) pertencentes à família Symbiodiniaceae, uma associação simbiótica obrigatória principalmente para o invertebrado (Li, 2019). A inter-relação é atribuída a uma associação coevolutiva onde o simbiote disponibiliza mais de 90% dos requerimentos nutricionais básicos ao coral, além de fornecer matéria-prima e substâncias necessárias para o hospedeiro no holobionte (Ameen *et al.*, 2021; Li, 2019; Mohamed *et al.*, 2023),

Os micro-organismos também podem participar do microbiota patogênica do coral (patobioma), afetando a saúde e gerando um desequilíbrio dos processos fisiológicos, e em casos extremos levando a morte do coral (Mohamed *et al.*, 2023; Sweet; Bulling, 2017). O microbioma representa uma parte substancial da biomassa do hospedeiro, o que vai depender principalmente do tipo de invertebrado, e no caso de esponjas, a comunidade microbiana chega a representar aproximadamente 60% da biomassa do holobionte.

Diversos autores ressaltam que para corais é menor, mas a proporção do microbioma é maior no tecido mole em relação à biomassa total, no entanto pode chegar a ser a proporção maior do material vivo num coral (Boschh; Miller, 2016; de Mahiques *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2017). Estas relações no holobionte contribuem como a maquinaria biossintética do microbioma (metabólitos primários e secundários), os quais estão envolvidos na nutrição, na defesa química do hospedeiro (químioecologia), na regulação, na redução e disponibilização de substâncias que podem ser prejudiciais ou necessárias para à associação, até cumprir funções de facilitadores para a colonização de outros organismos (Orlić, 2019; Patel; Kumar; Haldar, 2021; van de Water., 2022).

Além disso, os hospedeiros cumprem papéis como agentes seletivos, contribuindo nos processos evolutivos da síntese destas substâncias. Alguns testes realizados *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que metabólitos secundários geralmente funcionam como defesas contra competidores, e mostram uma diminuição de ataques de patógenos, promovendo processos reprodutivos na atração de gametas, porém, essas funções são menos investigadas. Recentemente tem-se avaliado a aplicação de consórcios bacterianos que regulam as disbiose do coral e potencializa a fisiologia do hospedeiro, sendo promissor para a manutenção da saúde do coral (Hay, 1996; Raghukumar; Ravindran, 2012; Teplitski *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2012).

A microbiota autotrófica dos invertebrados marinhos participa de diversas funções, entre elas, a produção de compostos sulfurados relacionados ao dimetilsulfoniopropionato – DMSP – e o dimetilsulfito – DMS, presentes em diferentes processos no holobionte, como a osmoproteção, atividade antioxidante e controle antimicrobiano nos tecidos coralíneos. Além disso, atuam como sinalizadores moleculares, servindo como atrativos para peixes herbívoros, contribuindo assim com o controle de macroalgas nos recifes de corais (Mohamed *et al.*, 2023; Puglisi *et al.*, 2020; Zilberberg *et al.*, 2016).

Porém, o conhecimento das funções específicas na associação invertebrado-microbioma ainda não está bem compreendido, principalmente no que diz respeito ao papel do microbioma do coral nas funções críticas que avaliam a resiliência do ecossistema (Bellwood *et al.*, 2019; Morrow; Pankey; Lesser, 2022). Um dos alvos dos estudos é a importância desse microbioma no branqueamento dos corais, disbioses considerada multifatorial, entre eles a presença de um patobioma e fatores abióticos que funcionam como gatilho para o desenvolvimento das mesmas (Mohamed *et al.*, 2023; Sweet; Bulling, 2017, Sweet *et al.*, 2019; Zilberberg *et al.*, 2016), e quando estas alterações não podem ser controladas pelo holobionte, as zooxantelas são “expulsas” do invertebrado inviabilizando sua sobrevivência, promovendo o branqueamento do coral (Boschh; Miller, 2016; Stal; Cretoiu, 2022).

Algumas hipóteses sobre o rompimento da relação coral-zooxantelas têm sido avaliadas e uma delas é atribuída às mudanças na temperatura e na química do oceano, promovendo a saída das zooxantelas facilitando a colonização por patógenos (Boschh; Miller, 2016). Por outro lado, estes eventos desencadeiam danos, principalmente nos componentes do sistema fotossintético II (PSII) ou na redução excessiva de carregadores de elétrons, induzindo danos oxidativos nas proteínas fotossintéticas (Boschh; Miller, 2016; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2017). Uma segunda está relacionada ao papel de bactérias do gênero *Vibrio* spp., associado à capacidade que estes micro-organismo têm de hidrolisar o muco do coral, atividade que é potencializada sob temperaturas elevadas (Pollock *et al.*, 2011), levando assim à infecção e ao consequente branqueamento do coral (Boschh; Miller, 2016; Moriarty *et al.*, 2020 Thompson *et al.*, 2001; Teplitski *et al.*, 2016).

3.3. Fungos: evolução, diversidade e seu papel no ambiente marinho

3.3.1 Evolução e classificação de fungos marinhos

A história evolutiva das espécies atuais de fungos data do Triássico-Jurássico, onde houve os grandes eventos que afetaram a biodiversidade da Terra,

extinguindo-a em aproximadamente 70% (Phukhamsakda *et al.*, 2022). Eventos subsequentes de desintegração da placa Pangea e a fusão continental no Jurássico Médio e no Cretáceo Inferior, respectivamente, e finalmente do Cretáceo ao Cenozóico com a formação do supercontinente levaram ao evento de especiação independente dos táxons de fungos modernos (**Figura 2 e 3**) (Peace *et al.*, 2020; Phukhamsakda *et al.*, 2022).

Figura 2. Filogenia ressaltando os diferentes grupos taxonômicos do reino fungi (Fonte: Li *et al.*, 2021)

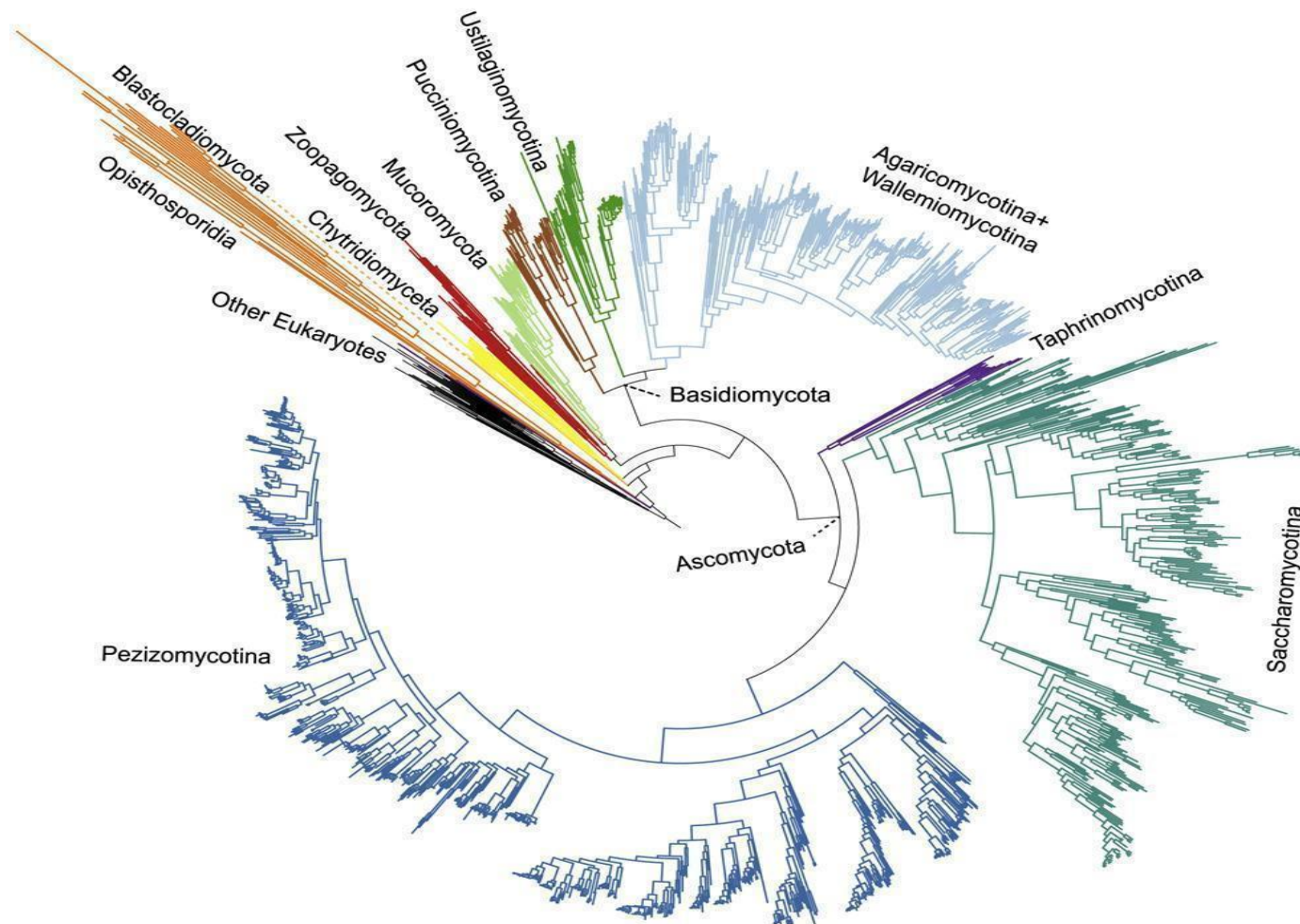
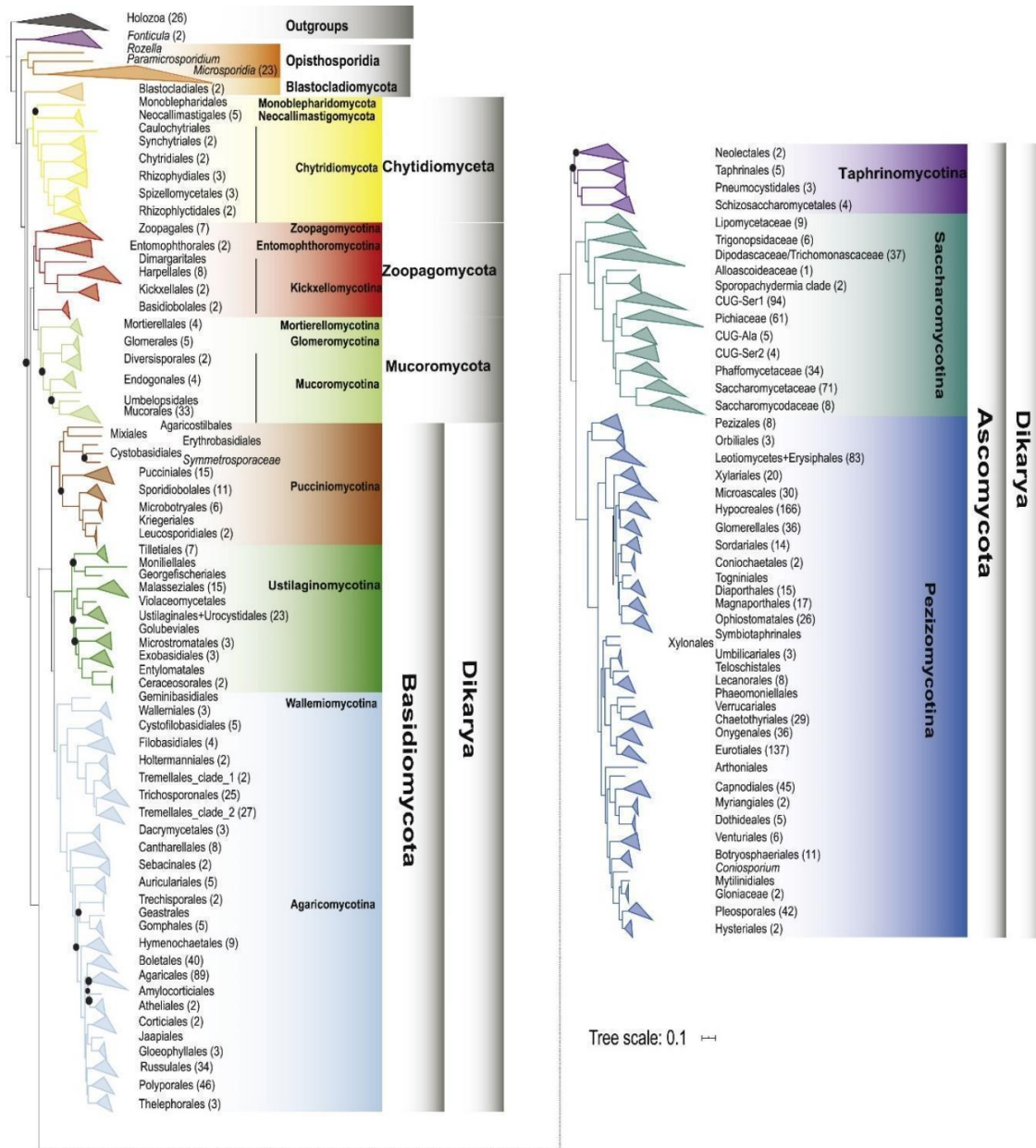


Figura 3. Relações filogenéticas em escala genômica de 1.644 espécies considerando a diversidade de fungos (Fonte: Li *et al.*, 2021)



Em relação ao ambiente marinho, existem registros fósseis que indicam que a diversidade fúngica neste ambiente, já foi mais significativa no passado do que na sua contraparte continental, no entanto, apenas 16% das espécies descritas hoje correspondem ao ambiente marinho (Costello; Chaudhary, 2017). Porém, a origem dos fungos no ambiente marinho ainda é hipotética, sendo que as primeiras datações colocam sua evolução na parte final do Proterozóico (900-570 milhões de anos atrás - mya) (Gonçalves; Esteves; Alves, 2022). Mais recentemente, Bengston *et al.* (2017) encontraram fósseis filamentosos em vesículas e fraturas em um basalto de 2,4 bilhões de anos na África do Sul. Nessas formações, as estruturas miceliais são ramificadas e anastomosadas, sendo atribuídas a fungos com base nas semelhanças quimiomorfológicas com os fungos atuais, propondo assim este como o registro fóssil fúngico mais antigo, sugerindo que fungos habitam em ambientes submarinos à aproximadamente 2400 milhões de anos.

Os fungos se posicionam como o segundo grupo mais biodiverso depois dos insetos (Wu *et al.*, 2019). Em relação à diversidade de fungos, as diferentes abordagens usadas para a estimativa desta determinam que o número aproximado de espécies de fungos está entre 2 - 13,2 milhões (Hawksworth; Lücking, 2017; Jones *et al.*, 2019; Lücking *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019). Na atualidade, uma reduzida porcentagem dessa diversidade está formalmente descrita (168.811 espécies) (<http://www.speciesfungorum.org/>; 13 de agosto de 2023), e se prevê que seja ainda maior, principalmente quando estudos sejam realizados usando através de estratégias de metabarcoding (Baldrian *et al.*, 2022; Tedersoo *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2019).

Estimativas apontam que pouco mais de 1% dos fungos descritos são derivados do ambiente marinho. Jones *et al.* (2019), listaram 1.257 espécies no site www.marinefungi.org e se tem estimado que a riqueza de espécies poderia chegar a ser de 10.000 (Jones; Pang, 2012). No entanto, outras estimativas mais ambiciosas chegam a avaliar essa diversidade ainda não conhecida, em até um milhão de espécies (Jeewon *et al.*, 2019). Calabon *et al.* (2023), atualizaram a

diversidade documentada de fungos marinhos conhecidos para 1898 espécies relatadas em todo o mundo, as quais estão distribuídas em nove filos, 33 classes, 107 ordens, 273 famílias e 767 gêneros (**Tabela 1**). Durante as associações entre fungos e recifes de coral, estes podem se apresentar como endófitos, endobiontes, saprotróficos e patógenos, e dentro das características dos fungos marinhos (micoplâncton) está a particular resposta que têm às mudanças ambientais e em outros casos à poluição (Ainsworth; Fordyce; Camp, 2017; Paulino; Félix; Landell, 2020; Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022; Tarman, 2020).

Tabela 1. Grupos e números de fungos marinhos, destacam a predominância do subfilo Ascomycota em todos os habitats ecológicos estudados. Por outro lado, os microsporídios são o grupo dominante de fungos marinhos parasitas de animais marinhos (Adaptado de Calabon *et al.*, 2023).

Filo	Espécies	Gênero	Família	Ordem	Classe
<i>Ascomycota</i>	1.561*	590	176	63	10
<i>Basidiomycota</i>	158	86	49	27	10
<i>Microsporídios</i>	128	56	26	7	3
<i>Chytridiomycota</i>	29	18	12	5	5
<i>Mucoromycota</i>	17	12	6	1	1
<i>Olpidiomycota</i>	2	2	1	1	1
<i>Afelidiomycota</i>	1	1	1	1	1
<i>Blastocladiomycota</i>	1	1	1	1	1
<i>Mortierellomycota</i>	1	1	1	1	1
Total	1898	767	273	107	33

*Número de espécies descritas

Ascomycota e *Basidiomycota* (Dikaria) constituem os subfilos mais representativos do reino fungi em ambiente marinho, com 1719 espécies associadas, constituindo a maior porcentagem de espécies reportadas para este ambiente (Calabon *et al.*, 2023). O primeiro relato de um fungo marinho foi o ascomiceto *Phaeosphaeria typharum*, descrito por Desmazieres, 1849 como marinho facultativo obtido a partir da planta pantanosa *Typha* (Vargas-Gastélum;

Riquelme, 2020). A origem dos fungos marinhos tem sido relatada como o produto de vastas migrações independentes do ambiente terrestre e de água doce para o ambiente marinho (Raghukumar, 2017). Por outro lado, a classificação de fungos marinhos até pouco tempo esteve baseada principalmente por fatores ecológicos e não taxonômicos (Jones, 2011).

Jones *et al.* (2019) publicaram uma das últimas listas de verificação dos fungos marinhos destacando a descoberta de novas táxons, o que foi conseguido pelo aumento das amostragens em locais ainda inexplorados incluindo diversos substratos como algas, ervas marinhas, água do mar, registros rochosos e do leito marinho, assim como a utilização de novas abordagens taxonômicas não tradicionais como o sequenciamento de terminação de cadeia didesoxi de Sanger, sequenciamento de alto rendimento (HTS), plataformas 454-Pyrosequencing e Illumina (Calabon *et al.*, 2023), assim como estudos filogenéticos baseados em análise multigênica permitiram avanços no conhecimento da diversidade de fungos no ambiente marinho alcançando o número de 1898 espécies (Calabon *et al.*, 2023; Jones *et al.*, 2019).

A diversidade de fungos no mar tem sido relatada após um dos primeiros trabalhos sobre a riqueza de fungos associados a diferentes corais em 1982 por Kendrick e colaboradores onde destacaram espécies relacionadas aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Hormonema* e demais gêneros representativos. O número de trabalhos com enfoque em fungos associados a invertebrados marinhos (corais, esponjas e outros) obtidos a partir de diferentes técnicas (cultiváveis e não cultiváveis) tem aumentado drasticamente, favorecendo o conhecimento da diversidade de fungos associados a estes organismos (Raghukumar; Ravindran, 2012).

O estudo da diversidade de fungos marinhos no Brasil segundo Berlink *et al.* (2004), começou na década de 70 nos trabalhos de Booth e colaboradores, onde avaliaram diversos ambientes, isolando fungos de diferentes nichos. Este primeiro

foi seguido pelos trabalhos de Sarquis e colaboradores nos anos 90, onde avaliaram a diversidade do solo arenoso nas praias de Ipanema reportando uma riqueza de 17 espécies de fungos filamentosos principalmente associados aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* e *Cladosporium*. Outros substratos também têm sido explorados como algas marinhas (Menezes *et al.*, 2010), esponjas marinhas (*Geodia corticostylifera* e *Chelonaplysilla erecta*) (Ortega *et al.*, 2011; Kossuga *et al.*, 2013) e manguezais (Ghizelini *et al.*, 2012; 2019).

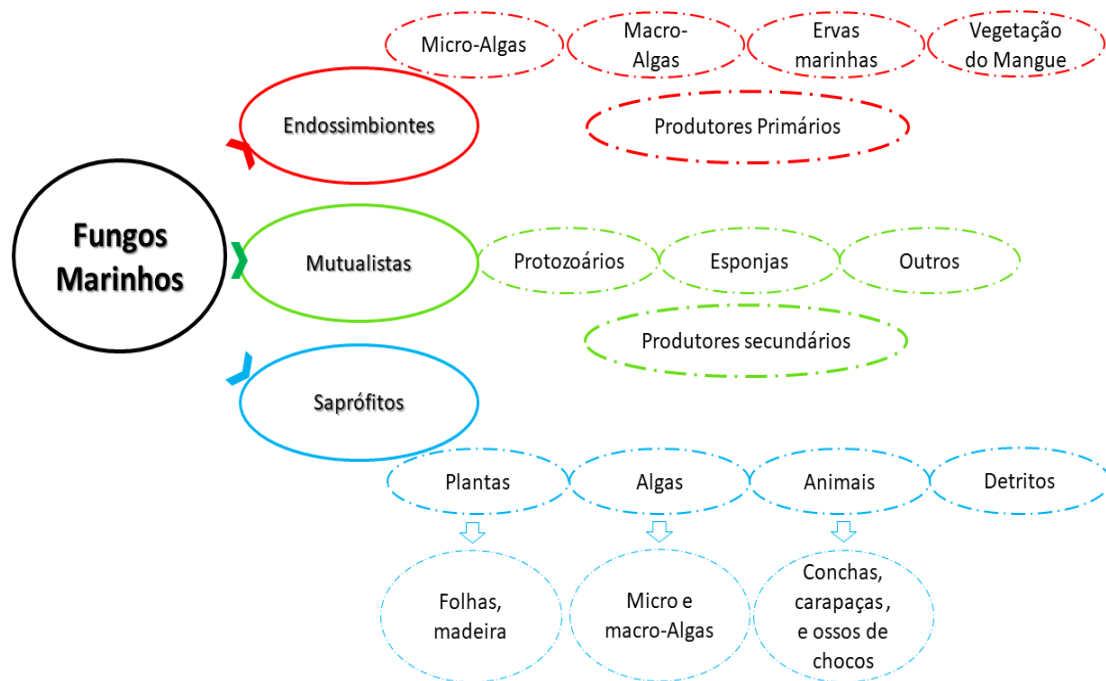
No trabalho de Paulino *et al.* (2020) foi avaliada a riqueza de fungos filamentosos associados a recifes de coral do nordeste do Brasil, obtendo um total de 43 espécies todas elas relacionadas ao filo *Ascomycota*, sendo espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Cladosporium* encontradas nos diferentes hospedeiros amostrados. Também foi determinado que as comunidades de fungos, apresentaram uma dissimilaridade de 73% nos pontos amostrados, apontando uma possível causa da baixa similaridade às condições abióticas de cada local e evidenciando uma diversidade relevante levando em consideração os pontos estudados.

3.3.2 Ecologia dos fungos marinhos

Diversos nichos no ambiente marinho são fontes de representantes do Reino Fungi. Nestes ambientes prosperam participando principalmente por meio da produção e elaboração de enzimas extracelulares e outros metabólitos que participam nos processos ecológicos no ecossistema marinho, assim como a produção de biomassa (Behera; Das, 2023; Phukhamsakda *et al.*, 2022). Além disso, a já mencionada capacidade de realizar associações simbióticas, assim como a participação na formação de biofilme, lhes proporcionam maior capacidade para se estabelecer sobre o substrato sésil oferecendo uma maior estabilidade,

promovendo o equilíbrio nutricional e mecanismos de defesa (Behera; Das, 2023) (Figura 4).

Figura 4. Esquema demonstrando as interações ecológicas dos fungos marinhos com os diferentes substratos orgânicos (Adaptado de Jones *et al.*, 2019).



Dados reportados na literatura mostram que existe uma alta diversidade de fungos associados a invertebrados marinhos, e junto a isso, uma significativa heterogeneidade na composição destas comunidades. No entanto, existem fungos de ampla distribuição que se encontram associados à microbiota de diversos corais de ambientes e regiões diferentes (Blunt *et al.*, 2009; Liao; Xiao; Li, 2019; Yarden, 2014; Zhang *et al.*, 2019b), sugerindo que existem micobiotas permanentes para alguns recifes de corais e outros amplamente transientes.

No trabalho de Raghukumar, (2017) destaca-se que só a partir da década de 80 houve um interesse pela presença relevante de fungos em ecossistemas de recifes de corais. Nas últimas décadas, fungos vem ganhando importância tanto pelo conhecimento de sua diversidade em ecossistemas, assim como na elucidação

dos papéis importantes nas interações com os seus hospedeiros e o ambiente, não somente como facilitadores na obtenção de recursos por ser este um ambiente oligotrófico, mas também na defesa através da produção de moléculas bioativas (Hayashi *et al.*, 2016; Lini *et al.*, 2020; Orlic, 2019; Sen *et al.*, 2022).

Estudos de caso mostraram, por exemplo, que no coral *Porites astreoides* há predominância de fungos filamentosos, atribuído a estes um papel positivo na ciclagem de nitrogênio. Esta atividade é considerada benéfica para o coral, já que os habitats nos quais estes geralmente se encontram são oligotróficos com baixas concentrações de nitrogênio (Raghukumar, 2017). Do mesmo modo têm-se relatos de que fungos participam na clivagem DMSP e DMS produzidos pelos corais, já que contam com a maquinaria genética que permite-lhes sintetizar enzimas úteis para esta função, o que visa sua atividade como prioritárias no holobionte (Narchi; Price, 2015; Zhang *et al.*, 2019a). No entanto, muitos destes papéis ainda estão sob pesquisa com o objetivo de compreender melhor a funcionalidade no ecossistema coralino.

Fungos marinhos podem produzir espécies reativas do oxigênio (EROs) por meio de radicais hidroxila ou mediante a liberação de oxigênio e peróxido, seguidas de uma atividade enzimática ligninolítica (biocatálise) (Grossart; Rojas-Jimenez, 2016). Isto causa oxidação inespecífica e hidrólise de ácido húmico e outros poluentes poliméricos, com uma posterior atividade antibacteriana de mineralização, diminuindo o impacto da poluição nos ambientes coralinos (Grossart; Rojas-Jimenez, 2016; Oren; Gunde-Cimerman, 2007).

Outro papel dos fungos é produção de aminoácidos do tipo micosporina (MAA) (Pathak *et al.*, 2019). Estes compostos (pigmentos) são reconhecidos por participar na fotoproteção de diversos organismos (Raghukumar, 2017). Uma das primeiras moléculas bioativas do tipo metabólito secundário obtido de fungos marinhos foi a cefalosporina C, produzida por uma linhagem de *Acremonium* sp., isolado de água coletada da costa da Sardenha na Itália (Lawrence *et al.*, 1998). Nas últimas seis

décadas a 'micotecnologia' ou biotecnologia fúngica tem alcançado importantes avanços na obtenção, descrição e aplicação de produtos naturais (Bovio *et al.*, 2019; Raghukumar, 2008; Zilberberg *et al.*, 2016).

Do ponto de vista da quimioecologia marinha, os PNMMs obtidos de fungos cumprem um importante papel na regulação das interações químicas entre organismos marinhos (Bovio *et al.*, 2019; Gerwick; Fenner, 2013; Raghukumar, 2017). Por outro lado, diversos fungos de origem marinha estão associados a produção de produtos naturais como: alcalóides, ciclo tetrapeptídeos, diterpenos, hexapeptídeos, lactonas, que tem sido usado na indústria farmacêutica em aplicações para componentes anticâncer, atividade contra linhagens celulares de câncer humano, inibidores do vírus herpes simplex, atividade antiparasitária, antiviral, antifúngica, entre outras atividades (Bovio *et al.*, 2019; Raghukumar, 2008). Além de serem utilizados na produção de várias enzimas extracelulares, ácidos orgânicos, antibióticos, todos estes produtos têm amplas aplicações no campo da farmacologia, indústria e agricultura (Gladfelter; James; Amend, 2019; Hasan *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2016).

Estes PNMMs de origem fúngica, têm se mostrado importantes, apresentando propriedades estimulantes do crescimento celular que podem ser úteis em estudos sobre cicatrização de feridas (Hasan *et al.*, 2015). Para o ano 1992, tinham sido descritos 15 metabólitos fúngicos marinhos, dez anos depois o número passou a ser de 270, já para o ano 2011 o número de produtos naturais obtidos de fungos de ambiente marinho chegou aproximadamente aos 700 (Petersen; Kellermann; Schupp, 2020). Bovio *et al.* (2019) relataram a descrição de 1277 novos produtos naturais com aplicações biomédicas promissoras de acordo com suas estruturas e potenciais biológicos.

A produção de PNMMs por fungos marinhos, têm sido avaliada em escala ecológica e segurança farmacológica através do modelo de microescala com zebrafish (*Danio rerio*) (Hoeksma *et al.*, 2019; Ragavendran *et al.*, 2019). Este é o

caso de moléculas como isoquinulina A, obtida a partir de *Nigrospora oryzae* e antraquinonas obtidas do fungo *alternaria* sp., os quais mostraram uma forte atividade citotóxica e alta letalidade e estimulação de mutações nos embriões de zebrafish (Bai *et al.*, 2016). Outros produtos relevantes e diversas funções têm sido associados aos fungos de ambiente marinho, como por exemplo, a partir dos fungos *Arthrinium arundinis* e *Aspergillus terreus* SCSGAF0162 obteve-se alcaloides com uma significativa atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens celulares de câncer (e.g. linhagens celulares de linfoma U937 e leucemia linfoblástica aguda MOLT-4) (Jin *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2019).

Do mesmo modo, o fungo *Lophiostoma* sp. ZJ-2008011 foi a fonte de antibióticos conhecidos como macrólídeos (3Z,4S,5S,6E,7S,8S,9S,10R)-8- cloro-5,8,9,10-tetra-hidro-5, 9-di-hidroxi-10-metil-2H-oxecin-2-ona, modiolídeo A, curvulidas B1 e B2 e curvulalida (Hou *et al.*, 2019). Jin *et al.* (2016) reportaram a produção de moléculas derivadas de lactonas produzidas por *Aspergillus terreus* SCSGAF0162, as quais apresentaram uma forte atividade de inibição contra a acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise de neurotransmissores. Além disso, foi detectada atividade antiviral destacada contra o vírus A (H1N1) pela linhagem de *Penicillium chrysogenum* PJX-17, fonte na obtenção de combinações de sorbicilenóides (Peng *et al.*, 2014).

Não obstante, o papel dos fungos não está sempre associado a benefícios. Algumas espécies como *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus versicolor* têm sido reportadas como causadoras de aspergilose, que acomete a corais dos gêneros *Gorgonia* spp. (coral mole) e *Annella* spp. (Pang *et al.*, 2021; Phongpaichit *et al.*, 2006; Rypien *et al.*, 2008). Esta doença se espalhou pelo Mar do Caribe na década de 1990 e mais recentemente pelo sudeste da Ásia (Raghukumar; Ravindran, 2012), *apud* (Smith *et al.*, 1996); (Zhang *et al.*, 2019a). No entanto, os fungos como *A. sydowii* e *A. versicolor* estão amplamente distribuídos em corais saudáveis, sugerindo que algumas das doenças dos corais atribuídas aos fungos podem na

realidade ter uma origem polimicrobiana e não necessariamente por uma única espécie fúngica, assim como a inter-relação destes com os fatores abióticos como a temperatura das águas nos recifes de corais (Pang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019a).

Alguns fungos marinhos são considerados patógenos oportunistas de outros animais marinhos, os quais vão colonizar e se proliferar nos corais, o que pode funcionar como um indicativo de declínio da saúde do hospedeiro (Ainsworth; Fordyce; Camp, 2017). Na revisão de literatura de Pang *et al.* (2021), sobre a patogenicidade de fungos em animais marinhos, 225 espécies de fungos foram reportados como causadoras de infecções em 193 espécies animais, onde *Microsporidia* foi destacou com aproximadamente 50%, seguido de *Ascomycota* com 37% das espécies. Para esponjas e corais, os trabalhos reportando casos de patogenicidade são relatados em menos de 0,5% (Pang *et al.* 2021).

Embora as pesquisas publicadas tenham se concentrado principalmente em um grupo de ascomicetos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, novos alvos filogenéticos de uma maior diversidade de hospedeiros e habitats estão aumentando constantemente, gerando novas fontes na descoberta de novos compostos com estruturas inéditas de alto potencial biológico (Gladfelter; James; Amend, 2019; Harikrishnan *et al.*, 2021; Petersen; Kellermann; Schupp, 2020; Puglisi *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2022).

Porém, a relação dos fungos marinhos no ecossistema e seus produtos está mais relacionada, à descoberta e isolamento de novos PNMMs incluindo metabólitos secundários com propriedades biológicas, que possam auxiliar na proteção contra patógenos oportunistas e outros patógenos na saúde humana e animal, assim como aplicações industriais e ecológicas de biorremediação (Gladfelter; James; Amend, 2019; Peixoto *et al.*, 2017; Raghukumar, 2017; Teplitzki *et al.*, 2016).

Desde a década dos 60 o professor Bernard Tursch realizou estudos com produtos naturais de ambiente marinho no Brasil, compostos como o colesterol foi amplamente encontrado em ouriço-do-mar, algas marinhas e invertebrados marinhos (Berlinck *et al.*, 2004). O Brasil apresenta uma diversidade biológica por toda sua faixa litorânea, uma das mais extensas no mundo, mas pouco explorada em termos biotecnológicos.

Os estudos realizados no ambiente marinho brasileiro vêm revelando uma diversificada classe de compostos químicos, no entanto, a busca por moléculas bioativas a partir de organismos marinhos prevê um grande número de substâncias desconhecidas, tornando a pesquisa em produtos naturais (PNs) de grande relevância, devido a necessidade de novos fármacos com eficácia terapêutica contra agentes infecciosos (Berlinck *et al.*, 2017; Newman *et al.*, 2020).

3.3.3 Quimiodiversidade de Produtos Naturais de Micro-organismos Marinhos (PNMMs): Fungos, além das suas rotas biossintéticas

Giddings e Newman (2015; 2019) descrevem os metabólitos secundários como moléculas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, sendo apresentadas por organismos biológicos específicos, ou, em grupos taxonômico com relações filogenéticas próximas. Cabe destacar que em décadas passadas, metabólitos secundários obtidos de ambientes marinhos foram atribuídos a invertebrados marinhos (Li, 2019; Orlic, 2019; Patel; Kumar; Haldar, 2017). Porém, atualmente sabe-se que micro-organismos simbiontes, como os fungos que podem sintetizar um grande número de moléculas a partir de rotas biossintéticas especializadas e adquiridas através de processos evolutivos complexos (Leal *et al.*, 2014; Patel; Kumar; Haldar, 2017).

3.3.3.1 Rotas biossintéticas de metabólitos secundários em fungos

Na maioria dos organismos, o metabolismo primário é geralmente compartilhado, e se caracteriza por serem moléculas que não estão diretamente

envolvidas em funções primárias, como as relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução de um organismo (Tarman, 2020). Em contrapartida, o metabolismo secundário e seus produtos são aqueles que estão potencialmente associados a processos como a defesa própria e de seu hospedeiro, a competição inter e intraespecífica e a comunicação (Tarman, 2020). Um exemplo disso pode ser a produção de pigmentos, compostos que controlam fatores de virulência com relevantes potenciais antimicrobianos, ou capacidade antioxidante, como é o caso de produtos obtidos de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *A. sydowii*, *Curvularia* sp., entre outros (Gonçalves; Esteves; Alves, 2022; Keller *et al.*, 2019).

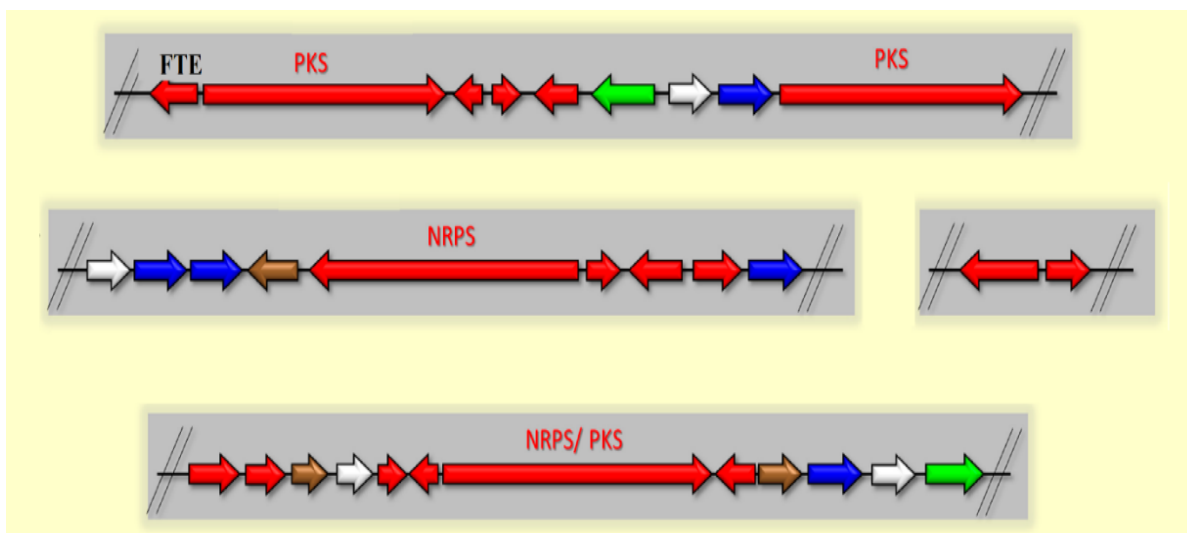
Os MSs têm mostrado uma tendência de distribuição filogenética ao longo de linhagens evolutivas mais relacionadas, uma vez que a produção dos MSs dos fungos marinhos é modulada ou corregulada, além dos genéticos, por múltiplos fatores, como os ecológicos que incidem na ativação e na diversificação de seus genes e agrupamentos gênicos (Bills; Gloer, 2016; Keller *et al.*, 2019).

Avanços tecnológicos, tem permitido um incremento considerável no número de sequências de genomas fúngicos favorecendo a mineração e associação de produtos naturais obtidos a partir destes organismos, isto também tem evidenciado que o potencial biossintético de fungos filamentosos ainda é subexplorado (Brakage *et al.*, 2011). Porém, estes genes necessários para a biossíntese de um metabólito secundário são organizados de forma contígua como um agrupamento de genes biossintéticos (do inglês *Biosynthetic gene clusters* - BGC), muitos deles recentemente descobertos através de ferramentas de bioinformática (Keller *et al.*, 2019). Alguns destes BGCs podem ser silenciados, suprimindo a codificação de enzimas catalíticas primárias, essenciais para a síntese dos MSs, o que leva a diversos efeitos, como alterações no crescimento vegetativo ou na esporulação, incidindo no desenvolvimento fúngico, dificultando a obtenção de parte do arsenal

metabólico dos fungos, principalmente em ambientes laboratoriais (Bills; Gloer, 2016).

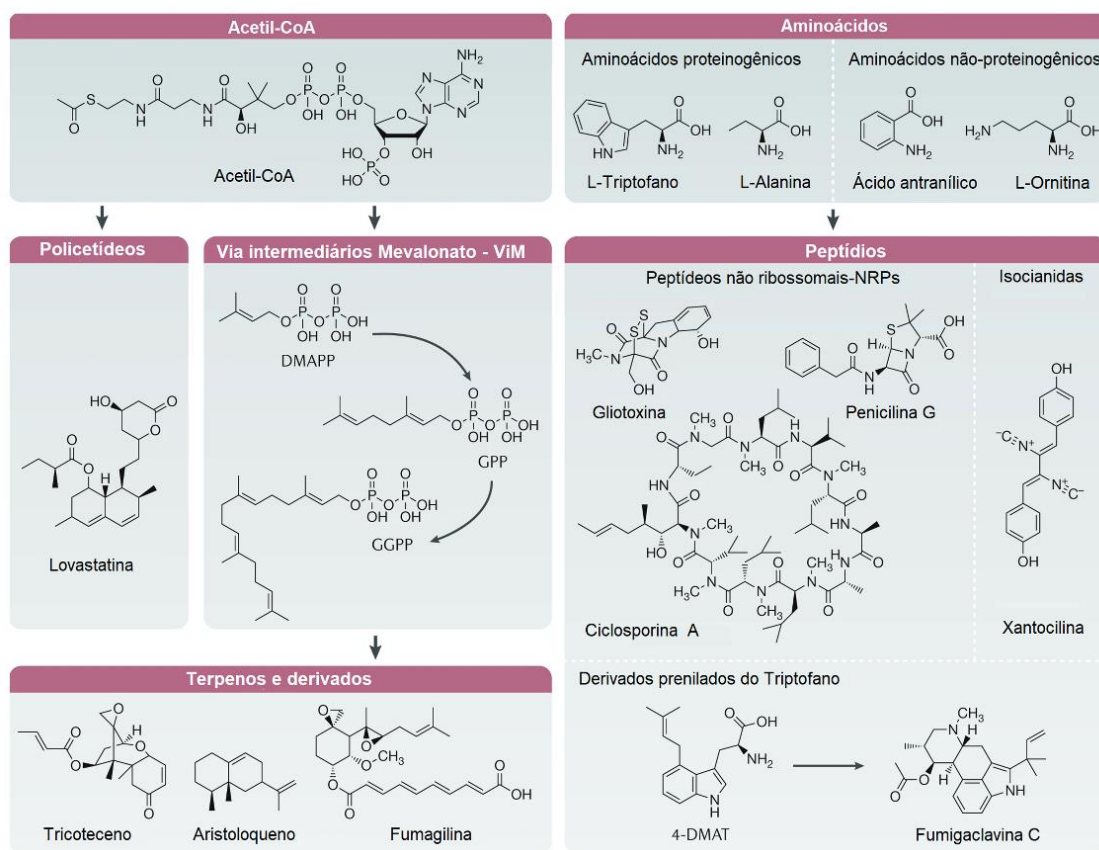
Os principais metabólitos secundários de fungos, os policetídeos (do inglês polyketides – PKs os policetídeos não ribossomais (do inglês Non Ribosomal peptides – NRPs) e os terpenos, são produzidos pela atividade dos BGCs. São constituídos primordialmente por uma enzima sintase e/ou sintetase que define o tipo de MSs a serem sintetizados (PKs sintase, NRPs sintetase, terpeno sintase e/ou ciclase, e isocianeto sintase), enzimas envolvidas na síntese que a partir de metabólitos primários estruturam esqueletos de carbonos modificados posteriormente por enzimas (por exemplo, metiltransferases, 450 monooxigenases, hidroxilases e epimerases) (Keller *et al.*, 2019). Outros mecanismos sobre a regulação dos BGCs, estão dadas por fatores de transcrição específicos do agrupamento, regulando outros genes dentro do BGC de forma positiva (Avalos; Limón, 2021; Keller *et al.*, 2019). Para exemplificar a constituição de um BGC, um esquema é apresentado na **figura 5**.

Figura 5. Exemplo de organização de agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) para a produção de metabólitos secundários (MSs) em fungos. As setas de cores representam os diferentes tipos de domínios que fazem parte da biossíntese dos PNMMs em fungos (Adaptado de Zhgun, 2023).



A biossíntese de metabólitos secundários de fungos filamentosos é dada a partir de blocos de construção inicial. Dois grandes precursores de MSs são o Acil-CoA e os aminoácidos, originando diversos esqueletos carbonados que são constituições estruturalmente particulares, o que vai depender dos genes envolvidos e das enzimas que participam na sua biossíntese (**Figura 6**) (Keller *et al.*, 2019).

Figura 6. As origens dos MSs podem ser agrupadas em três categorias químicas: policetídeos e terpenos derivados de Acil-CoAs, e pequenos peptídeos derivados de aminoácidos. O difosfato ou pirofosfato de dimetilalil (DMAPP); dimetilalil triptofano (DMAT); difosfato de geranylgeranyl (GPP); e difosfato de geranyl (GGPP) são intermediários em algumas rotas (Adaptado de Keller *et al.*, 2019).



O esquema anterior não contempla moléculas híbridas (policetídeo-terpeno, peptídeo não ribossômico-policetídeos e policetídeo-ácido graxo). Outras rotas biossintéticas, como as dos ácidos graxos, podem contribuir na biossíntese de MSs

(por exemplo, aflatoxina e esterigmatocistina são híbridos de ácidos graxos-policetídeos) (Avalos; Limón, 2021; Keller *et al.*, 2019). A biossíntese dos policetídeos tem como ponto de partida a atividade da policetídeo sintase (PKS), estas últimas categorizadas em três classes de acordo com suas estruturas e mecanismos utilizados: os tipos I, II e III (Avalos; Limón, 2021; Macheleidt *et al.*, 2015). As PKSs tipo I são encontradas em fungos, e constituídas como enzimas multifuncionais complexas estruturalmente, e relacionadas às sintases de ácidos graxos. As PKSs tipo III são enzimas homodiméricas menos abundantes em fungos, apresentando funções mais restritas e a diferença das PKSs tipo I, interagem diretamente com o Acil-CoA. Contudo, análises de anotação têm mostrado que as enzimas PKSs tipo II não estão presentes em fungos (Avalos; Limón, 2021).

Os NRPs são sintetizados pelas NRPs sintetases (NRPSs) através de um mecanismo não relacionado à síntese proteica no ribossomo (Keller *et al.*, 2019). Estas enzimas se organizam em módulos, apresentando vários domínios catalíticos com funcionamento coordenado (Keller *et al.*, 2019). Os tipos de NRPs estão relacionados aos tipos de domínios e às enzimas que os modificaram durante ou posteriormente à sua liberação, dada por uma reação cíclica de um domínio tioesterase presente na extremidade do carbono do complexo multienzimático (Avalos; Limón, 2021; Keller *et al.*, 2019; Süssmuth *et al.*, 2017). Além de conformar compostos mais complexos, as NRPSs podem participar na síntese junto com PKSs de MSs muito mais diversos estrutural e funcionalmente (Keller *et al.*, 2019).

Finalmente, os terpenos podem ser produzidos por duas vias biossintéticas diferentes, porém, só a via do mevalonato se encontra em fungos a qual é dada pela síntese do difosfato de isopentenila (IPP) a partir do mevalonato a través enzima redutase hidroximetil-glutaril CoA (Avalos; Limón, 2021). A síntese começa com a fusão do IPP com difosfato de dimetilalila (DMAPP), dando como resultado o difosfato de geranila 10-C (GPP) (**Figura 6**), precursor dos monoterpénoides. A adição de novos IPP produz 15-C difosfato de farnesila (FPP), que dá origem aos

sesquiterpenoides, e 20-C difosfato geranylgeranila, dando origem aos diterpenoides. Os triterpenoides são produzidos a partir da união de duas moléculas de FPP, e dois GGPP unidos dão origem aos tetraterpenoides (Avalos; Limón, 2021; Keller *et al.*, 2019; Macheleidt *et al.*, 2015).

Estas rotas biossintéticas promovidas pelos BGCs contam com diversos reguladores. A ativação transcricional e epigenética é dada por estímulos ambientais (luz, temperatura, pH), e depende do estágio de desenvolvimento do fungo (Avalos; Limón, 2021). Os BGCs podem ser influenciados por fatores nutricionais, modulados pela variação nas fontes de carbono e nitrogênio, disponibilidade de íons e presença de elementos halógenos (Zhgun, 2023).

Além disso, estratégias baseadas na cultura do fungo são usadas para modular e ativar rotas biossintéticas silenciadas, entre elas se encontra a OSMAC (do inglês *One Strain Many Compounds*), proposta por Bode *et al.* (2002). Por outro lado, as técnicas de co-cultura principalmente são usadas com bactérias. Outra maneira de regulação é a transcricional e, neste caso, estudos mostram estruturas que se apresentam como um circuito genético hierárquico, que apresenta reguladores específicos de agrupamentos gênicos. Acredita-se que aproximadamente metade dos BGCs fúngicos, contêm um fator de transcrição específico e em alguns casos apresentam mais de um (Avalos; Limón, 2021; Pillay *et al.*, 2022; Zhgun, 2023).

Além disso, tem-se comprovado que a maioria dos BGCs em fungos são crípticos sob certas condições. Avanços no sequenciamento de genomas e ferramentas de bioinformática têm permitido se fazer previsões do alto número de compostos que podem ser potencialmente sintetizados por fungos (Keller *et al.*, 2019). O uso de estratégias de expressão heteróloga e outras ferramentas moleculares têm mostrado ser funcionais na obtenção de MSs estruturalmente únicos através da regulação epigenética (Brakhage; Schroeckh, 2011; Han *et al.*, 2020; Kaari *et al.*, 2022; Lim *et al.*, 2020) Todos estes mecanismos permitem a biossíntese de PNMMs advindos de fungos.

3.3.3.2 Principais Produtos Naturais de Micro-organismos marinhos (PNMMs) em fungos

A quimiodiversidade e bioatividade de PNMMs é considerada fundamental na obtenção e descoberta de compostos (Voser; Campbell; Carroll, 2022). Até 2015, diversas pesquisas feitas a partir do ambiente marinho reportaram a descoberta de aproximadamente 16.000 a 20.000 produtos naturais amrinhos (PNMs) (Blunt *et al.*, 2009; Gerwick; Fenner, 2013; Hasan *et al.*, 2015; Kelecom, 2002; Waters *et al.*, 2010). Voser *et al.* (2022) mapearam os PNMs e compararam com os obtidos do ambiente terrestre (PNTs), avaliando a sua origem e identificando mais de 34 mil produtos de origem marinha, dos quais aproximadamente 30% correspondem como PNMMs (Figura 7 e 8).

Figura 7. Relação de PNs isolados de macro e micro-organismos, indicando o número total de cada grupo e as sobreposições e individualidades na obtenção de número de compostos. As porcentagens mostram a distribuição de cada grupo em cada ambiente, em vermelho o número de produtos obtidos de micro-organismos marinhos. (Adaptado de Voser; Campbell; Carroll, 2022).

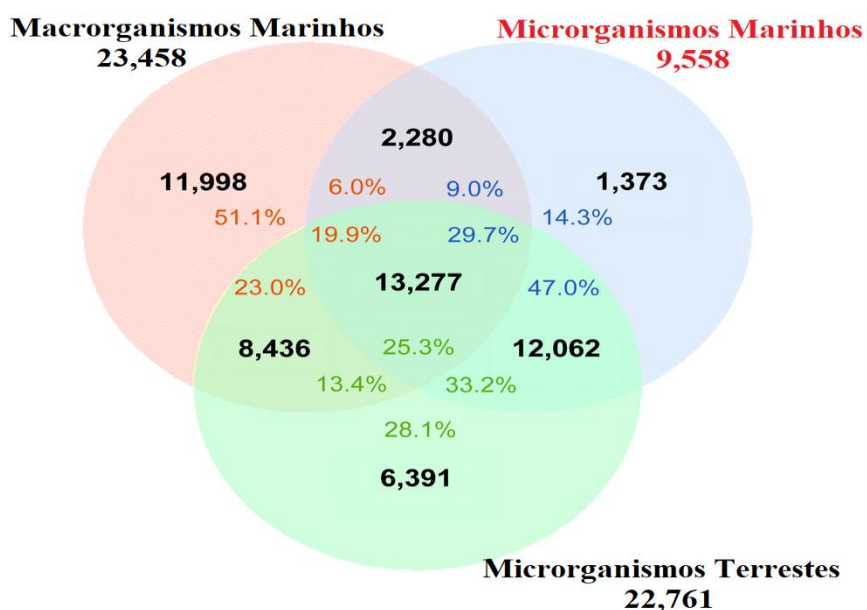
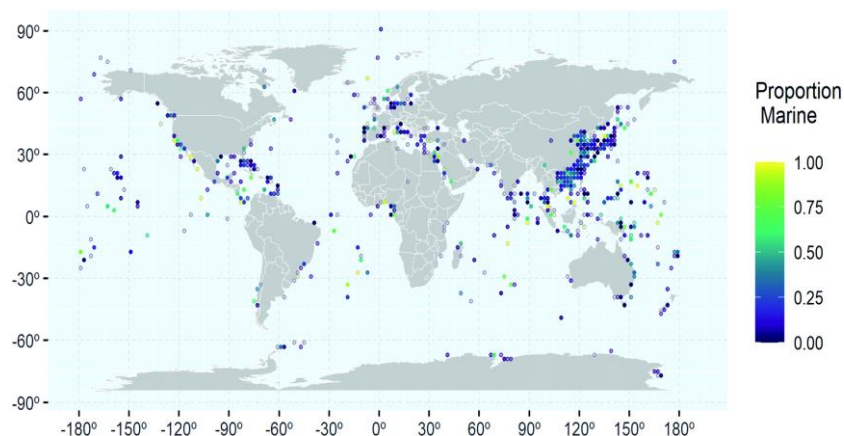


Figura 8. Mapeamento da distribuição de PNMMs. A escala de cor representa a proporção de PNMMs que são exclusivamente marinhos. Onde foram relacionados e isolados por linhagem em cada local de coleta, com os obtidos do total de PNMMs para o mesmo local (Fonte: Voser; Campbell; Carroll, 2022).



Voser *et al.* (2022) destacaram que as análises realizadas mostram que 76% de todos os PNMMs analisados apresentam as mesmas estruturas básicas (*scaffolds*) que os apresentados pelos organismos terrestre, deixando só 24% destes PNMMs produzidos por organismos de ambiente marinho como inéditos para este ambiente. Contudo, foi mostrado que existem diferenças nos PNMMs, já que apresentam mais átomos de nitrogênio e halogênios, principalmente bromo, e um menor número de átomos de oxigênio. Além disso, os PNMMs tendem a ser estruturalmente mais complexos (Voser; Campbell; Carroll, 2022). Já os terrestres, apresentam *scaffolds* de cadeias de menor longitude, com tipos e ligações mais estáveis em seus sistemas de anéis. (Shang *et al.*, 2018; Voser; Campbell; Carroll, 2022).

Os PNMMs de fungos são diversos, destacando os policetídeos como os mais predominantes, apresentando potenciais atividades biológicas (Stien, 2020; Tarman, 2020). Por exemplo, a partir do fungo marinho *Aspergillus* sp. CNC-139 foi obtido um composto base para a síntese da plinabulina (NPI-2358), único fármaco

de origem fúngica na fase III de estudos clínicos e sua atividade biológica está relacionada com o tratamento de câncer de pulmão (Yin *et al.*, 2022; <https://www.marinepharmacology.org/phase-3-drugs>). Metabólitos secundários de fungos marinhos estão distribuídos em sete grandes grupos (**Figura 9**), alguns deles, como visto anteriormente, compartilham rotas biossintéticas (policetídeos; peptídeos não ribossomais; terpenos; alcaloides, dicetopiperazinas, pigmentos entre outros).

Figura 9. Natureza biossintética dos PNMMs produzidos por fungos marinhos, destacando os policetídeos, terpenoides e dicetopiperazinas (Fonte: Kamat *et al.*, 2023; Autor).



O Brasil embora reconhecido como um país mega diverso, tem ainda muito potencial biotecnológico inexplorado. Porém, os estudos de quimiodiversidade marinha incluindo os fungos já têm perto de 30 anos. Os primeiros trabalhos contemplando a relevância dos PNMMs no país se remontam a Kelecom, (2002) e Berlinck *et al.* (2004), onde foram descritos por primeira vez, produtos naturais a partir do fungo marinho *Scolecobasidium arenarium* do qual foram isolados três dicetopiperazinas cyclo (Pro-Val), cyclo (Leu-Phe) e cyclo (Ile-Val), dando começo à exploração da quimiodiversidade em fungos marinhos no Brasil.

Por outro lado, Vita-Marques *et al.* (2008) avaliaram a diversidade e os produtos naturais de fungos isolados de vários substratos marinhos no estado de São Paulo, os quais apresentaram atividades antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos, assim como atividade citotóxica contra várias linhagens celulares de câncer, destacando também a produção e isolamento de ciclo depsipeptídeos a partir da espécie *Beauveria felina*.

Avanços recentes nas técnicas de elucidação de compostos, e esforços multidisciplinares têm levado à descoberta de vários metabólitos bioativos produzidos por fungos e outros micro-organismos derivados do mar no Brasil. Nos trabalhos de Ióca *et al.* (2014; 2018), foram realizadas análises exaustivas sobre os produtos naturais entre eles os obtidos de ambiente marinho no Brasil, destacando a obtenção de apenas 15 - 20% de PNMMs de um total de 280 compostos. Destacando como principais produtos, os policetídeos e aminoácidos que foram sintetizados pelos fungos *Penicillium raistrickii*, *Penicillium* sp. Ma (M3) V, *Trichoderma* sp. Gc (M2)1, *Penicillium citrinum* obtido de esponja e alga marinha, e finalmente *Penicillium oxalicum* isolado de sedimentos marinhos quem por sua vez foi produtor de uma mistura de terpenos e alcaloides (Ióca *et al.*, 2014; 2018).

Outros trabalhos com fungos marinhos realizados no Brasil têm mostrado o potencial existente no país na produção de diversas moléculas com potenciais como antimicrobianos, com potencial entomopatogênico, anticâncer, inibidor de biofilme, potencial citotóxico, anti-*Trichomonas vaginalis*, antiplasmodial (da Costa Souza *et al.*, 2016; de Amorim *et al.*, 2023; Edres *et al.*, 2022; Felício *et al.*, 2015; Loges *et al.*, 2020; Saravia *et al.*, 2015; Scopel *et al.*, 2017; Wilke *et al.*, 2021).

I. Policetídeos (PKs) e Policetídeos não ribossomais (NRPs)

As funções ecológicas dos PKs e NRPs produzidos por fungos marinhos estão relacionados com atividades de defesa do hospedeiro e funções ecológicas de interação com outros macro e micro-organismos (Blunt *et al.*, 2009; Carroll *et al.*,

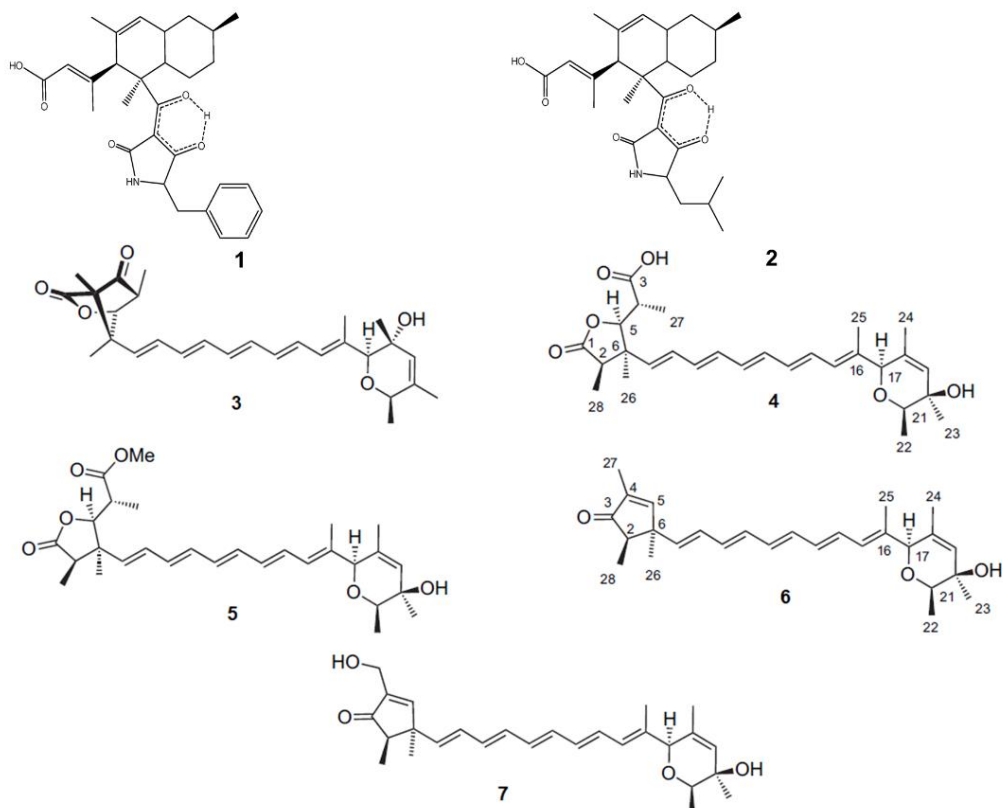
2023; Zhou *et al.*, 2011). Estes compostos contam com relatos de atividades anti-plasmoidal, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer, controladores de fatores de virulência e potencializador de outros antibacterianos, sendo promissores na área farmacológica (Deshmukh *et al.*, 2017; Hasan *et al.*, 2015; Loges *et al.*, 2020; Raghukumar, 2008; Rédou *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019).

a. Policetídeos

Os policetídeos (PKs) são metabólitos muito diversos em termos de estrutura e funções, sintetizados pelo sistema modular de PKSs a partir de pequenos ácidos carboxílicos por meio de condensação contínua, onde uma única megaproteína constrói os policetídeos usando o mesmo domínio, com enzimas multidomínio e multiloculares (seção 2.3.3.1) (Bhadury, Mohammad; Wright, 2006; Brakhage; Schroeckh, 2011; Hansen *et al.*, 2015).

Cabe destacar que são produzidos através da via biossintética do Acetato-Malonato (AA-MA), porém alguns peptídeos híbridos se derivam de diferentes rotas biossintéticas, incluindo ácido mevalônico e vias mistas de chiquimato (Zhang; Li; Wang, 2016). Como exemplo estão os compostos identificados a partir dos fungos do mar Báltico e do Oceano Ártico, *Massariosphaeria typhicola* KF970 e LF327, dos quais em estudos diferentes produziram policetídeos similares e apesar de serem de regiões geográficas diferentes, os dois policetídeos com funções de antibióticos, apresentaram estruturas incomuns, que foram identificados como lindgomicina (1) e ascosetina (2), no trabalho de Lang *et al.* (2007), foram identificados novos prugosenes, PKs do fungo filamentoso *Penicillium rugulosum* isolado de esponja (Figura 10).

Figura 10. Exemplos de estruturas químicas de PKs produzidas por fungos, as lindgomicina (1) e ascosetina (2) e as, Prugosenes A3 (3), B1 (4), B2 (5), C1 (6), e C2 (7) (Adaptado de Imhoff, 2016; Lang *et al.*, 2007).



Os policetídeos produzidos por fungos marinhos nas últimas décadas têm se incrementado favorecido pelo surgimento de novas técnicas e ferramentas úteis para a elucidação e compreensão da síntese destas moléculas (Smith *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2015). Destaca-se a revisão feita por Ji *et al.* (2016), onde foram relatados 130 PKs identificados a partir de fungos marinhos (principalmente associados aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Curvularia*), relacionados com algas, mostrando que a micoquímica de fungos é a origem dos mais diversos compostos nestes ambientes.

b. Peptídeos não ribossomais (NRPs)

Os NRPs são sintetizados por enzimas sintetases (NRPSs), constituindo compostos com estruturas mais complexas e diversas (Maddah *et al.*, 2020). Os NRPs são sintetizados de forma semelhante aos PKs, com linhas de montagem de módulos proteicos responsáveis pela construção dos compostos a partir de blocos de aminoácidos. Estes módulos apresentam vários domínios capazes de aceitar diversos monômeros (superiores a 520) na linha de montagem (incluindo aminoácidos não proteínogênicos raros), o que os diferencia dos PKs (Maddah *et al.*, 2020; Moghaddam *et al.*, 2021).

Por outro lado, existem compostos que são sintetizados utilizando rotas mais complexas, onde enzimas atuam de forma conjunta gerando estruturas com mais de 780 monômeros (Keller *et al.*, 2019). Nestas linhas de montagem se originam os peptídeos híbridos PKS-NRPS, os quais podem incorporar blocos de acil e aminoacil dando forma a estruturas híbridas de policetídeo-peptídeo muito mais complexas, ampliando sua versatilidade de ação (Moghaddam *et al.*, 2021).

Maddah *et al.* (2020), contemplaram os NRPs produzidos por fungos marinhos agrupando estes com base em características estruturais (peptídeos lineares e cíclicos). Os primeiros NRPs lineares são uma classe única de peptídeos em fungos marinhos, constituindo peptídeos com entre 5 - 21 resíduos de aminoácidos, incluindo aminoácidos não proteínogênicos (Maddah *et al.*, 2020). Nestes trabalhos foi feita a descrição do ácido α -aminoisobutírico (Aib), que somado a alguns aminoácidos incomuns como etilnorvalina (EtN), hidroxiprolina (Hyp), isovalina (Iva), foram descritos como moléculas que participam na síntese destes NRPs (Maddah *et al.*, 2020; Youssef *et al.*, 2016).

Alguns NRPs lineares e cíclicos mostrados na **figura 11**, sendo obtidos de fungos algícolas, dois dodecapeptídeos a Dictionamida A – B (8 - 9) a partir da linhagem K036 isolado em Okinawa- Japão, os análogos de terpeptina (10 - 11)

designados JBIR-81 e JBIR-82 respetivamente, e um dipeptídeo clorado a trichodermamida B (12), produzido por *Trichoderma virens* CNK266, e os peptídeos cíclicos, que possuem estruturas com maior estabilidade contra a degradação enzimática e com maior estabilidade de ligação ao alvo, participando no processo de permeabilidade das membranas, melhorando assim sua eficácia de acordo com a ligação de ciclização, denominados como peptídeos homodésicos e heterodésicos cíclicos mostrados na **tabela 2**. (Ji *et al.*, 2016; Maddah *et al.*, 2020).

Figura 11. Exemplos de estruturas químicas de NRPs lineares e cíclicas produzidos por fungos marinhos (Adaptado de Ji *et al.*, 2016; Maddah *et al.*, 2020).

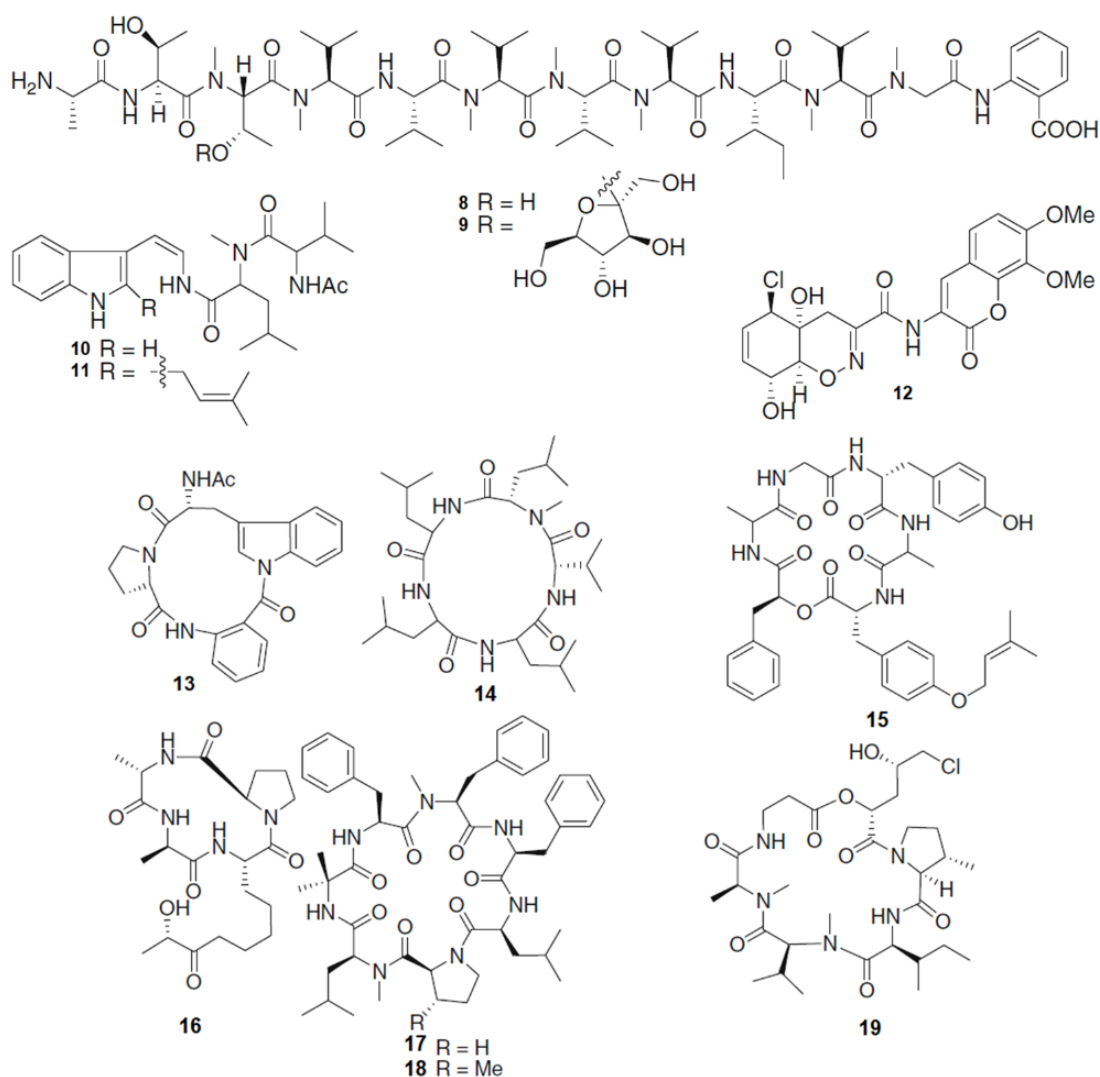


Tabela 2. Compostos NRPs cíclicos identificados de fungos marinhos (Adaptado de Ji *et al.*, 2016; Maddah *et al.*, 2020).

	Metabólito	Fungo	Hospedeiro
1	Psichrophilina E	<i>Aspergillus</i> spp. BM-05 and BM-05ML	<i>Sargassum</i> sp.
2	JM47	<i>Fusarium</i> sp. MOBCOF-1	<i>Codium fragile</i>
3	Lajollamida A	<i>Asteromyces cruciatus</i> 763	Unidentified
4-5	Scitalidamida A-B	<i>Scybalidium</i> sp. CNC-310	<i>Halimeda</i> sp.
6	N-Metilsansalvamida	<i>Fusarium</i> sp. CNL-619	<i>Avrainvillea</i> sp.
7	Zygosporamide	<i>Zygosporium masonii</i> CNK458	Unidentified
8	Gliotide	<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Durvillaea antarctica</i>
9	[β -Me-Pro] destruxin E chlorohidrin	<i>Beauveria felina</i> AcSS8 e AcSS13	<i>Caulerpa</i> sp.

II. Terpenoides

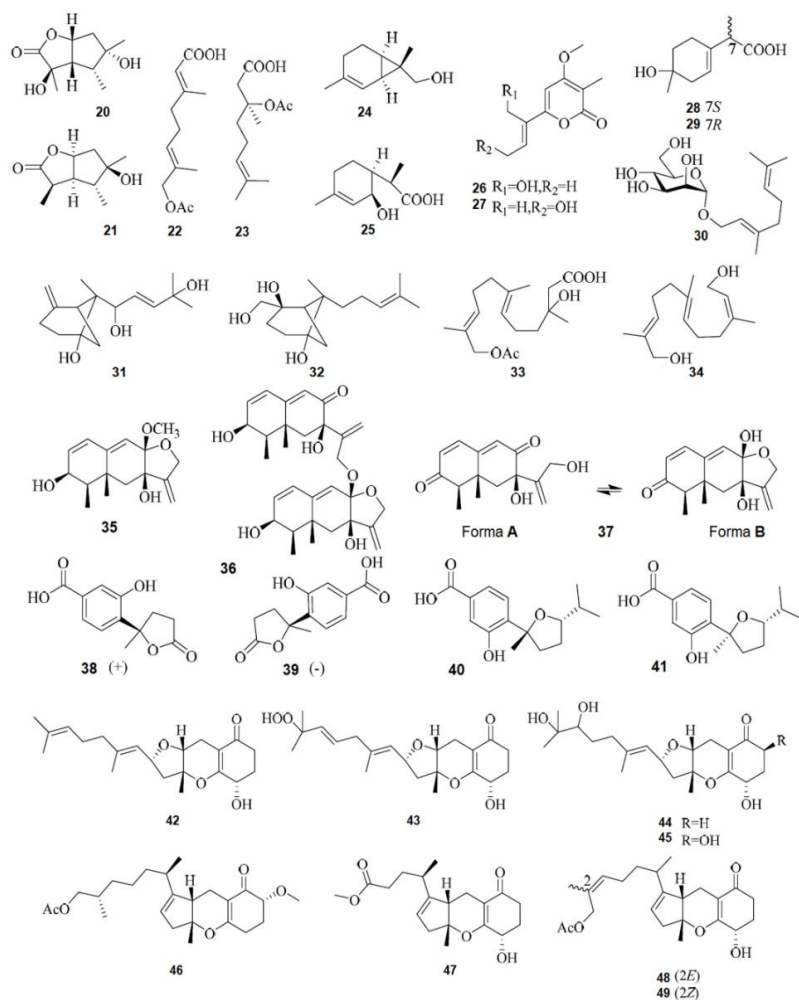
Os terpenoides de fungos marinhos se agrupam com base em suas estruturas químicas e vias biogénicas em: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e meroterpenos. São um dos PNMMs de fungos mais estudados, por suas propriedades biológicas e farmacêuticas (Ebel, 2010; Elissawy *et al.*, 2015). No ambiente natural, os terpenos fúngicos participam no transporte de elétrons, formação de parede celular e membranas, também na defesa química contra predadores e nas interações simbióticas (González-Hernández *et al.*, 2023). As atividades biológicas são variadas, como antimicrobianas e antivirais, citotóxicas contra linhas celulares de câncer, toxicidade letal, atividade anti-inflamatória, atividade enzimática inibitória (Ebel, 2010; González-Hernández *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2020).

a. Monoterpenos

Os monoterpenos obtidos de fungos derivados do mar são raramente reportados na literatura. Até 2014 só se tinha reportado na literatura um monoterpeno clorado (1S,2S,3S,4R)-3-cloro-4-(2-hidroxiopropan-2-il)-1-metilciclohexano-1,2-diol obtido de *Tryblidiopycnis* sp., isolado de tecido lenhoso de origem marinha em Hong Kong, para 2022 outros onze foram reportados (Chen *et al.*, 2022; Elissawy *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2020; Shabana *et al.*, 2021). Dos fungos

filamentosos marinhos *Aspergillus versicolor* SD-330 - pestalotiactones C e D (20 e 21); *Penicillium* sp. (YPGA11) - penicipenes A e B (22 e 23); *Eutypella scoparia* FS46 - eutypelol B (24), 2-(2-hidroxi-4-metilciclohex-3-enil) ácido propanóico (25); *Nectria* sp. HLS206 nectriapironas C e D (26 e 27); *Trichoderma asperellum* (cf44-2) – os ácidos (7S) e (7R)-1-hidroxi-3-p-menton-9-óicos (28 e 29) e finalmente a partir do fungo *Thielavia hyalocarpa* – monoterpene glicosídeo, 1-O-(α -d-manopiranosil) geraniol (30) (Adaptado de Jiang et al., 2020) (**Figura 12**).

Figura 12. Exemplos de estruturas químicas dos Terpenos produzidos por fungos filamentosos marinhos. Monoterpenos (20 – 30), Sesquiterpenos (31 – 41) e Meroterpenos (42 – 49).



b. Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos constituem a fonte de terpenoides mais variada. Jiang *et al.* (2020) relataram 188 compostos associados a este tipo de terpenoides, advindos de fungos marinhos dos gêneros *Chondrostereum* sp., *Cochliobolus* sp., *Coriolorpsis* sp., *Diaporthe* sp., *Graphostroma* sp., *Leptosphaerulina* sp., *Paraconiothyrium* sp. Onde os gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. e *Eutypella* sp. são os maiores produtores destes compostos, todos eles isolados de diferentes substratos como algas marinhas, manguezais, sedimentos marinhos, animais marinhos incluindo esponjas, corais, entre outros. Na **Figura 12**, se mostram os sesquiterpenos produzidos por fungos filamentosos marinhos: *Aspergillus fumigatus* - E- β -trans-5,8,11-trihidroxibergamota-9-eno (31) e β -trans-2 β ,5,15-trihidroxi-bergamota-10-eno (32); *Aspergillus terreus* - asptérico A (33) e asptérico B (34); *Aspergillus* sp. - dihidrobipolaroxina B–D (35 – 37); *Aspergillus versicolor* SYSU-SKS025 – os ácidos (+)-1-hidroxiboiviniânico e (-)-1-hidroxiboiviniânico (38 –39); *Aspergillus sydowii* SW9 - metil (R,E)-6-(2,3-dihidroxi-4-metilpenil)-2-metilhept-5-enoato (40 – 41) (Jiang *et al.*, 2020).

c. Meroterpenos

Por outro lado, na **figura 12**, também se apresentam os meroterpenos são PNMMs produzidos por fungos, e se classificam em dois grupos principais de acordo com suas origens biossintéticas (Jiang *et al.*, 2020). Um deles são os policetídeos-terpenoides, os quais constituem 80% de meroterpenoides fúngicos, onde estão incluídos ácido orselínico, ácido 5-metilorselínico (5-MOA), ácido 3,5-dimetilorselínico (DMOA), e ácido 6-metilsalicílico (6-MSA) constituídos por uma parte policetídica. Por outro lado, estão os meroterpenoides não policetídeos (incluindo diterpenoides indol e terpenoides derivados de chiquimato, como tricicloalternarenos). Entre os obtidos estão os meroterpenos isolados dos fungos marinhos *Eupenicillium* sp., - eupeniactal A, e eupeniactal B, e o novos meroterpenoides , 1- metoxi-hidropreaustinóide A1 (42–43); *Lophiostoma* sp. -

Craterilina D (44); *Mucor* sp. - penitrems A, C (45 e 46); *Myrothecium* sp. - mirotecisininas A (47) e do fungo *Neosartorya pseudofischeri* - 5-olefina fenilpiropeno A (48) e de *Neosartorya* sp. - sartorenol (49). Todos os fungos foram isolados de substratos marinhos como algas, esponjas, coral mole, material biológico de estrela do mar, sedimento marinho, entre outros (Chen *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2020).

Outros terpenoides, como os sesterterpenos, são um pequeno grupo produzidos por fungos marinhos e cujo isolamento vem aumentando. Os triterpenos são considerados um grupo de terpenoides raro em fungos marinhos, no entanto, seu isolamento e relatos têm crescido nos últimos anos (Chen *et al.*, 2022). Finalmente, os diterpenos são uma classe significativa de terpenos com uma diversidade de estruturas importantes, e um dos grupos mais representativo em fungos neste ambiente (Chen *et al.*, 2022; Elissawy *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2020).

III. Dicetopiperazinas (DKPs)

No trabalho de Song *et al.* (2021), se mostra uma análise extensa sobre as dicetopiperazinas (DKPs) como produtos metabólicos produzidos por organismos marinhos, entre eles, fungos filamentosos. O autor destaca que nos últimos anos as DKPs de origem marinha têm se tornado um foco importante na obtenção de moléculas com diversas atividades. As DKPs são os menores dipeptídeos cíclicos, gerados a partir das condensações duplas entre dois α -aminoácidos. Estes compostos são abundantes na natureza, e o processo de catálise das ligações peptídicas nas DKPs é dada principalmente por duas enzimas: as sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPSs, >100 kDa) e as sintases de ciclodipeptídeos (CDPSs, 30 kDa) (Borgman; Lopez; Lane, 2019).

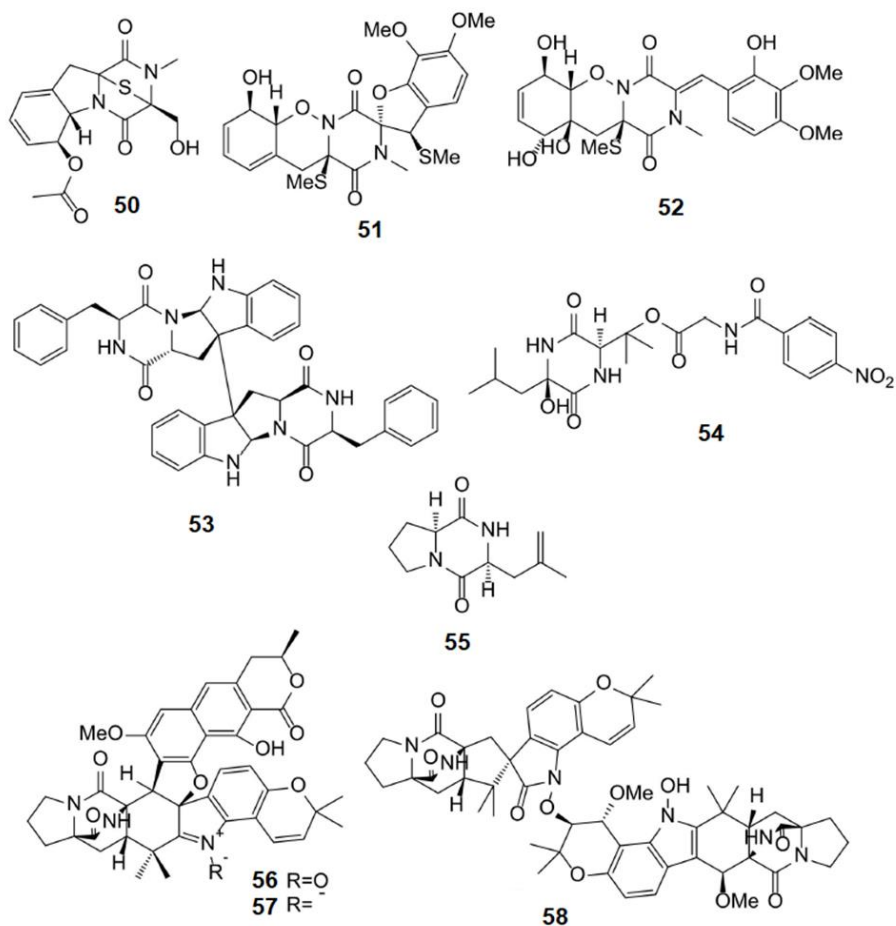
DKPs são moléculas que atuam em diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana, citotóxica, antimalárica e antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antihiperlipidêmica, antioxidante e inibidora da glicosidase, inibidora da

tirosina quinase p56 e outras proteínas (Hong *et al.*, 2023; Huo *et al.*, 2022; P de Carvalho; Abraham, 2012; Song *et al.*, 2021). Em ambientes naturais, as DKPs constituem uma defesa dos fungos contra outros micro-organismos e auxiliam nos processos de estresse oxidativo por suas propriedades antioxidantes, assim como outras atividades potenciais (Bugni; Ireland, 2004; P de Carvalho; Abraham, 2012; Song *et al.*, 2021).

Segundo Song *et al.* (2021), os recifes de corais têm sido o substrato de onde tem isolado fungos produtores de DKPs, os quais tem reportadas diversas atividades biológicas, entre os fungos estão *Pseudallescheria ellipsoidea* F42-3, que produziu pseudellones A e B, *Pseudallescheria boydii* F19-1, do qual foram isoladas as pseudoboydonas C e D, o ascomiceto *Dichotomomyces cejpaii* F31-1, com as dicocerazinas A e B, assim como três novos alcaloides de DKPs obtidos do fungo *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3, chamadas 11-metilneoequinulina E, variecolorin M e (+)-variecolorin G, e o novo repórte para ambiente natural da DKP descrita como (+)-neoechinulin. Estes fungos têm se mostrado bons produtores de DKPs (Song *et al.*, 2021).

Outros produtos de fungos marinhos isolados de esponjas se mostram na **figura 13**: *Dichotomomyces cejpaii* - 6-acetylmonodethiogliotoxin (50); *Penicillium adametzioides* - Peniciadameticina A e B (51 e 52); *Aspergillus versicolor* 16F-11 - Asperflocina (53); *Aspergillus ochraceus* - Waspergillamide B (54); e de fungos associados a corais *Penicillium purpurogenum* G59 - Penicimutanin C (55); e de *Aspergillus* sp. - Waikikiamides A e C (56-57) obtido de uma amostra da praia de Waikiki em Oahu, Honolulu (Song *et al.*, 2021).

Figura 13. Exemplos de estruturas químicas de dicetopiperazinas (DKPs) isoladas de fungos marinhos associados a diferentes substratos (Adaptado de Song *et al.*, 2021).



IV. Alcaloides

Os alcaloides têm se destacado como componentes importantes de produtos naturais obtidos de fungos em diferentes ambientes, e na última década têm mantido uma tendência crescente em número e em variedade estrutural (El-Bondkly *et al.*, 2021; Willems *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2022). Estes compostos naturais

compreendem substâncias que contam com átomos de nitrogênio presentes em suas estruturas constituídas por heterociclos complexos e únicos, e considerados uns dos MSs mais importantes (El-Bondkly *et al.*, 2021; Tian; Li, 2022; Yin *et al.*, 2022). Os alcaloides podem ser categorizados em 5 grupos, de acordo com suas características e subestruturas, sendo os derivados de piperazina os mais comuns, seguidos dos derivados quinazolona e finalmente os derivados de indol. No entanto, as quinolinas também tem representantes importantes (Hasan *et al.*, 2020; Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2022).

Alcaloides e seus derivados têm se mostrado moléculas promissoras com diversas atividades biológicas, em que se destacam ativação transcricional do receptor X do fígado (Liang *et al.*, 2019), e como fonte promissora de antimicrobianos (Dong *et al.*, 2023; Willems *et al.*, 2020); anticâncer (Deshmukh; Prakash; Ranjan, 2018; Tohme *et al.*, 2011), citotóxico (Lin *et al.*, 2023). No ecossistema a produção e funções dos alcaloides produzidos pelos fungos, estão relacionadas com as condições do ambiente marinho onde estes habitam, mostrando atividades de proteção contra predadores, antimicrobianas contra competidores, sinalizadores como atraentes para outros organismos, interações com o hospedeiro e comunicação entre outros micro-organismos (Aniszewski, 2015; Tian; Li, 2022; Yin *et al.*, 2022).

a. Alcaloides derivados de dicetopiperazinas (DKPs)

Entre 2016 e 2022, 56 derivados de DKPs foram relatados para fungos marinhos (Tian; Li, 2022; Zhang *et al.*, 2018). Yin *et al.* (2022), refere-se a estes compostos como derivados de DKPs que contém um grupo paracarbonila em sua estrutura, outros alcaloides derivados de DKPs foram reportados por Zhang *et al.* (2018). sendo produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. F1, isolado do leite marinho, brevicompaninas D–H (1–5) sendo cinco novos alcaloides.

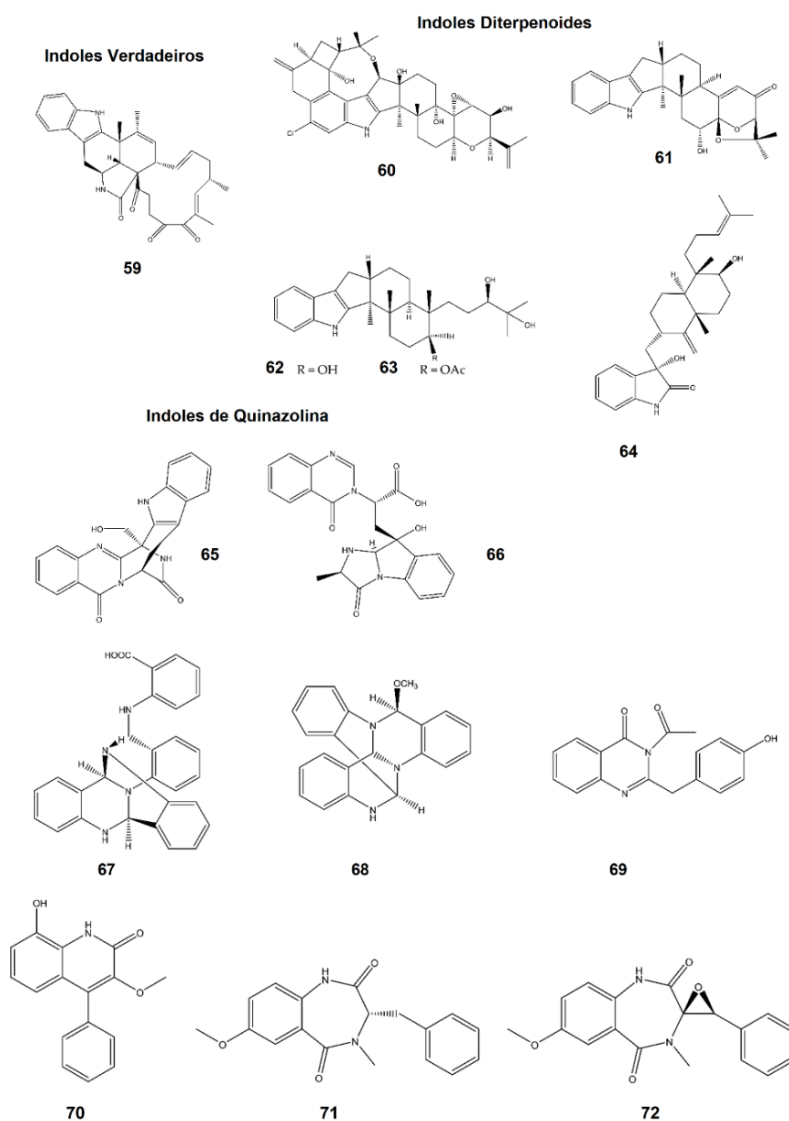
Fungos produtores de DKPs, tem sido isolados de diferentes ambientes e em 2015 foram reportadas quatro tipos destes alcaloides: as penicibrocazina B–E, a partir do fungo *Penicillium brocae* MA-231 obtido de manguezal, um ano depois (2016), da mesma linhagem foram identificadas outros três alcaloides derivados de DPKs, a brocazina G e as espirobrocazina A e C, já a penicilina B foi reportada em 2018, produzida pela linhagem *Penicillium* sp., isolada de um tunicado no Mar Vermelho, todas elas mostrando diversas atividades biológicas (Willems *et al.*, 2020). Tian; Li, (2022), descrevem diversas dioxopiperazinas produzidas por espécies de fungo marinho *Chaetomium* sp., onde destacam-se suas atividades características na área da terapia antitumoral e antimicrobiana.

b. Alcaloides derivados de indol

Na revisão de Yin *et al.* (2022), destaca-se que dos 157 alcaloides derivados de fungos marinhos reportados entre 2016-2022, 35 corresponderam a derivados de indol. Os derivados de indol são alcaloides biossintetizados a partir do aminoácido triptofano, que possuem estruturas que contêm um anel de indol de cinco membros contendo benzeno e nitrogênio, entre estes incluem derivados como as indolizidinas: alcaloides com substituição de alquil na posição 5 (Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018).

Outros alcaloides derivados de indol são mostrados na **figura 14** se mostram os diferentes tipos de índoles, as produzidas, pelos fungos *Penicillium chrysogenum* na China, penochalasin K (59) o 19-hidroxi-penitrem A (60) de *Aspergillus nidulans* EN-330 isolado de alga vermelha, de *Penicillium* sp. AS-79 o composto 6-hidroxi-paspalinine (61), do fungo isolado de sedimento marinho *Penicillium janthinellum* os compostos penijantine C–D (62–63), e finalmente os compostos (3R,9S,12R,13S,17S,18S)-2-carbonil-3-hidroxi-lemeniveol (64), fumigatoside E (65), e fumigatoside F (66) dos fungos *Aspergillus versicolor* ZZ761, *A. fumigatus* SCSIO41012 e *Fusarium oxysporum* respectivamente (Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020).

Figura 14. Estruturas químicas de alcaloides, verdadeiros índoles (59), índoles diterpenoides (60–64), alcaloides derivados de quinazolina (65–66), os compostos (67–69) são alcaloides derivados de quinazolona, e finalmente os alcaloides derivados de quinolininas (70–72) (Adaptado de Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020).



c. Alcaloides derivados de quinazolonas

Os alcaloides de quinazolona mais comum é o 4-(3H)-quinazolona. Os derivados de quinazolona se constituem como um tipo de derivados da quinazolina, estes são alcaloides de quinolina contendo heterocíclicos do aminoácido pirimidina, com potentes atividades antimicrobianas (Yin *et al.*, 2022). Deste tipo de alcaloides na **figura 14** se mostram os produzidos pelos fungos *Fusarium oxysporum* - A oxisporizolina (67), a Thielaviazoline (68), sintetizada por *Thielavia* sp. isolado de manguezal na Coréia e o composto 2-(4-hidroxibenzil) -4-(3-acetil) quinazolin-ona (69) produzido pelo fungo *Aspergillus sydowii* SW9 (Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020).

d. Alcaloides derivados de quinolinas

Os alcaloides derivados de quinolinas se diferenciam da quinazolona por um único grupo carbonila, e possuem propriedades antitumorais, antimaláricas, antituberculose, antibacterianas e anti-inflamatórias (Willems *et al.*, 2020). Um novo composto dihidroquinolinona foi sintetizado e identificado a partir de *Aspergillus versicolor* MA-229, chamado 22-epi-aflaquinolona B (Tian; Li, 2022; Willems *et al.*, 2020). Outros alcaloides derivados de quinolinas são também apresentados na **figura 14**, sendo produzidas pelos fungos, *Aspergillus versicolor* XZ-4, a quinolina, 9-hidroxi-3-metoxiviridicatina (70), e seus dois precursores 7-metoxiciclopeptina (71) e 7-metoxiciclopenina (72), este fungo foi isolado caranguejo em Taiwan (Adaptado de Tian; Li, 2023; Willems *et al.*, 2020).

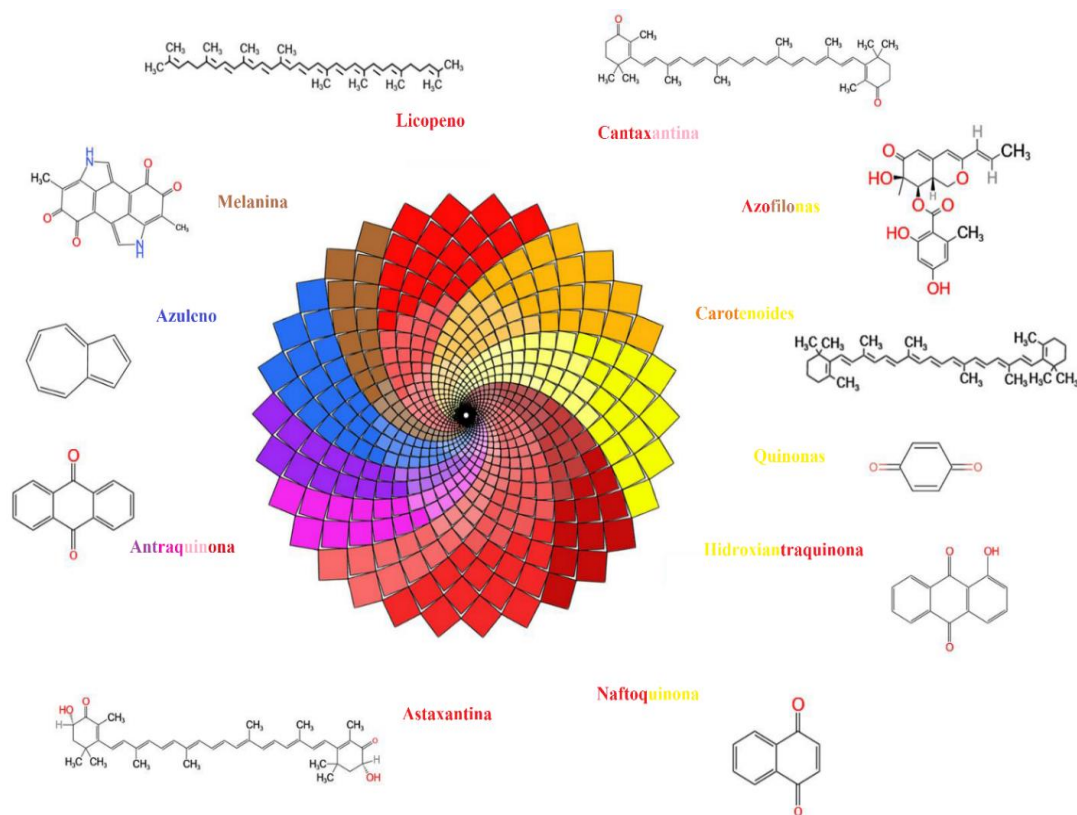
V. Pigmentos

Fungos marinhos isolados de diferentes ambientes (sedimentos marinhos, invertebrados marinhos, halófilos, manguezais, entre outros) têm ganhado destaque por produzirem cores mais intensas e brilhantes, com maior estabilidade, e com baixo ou nenhuma presença de micotoxina isto comparado com as suas contrapartes terrestres (Afroz Toma *et al.*, 2023). No ambiente marinho as funções

dos pigmentos de fungos, estão relacionadas à proteção contra estresse oxidativo, como inibidores de crescimento bacteriano, conferindo-lhes vantagens para o estabelecimento nos nichos (Afroz Toma *et al.*, 2023; Kalra *et al.*, 2020).

Os pigmentos de fungos estão relacionados a processos de reprodução e mudam dependendo do estado de desenvolvimento do fungo, já em ambiente laboratorial os pigmentos podem ser variados dependendo dos meios e as condições de cultivos usados para as avaliações (Afroz Toma *et al.* 2023; Kalra *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2017). Entre as classes químicas de pigmentos produzidos por estes organismos estão as melaninas, azafilonas, flavinas, fenazinas, quininas, ancaflavina, monascina, antraquinona e naftoquinona (Afroz Toma *et al.*, 2023; Kalra *et al.*, 2020) (**Figura 15**).

Figura 15. Esquema exemplificando os tipos de pigmentos e as estruturas químicas produzidas por fungos marinhos (Adaptado de Afroz Toma *et al.*, 2023; Kalra *et al.*, 2020).



Como exemplos de pigmentos produzidos por fungos marinhos, destacam-se os obtidos associados a sedimentos marinhos, onde a gama de cores é variada, tendo pigmentos amarelos como as citromicetina, citromicina e dois análogos destes identificados de *Penicillium bilaii*, o flavoglaucina de *Microsporium* sp., (+) Variecolorquinones A de *Aspergillus glaucus* (Afroz Toma *et al.*, 2023).

Os pigmentos vermelhos também são destacados e de relevância na indústria alimentícia e farmacêutica, entre eles, o Aspergiolide B e diversas azafilonas, os quais têm sido isolados de fungos *Aspergillus glaucus*, *Talaromyces* spp., *Trichoderma atroviride*, *Penicillium* sp. NIOM-02, *Talaromyces albobiverticillius* 30548, isolados em diferentes localidades ao redor do mundo. Estes pigmentos conferem aos fungos no ambiente algum tipo de proteção, ou, vantagem em seu estabelecimento, já que as condições destes locais são altamente variantes, outras atividades associadas são anticarcinogênicas, antioxidantes, antiproliferativas (Afroz Toma *et al.* 2023; Kalra *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2017).

3.3.4 Os MSs de fungos marinhos e seus mecanismos de ação: Células fúngicas e bacterianas

A descrição dos fungos marinhos se relaciona como potenciais funções ecológicas que estes cumprem nos ecossistemas, as maquinarias biossintéticas, os produtos naturais obtidos destas, e às atividades biológicas relacionadas, seja no ambiente natural ou laboratorial (Gonçalves; Esteves; Alves, 2022).

Nas últimas décadas, o papel dos antimicrobianos existentes na atualidade tem sido questionado, devido à capacidade dos patógenos de ter adquirido tolerância ou resistência ao longo do tempo. Diversos fatores como o uso indiscriminado de antimicrobianos (antibióticos e antifúngicos), o despejo em efluentes aquáticos de resíduos hospitalares e industriais, tem potencializado as respostas adaptativas destes patógenos (Behera; Das, 2023; Fisher *et al.*, 2022). Fato que tem tornado

necessária uma corrida na aquisição de novos compostos com estruturas e atividades que supram estas necessidades.

A atualmente a obtenção de moléculas com potenciais biológicos parece estar atingindo o platô (Bovio *et al.*, 2019; Voser; Campbell; Carroll, 2022). Portanto, a descoberta de novas moléculas úteis, tornou-se uma prioridade. Os produtos naturais de origem terrestre são amplamente relatados na literatura, e para os quais tem sido desvendado seus mecanismos de ação contra patógenos ambientais ou hospitalares, enquanto os de origem marinha mostram cada vez mais perfis importantes para suprir estas necessidades (Bhattarai *et al.*, 2020; Mayer *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022).

No entanto, os PNMs provenientes de fungos ainda são pouco explorados e tornaram-se atrativos por seu potencial na produção de moléculas e para a descoberta de novos compostos, principalmente atuantes contra patógenos emergentes de alto risco de contágio, assim como para o controle de patógenos nas áreas alimentares, ecológicas e industriais (Behera; Das, 2023; Noorjahan *et al.*, 2022; Nwakanma *et al.*, 2016; Vala; Dave, 2017).

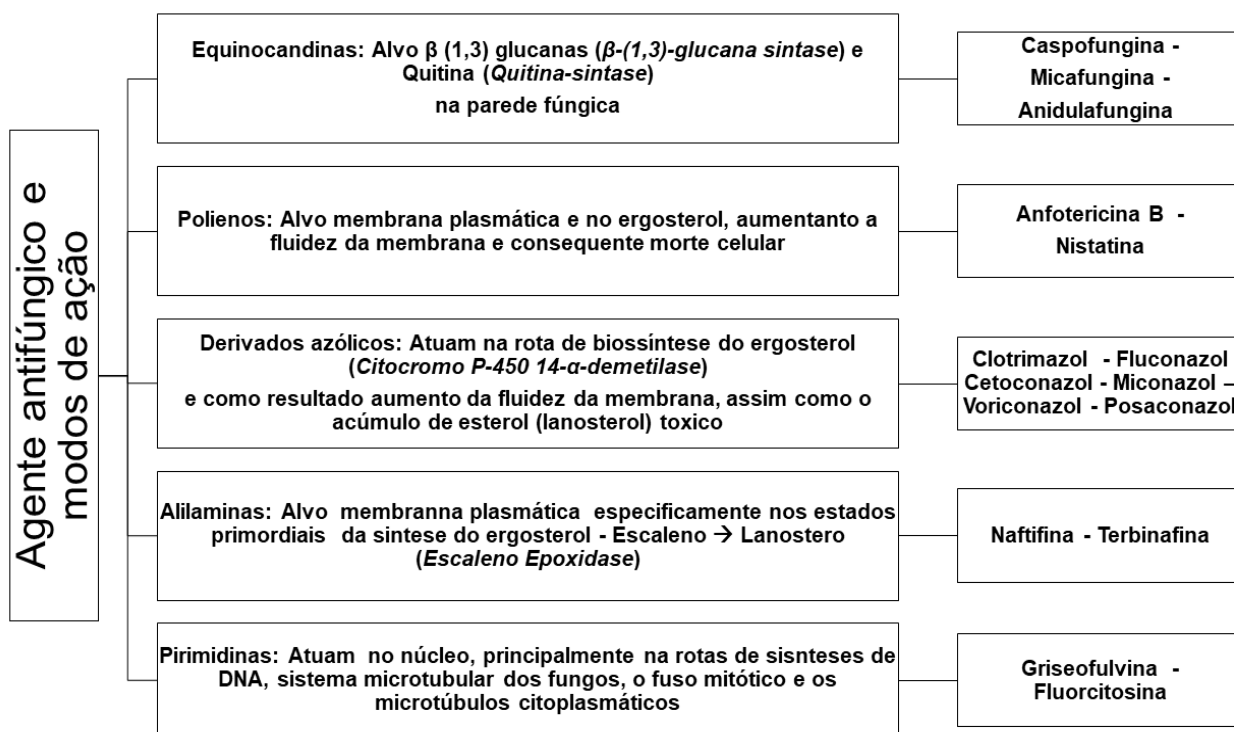
3.3.4.1 Mecanismos de ação em células de leveduras

Leveduras consideradas patógenos emergentes, e recentemente catalogadas pela OMS como patógenos de alto risco, vêm ganhando destaque nas últimas décadas (Basso *et al.*, 2021), devido ao seu drástico aumento na incidência de infecções e coinfeções como as geradas pelo SARS-CoV-2, e anteriormente à AIDS, patologias hematológicas, receptores de transplantes, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (Basso *et al.*, 2021; Carrilo-Munõz *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2020; Salazar *et al.*, 2022).

Aproximadamente um bilhão de relatos de infecções fúngicas ocorrem anualmente em todo o mundo, cerca de 150 milhões destes casos correspondem a

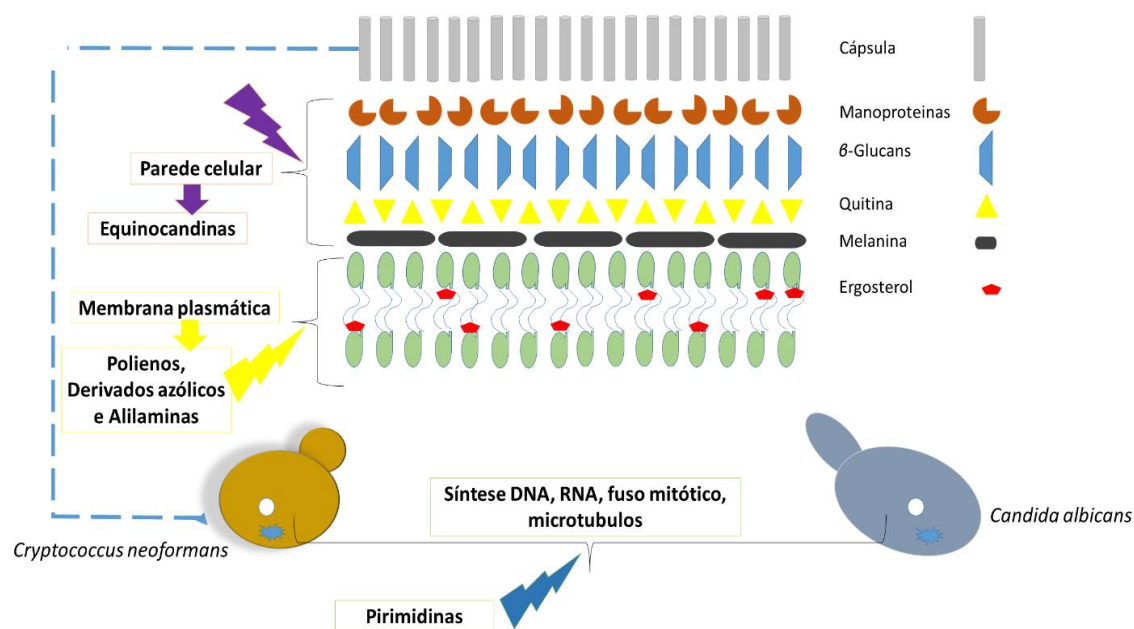
casos graves de infecção, levando a 1,7 milhões de mortes por ano, constituindo-se numa ameaça global (Bhattacharya; Sae-Tia; Fries, 2020; Fisher *et al.*, 2022). Agentes antimicrobianos são necessários em especial antifúngicos, já que na atualidade o número destes é limitado e em muitos casos de custos elevados (Fisher *et al.*, 2022; Mani-López *et al.*, 2020). Entre os antifúngicos atuais estão a anfotericina B complexo lipídico e lipossomal, o fluconazol e itraconazol e mais recentemente voriconazol, posaconazol, ravuconazol, caspofungina e micafungina estes últimos mais acessíveis no controle de infecções fúngicas (**Figuras 16 e 17**). Este evento se repete também com antibióticos, para os quais bactérias têm se tornado multirresistentes aos antimicrobianos (Albaugh *et al.*, 1998; Carrilo-Muñoz *et al.*, 2006; Mani-López *et al.*, 2020; Ovechkina *et al.*, 1999).

Figura 16. Agentes antifúngicos e seus respectivos alvos nas células fúngicas. Em parêntese as enzimas implicadas como alvos das classes de moléculas específicas (Fonte: Autor; Abd Rashed *et al.*, 2021).



O principal alvo molecular dos antifúngicos azólicos é a proteína Erg11p/Cyp51p do citocromo P-450, por outro lado as equinocandinas atuam contra a síntese de beta-1-3-D-glucano e as fenilmorfolinas, da qual se destaca a amorolfina (não presente na imagem, usado na terapia humana) afetam dois alvos na via do ergosterol: Erg24p (delta 14-redutase) e Erg2p (delta 8-delta 7 isomerase) (Abd Rashed *et al.*, 2021; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006). Outra classe de moléculas são as sordarinas, que participam na inibição da síntese proteica, sendo um bloqueador do fator 2 de alongamento na tradução fúngica (Abd Rashed *et al.*, 2021). Inibidores proteicos como zofimarin, BE31045, SCH57504, xilarina, hipoxisordarina e GR135402 também cumprem funções semelhantes, outros compostos são avaliados na literatura (Abd Rashed *et al.*, 2021; Hasan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). As atividades dos antifúngicos são exemplificados na **figura 17**.

Figura 17. Principais agentes antifúngicos e seus alvos nas células de leveduras (Fonte: Autor).



Atividades antifúngicas e mecanismos de ação de compostos produzidos por fungos filamentosos de ambiente terrestre e marinho têm sido abordadas desde a

década de 90 e mais intensamente no começo do século 20 (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006; Fostel; Lartyl, 2000). Mais recentemente novos estudos com moléculas obtidas deste ambiente, têm sido reportados mostrando a importância de moléculas advindas do mar como relevantes no antagonismo de patógenos emergentes (Chandrika; Sharma, 2020; Jacobs *et al.*, 2021). Fungos filamentosos têm se mostrado como uma importante fonte de obtenção dos compostos com atividades antifúngicas, para os quais alguns estudos têm avaliado seus mecanismos de ação (Cardoso *et al.*, 2020).

Fostel e Lasrtyl (2000) destacaram a obtenção de novos compostos com promissoras atividades antimicrobianas, com o objetivo de incrementar o número de medicamentos antifúngicos, assim como identificar os mecanismos de ação contra células fúngicas e a identificação de novos alvos seletivos em fungos patogênicos. Para isso foram destacados os compostos como artriquitina, um depsipeptídeo cíclico inibidor da síntese de quitina, afetando a parede celular fúngica, composto obtido a partir dos fungos marinhos *Arthrimum phaeospermum* e *Hypoxylon oceanicum*.

O fungo *Xylaria* sp. (#2508) isolado de manguezal nas costas da China, produziu a xilipiridina A, composto com atividade de afinidade de ligação (intercalação) ao DNA (Xu *et al.*, 2009). Por outro lado, Chandrika e Sharma, (2020), destacam que entre 2014 – 2019, novos agentes antifúngicos do ambiente marinho foram avaliados, sendo que 15% destes foram de origem fúngica. Alguns dos mecanismos de ação avaliados tiveram como origem moléculas sintetizadas com alvos específicos na síntese de membrana, parede celular e desnaturação de proteínas e DNA. Não obstante, os autores ressaltam a necessidade de aprofundar os estudos sobre a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nestas atividades antifúngicas (Chandrika e Sharma, 2020).

Finalmente, um trabalho recente mostra o atual quadro de compostos antifúngicos em ensaios clínicos, os relatos de doenças fúngicas invasivas

causadas por leveduras e fungos filamentosos, que em diversos casos têm adquiridos resistência aos antifúngicos atuais, se convertendo em uma ameaça crescente principalmente atingindo hospedeiros imunossuprimidos, casos de coinfeção com outras doenças em particular respiratórias, como também acometendo pacientes transplantados (Cardoso *et al.*, 2020; Jacobs *et al.*, 2021). Os autores destacam alguns compostos promissores que se encontram em fases clínicas, como: fosmanogepix, ibrexafungerp, rezafungina, anfotericina B encocleada, oteseconazol (VT-1161), VT-1598, PC945 e olorofim (Chandrika; Sharma, 2020).

Entre os mecanismos de ação referenciados, mencionam-se os atuantes nas manoproteínas ancoradas em glicosilfosfatidil inositol (GPI), um dos constituintes principais nas paredes fúngicas, afetando a síntese da parede celular fúngica através da inibição da (1→3)- β -D-glucano sintase (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Outros modos de ação estão relacionados à ligação do ergosterol o que gera permeabilidade na membrana celular, formando poros que permitem o vazamento do conteúdo intracelular contribuindo com ação fungicida (Carolus *et al.*, 2020).

Compostos como o oteseconazol (VT-1161, VT-1598), participam na inibição seletiva da enzima fúngica CYP51 alcançada pela substituição do 1 -(1,2,4-triazol) grupo de ligação a metal com um tetrazol. O PC945 e seus mecanismos de ação estão ainda sendo estudados e, finalmente, orotomidas, atuam na inibição da enzima fúngica que participa da biossíntese de pirimidina, diidroorotato desidrogenase, prejudicando diretamente a sínteses de ácidos nucleicos, e fisiologicamente leva à interrupção da extensão das hifas (Jacobs *et al.*, 2021).

3.3.4.2 Mecanismos de ação em células de bactérias

O uso excessivo de antibióticos na terapia humana e de animais têm potencializado o surgimento de bactérias patogênicas resistentes a medicamentos antibacterianos atuais, em muitos casos limitando sua eficácia ou deixando eles

totalmente inúteis (Anderson *et al.*, 2012). A falta de diversidade de seus modos de ação o surgimento de mecanismos auxiliares de resistência que incluem por exemplo, novas proteínas restritivas da penicilina, troca de medicamentos dependente de catalisador, transformação dos alvos dos medicamentos e aumento da expressão da bomba de efluxo, formam fatores que levaram à resistência a múltiplos medicamentos (Jakubczyk; Dussart, 2020; Ramírez-Rendon *et al.*, 2022).

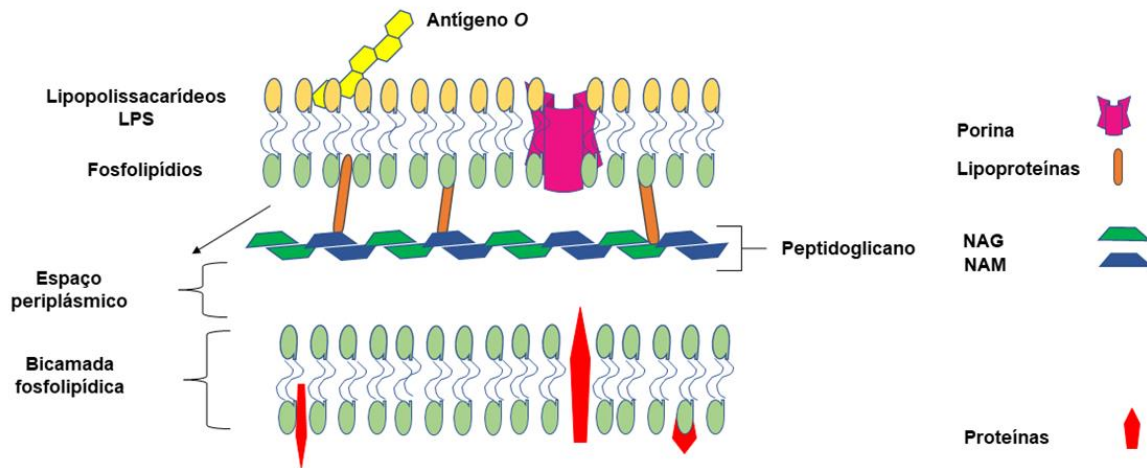
As bactérias competem numa corrida fisiológica e bioquímica, para se estabelecerem como os micro-organismos mais resistentes aos antimicrobianos atuais. Murray *et al.* (2022) estimaram que o impacto global da resistência antimicrobiana (RAM) em 2019 por bactérias, causaram um pouco mais de 1,2 milhões de mortes em todo o mundo, e o alarmante número de 471 milhões de notificações, as projeções indicam que para o ano de 2050 este número atingirá 10 milhões por ano. Evidenciando a necessidade de explorar ambientes que possam contribuir como MSs para o controle de patógenos, assim como elucidar seus modos de ação e alvos a nível celular.

Na citologia das bactérias, algumas estruturas relacionadas à parede celular (encarregada de dar forma, rigidez, divisão celular e processos osmóticos), permitem diferenciar três grupos de bactérias: Gram-negativas, Gram-positivas e micobactérias (Allison; Lambert, 2015; Anderson *et al.*, 2012).

Bactérias Gram-negativas possuem uma estrutura diferenciada, a sua membrana plasmática e parede são mais finas, no entanto, sua constituição é mais complexa (peptidoglicano e proteínas associadas), relacionada a uma membrana externa contendo glucosamina em vez de glicerol (lipídio A6), e lipopolissacarídeos (LPS), que determinam sua toxigenicidade e antigenicidade (Raetz, 2007). A membrana mais externa representa uma barreira limitante em processos de absorção de moléculas (substância não hidrofóbica), também contam com proteínas chamadas porinas que permitem que moléculas hidrofílicas se difundam através da membrana, um polissacarídeo central (geralmente contendo alguns

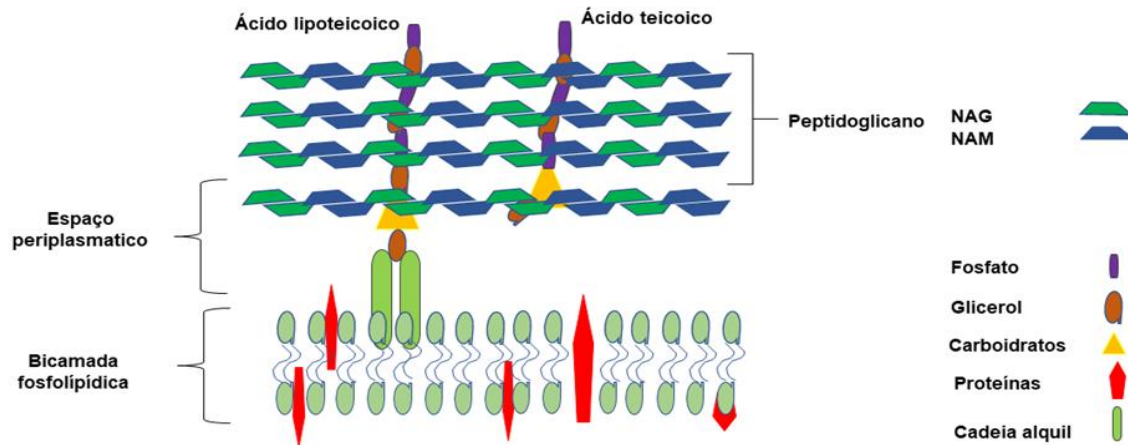
açúcares bastante incomuns) e uma cadeia lateral polissacarídica do antígeno O (Allison; Lambert, 2015; Anderson *et al.*, 2012) (**Figura 18**).

Figura 18. Representação esquemática da parede celular membrana plasmática, e membrana externa de bactérias Gram-negativas. (Fonte: Autor; Adaptado de Anderson *et al.*, 2012).



Bactérias Gram-positivas e micobactérias apresentam estrutura celular similares. As Gram-positivas são cercadas por uma membrana plasmática e parede celular que contêm peptidoglicano (NAG – NAM), ligados a ácidos lipoteicóicos (que consistem em um acilglicerol ligado através de um carboidrato (açúcar) a um poli (glicerofosfato), assim como ácido teicoico. Finalmente, as micobactérias estão constituídas por uma parede celular com peptidoglicano e arabinogalactano, associados a ácidos micólicos (b-hidroxiácidos substituídos por alquila de cadeia longa contendo ou não grupos ciclopropil ou alquenil), assim como grupos com funções oxigenadas. As micobactérias são resistentes a agentes antibacterianos que têm como alvo a síntese da parede celular (como os β -lactâmicos) (Anderson *et al.*, 2012) (**Figura 19**).

Figura 19. Representação esquemática da parede celular membrana plasmática, e membrana externa de bactérias Gram-positivas. (Fonte: Autor; Adaptado de Anderson *et al.*, 2012).



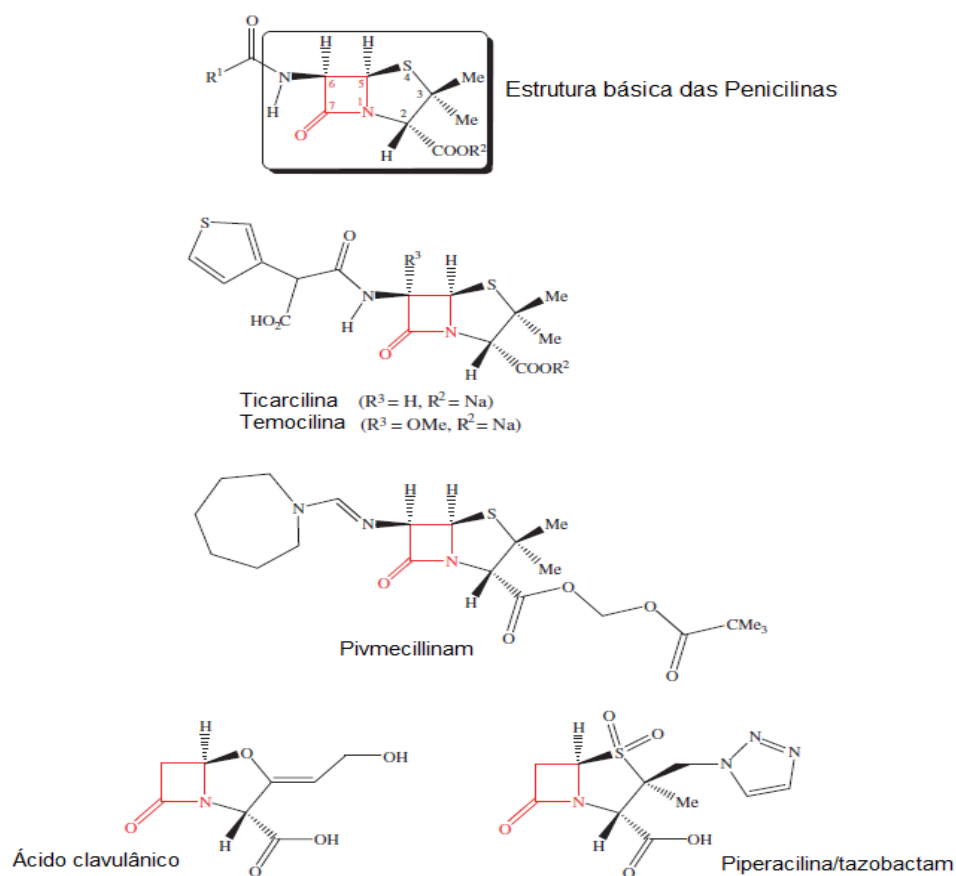
Existem uma maior diversidade de famílias de antimicrobianos de aplicações na saúde humana e animal (Anderson *et al.*, 2012). Um dos interesses na procura de novas moléculas que ajudem a combater essa necessidade crescente de antimicrobianos também está relacionada ao conhecimento dos mecanismos (alvos de ação), com os quais estes compostos inibem o crescimento ou causam a morte de das bactérias (Reygaert, 2018). Agentes antimicrobianos podem atuar interferindo:(1) síntese da parede celular, (2) integridade da membrana plasmática, (3) síntese de ácido nucleico, (4) função ribossômica e (5) síntese de folato (Neu; Gootz, 1996).

a. Parede celular - β -lactâmicos

Os β -lactâmicos incluem penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, exibem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e bactérias Gram positivas (Neu; Gootz, 1996; Reygaert, 2018). Esses agentes atuam inibindo por meio da enzima transpeptidase a proteína de ligação à penicilina (PBP). Esta proteína estrutura os filamentos de peptidoglicano, conferindo rigidez e estabilidade à parede celular bacteriana (Allison; Lambert, 2015; Anderson *et al.*, 2012; Neu; Gootz, 1996). O uso dos β -lactâmicos têm se limitado pela

aquisição de resistência generalizada através do tempo pelas bactérias, porém, ainda são usados para o tratamento de infecções comuns bacterianas (Anderson *et al.*, 2012). Na **figura 20** se mostram antibióticos com anel β -lactâmico, como referência se usa a estrutura básica das penicilinas, para as quais as ações geradas estão relacionadas à síntese, transporte de precursores, ou na sua organização estrutural.

Figura 20. Estrutura básica dos antibióticos penicilina e derivados. Em vermelho o anel β -lactâmico, outros substituintes essenciais para a atividade antibacteriana (Adaptado de Anderson *et al.*, 2012).



b. Agentes antimicrobianos com alvo nas membranas citoplasmáticas bacterianas

A membrana citoplasmática é um componente vital, no entanto, é um alvo mais difícil de ser atingido pelos antibióticos por suas semelhanças com outros tipos de células (Allison; Lambert, 2015). Vários agentes antimicrobianos podem causar desorganização da membrana por sua capacidade de atuar como componentes catiônicos, aniônicos e neutros afetando a polaridade das mesmas (Allison; Lambert, 2015; Neu; Gootz, 2009). A polimixina B e o colistemetato (polimixina E) são compostos octapeptídeos de alto peso molecular, que em bactérias Gram-negativas inibem a interação com lipídios carregados negativamente na superfície da membrana, gerando um deslocamento por competição de cargas (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) dos grupos fosfato carregados negativamente nos lipídios da membrana, promovendo o vazamento celular, no entanto, estes compostos apresentam efeitos colaterais nos rins e sistema nervoso nos indivíduos (Allison; Lambert, 2015; Neu; Gootz, 2009).

c. Agentes atuantes sobre a sínteses do DNA e processos metabólicos

A síntese de DNA ou o metabolismo do ácido nucleico pode ser afetado direta ou indiretamente. Rifamicinas afetam a RNA polimerase dependente de DNA como a doxorrubicina e a actinomicina D (dactinomicina). Quinolonas (**Figura 21**) são antibacterianos sintéticos com maior atividade contra bactérias Gram-negativas e agindo no processo de enrolamento/desenrolamento do DNA, a través da inibição das topoisomerase e DNA-girase, já outros compostos como nitroimidazóis, nitrofuranos podem afetar diretamente o DNA (Anderson *et al.*, 2012) (Tabela 3). Trimetoprima e sulfonamidas (atuantes sinergicamente) são antimicrobianos bloqueadores das vias metabólicas das bactérias, com atividade bacteriostática e bloqueadores dos seus mecanismos de resistência.

Figura 21. Estrutura básica dos antibióticos sintéticos em desenvolvimento relacionados a quinolonas (Adaptado de Anderson *et al.*, 2012).

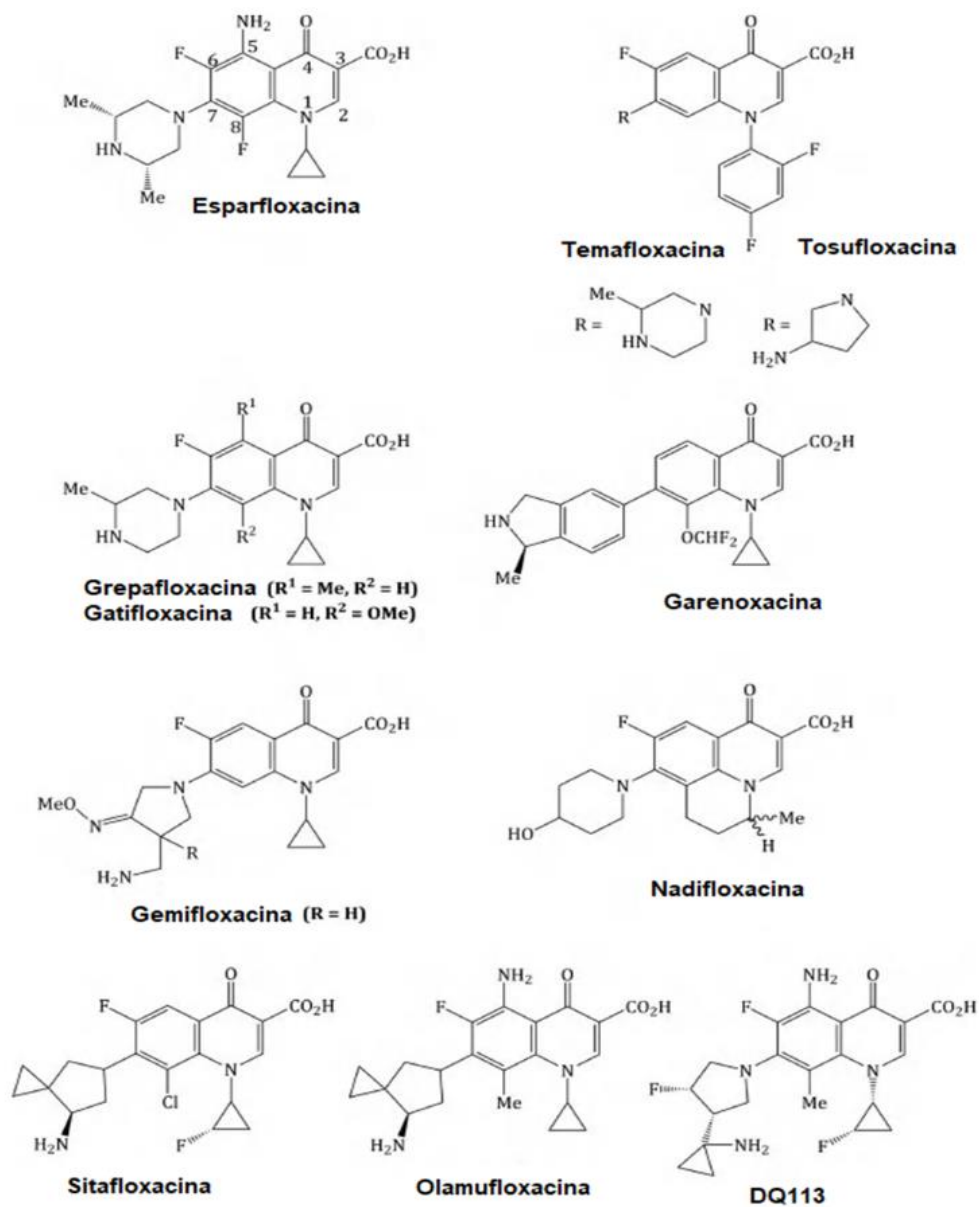


Tabela 3. Antibióticos atuantes na replicação, transcrição e tradução de DNA (Adaptado de Allison; Lambert, 2015; Anderson *et al.*, 2012).

Alvo	Antibiótico	Mecanismo de ação
Biossínteses de precursores	Sulfonamidas	Inibir a síntese de folato
	Trimetoprim, pirimetamina, trimetrexato	Inibir a diidrofolato redutase
Arquitetura do DNA	Quinolonas	Inibir DNA girase
Transcrição	Metronidazol, nitrofurantoína	Quebra de fita de DNA
	Rifampicina, fidaxomicina	Inibir RNA polimerase
Tradução	Aminoglicosídeos	Destorcer a subunidade do ribossomo 30S
	Tetraciclina	Bloquear a subunidade ribossômica 30S
	Cloranfenicol, clindamicina, linezolida, estreptograminas	Inibir a peptidil transferase
	Macrólidos, azalidas	Bloquear translocação
	Ácido fusídico	Inibir o fator de alongamento
	Mupirocina	Inibir a síntese de isoleucil-tRNA

As atividades antibacterianas de metabólitos produzidos por fungos marinhos têm sido amplamente relatadas na literatura (Bajpai, 2016; Devi *et al.*, 2020; Durães *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2021; Hasan *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Alguns agentes antibacterianos obtidos a partir de fungos marinhos, são a essramicina, aiamicina, derivados de benzopironas e derivados cumarínicos (El-Bondkly *et al.*, 2021). No entanto, os mesmos autores ressaltam a necessidade de compreender e elucidar os mecanismos de ação desses compostos.

Wang *et al.* (2022) relacionam os mecanismos moleculares de ação de compostos produzidos por fungos de ambiente marinho. No entanto, este trabalho não contemplou células de bactérias, e sim diferentes linhagens celulares de câncer. Durães *et al.* (2021) avaliaram a capacidade antimicrobiana de compostos obtidos de fungos marinhos dos gêneros *Neosartorya* e *Aspergillus*, assim como seu potencial como inibidores da bomba de efluxo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo este um dos principais mecanismos usados pelas bactérias para fugir da atividade dos antimicrobianos. Reiterando com isso a necessidade de avaliar os mecanismos de ação responsáveis pela atividade antibacteriana, bem

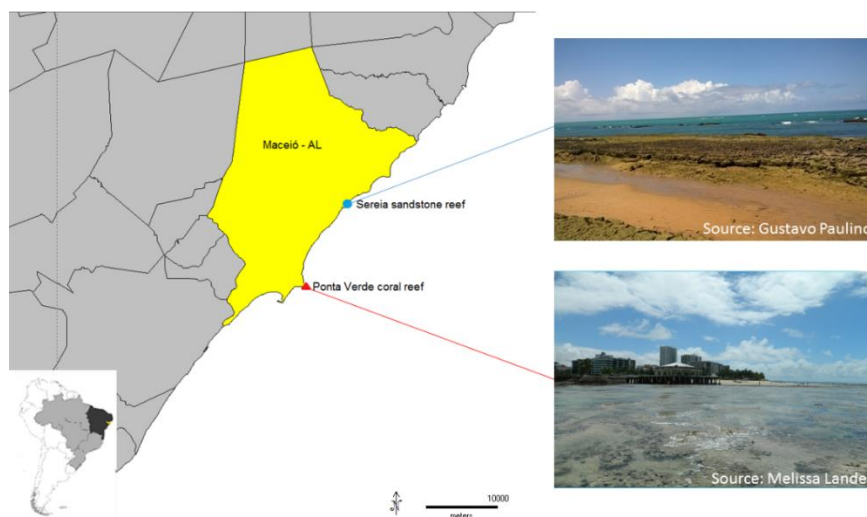
como explorar novas alternativas que permitam compreender o funcionamento destes compostos a nível celular principalmente de compostos novos sintetizados por fungos de ambiente marinho.

4. MÉTODOS

4.1 Seleção das linhagens fúngicas

A micoteca do Laboratório de Diversidade e biotecnologia microbiana - LDBM - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL conta com 89 isolados, 50 obtidos de amostras de coral e 39 de esponjas, os que estiveram relacionados a 43 espécies e 16 gêneros de fungos filamentosos obtidos a partir de corais e esponjas amostradas entre os anos 2014 e 2015, baixo o número de processo (475378/2013-0, 408718/2013-7, e 311553/2018-4) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os isolados foram obtidos nos pontos costeiros localizados em Maceió, nordeste do Brasil: no recife de coral da Ponta Verde (PV) ($9^{\circ} 66' 32'' \text{ S } 35^{\circ} 69' 82'' \text{ W}$) e no recife de arenito da Praia da Sereia (SRE) ($9^{\circ} 56' 52'' \text{ S } 35^{\circ} 64' 49'' \text{ W}$) (**Figura 22**) (Paulino; Felix; Landell, 2020).

Figura 21. Pontos de coleta nos recifes de coral nas praias da Ponta Verde e Recife de arenito na Praia da Serei (Paulino, Félix, Landell, 2019). (Fonte: Ciro R. Félix).



Para realizar a seleção das linhagens fúngicas depositadas na micoteca com potencial biotecnológicos, inicialmente, foi realizada uma avaliação na literatura existente nas bases de dados, para o qual foram definidos os critérios de busca: 1. Epíteto específico + Biotecnologia; 2. Epíteto específico + produção de compostos bioativos, nestes dois foram avaliados os artigos existentes reportados para qualquer ambiente (nicho) de isolamento do fungo (Terrestre, aquáticos ou ar); 3. Epíteto específico + Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana); 4. Epíteto específico + Metabólitos secundários. As combinações de busca (3 – 4) incluíram estritamente fungos marinhos ou de ambiente marinho. A busca por artigos foi realizada nas seguintes bases de dados: Portal de Periódicos da CAPES, Google Acadêmico, Scientific Electronic Library Online (SCieLO), Scopus, PubMed Redalyc e Rdiscovery. Foram selecionadas as espécies para as quais não se apresentaram registros na literatura sobre potencial na produção de compostos bioativos de interesse, atividades antimicrobianas ou qualquer potencial biotecnológico avaliado.

4.2 Preparação dos extratos fúngicos

Os extratos fúngicos foram obtidos seguindo o protocolo de fermentação de fungos para produção de metabólitos secundários (Vinale *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Nesta fase foi realizada uma triagem inicial dos fungos selecionados seguindo a seleção feita baseada nos critérios do literal anterior (3.1). Resumidamente, após reativação as linhagens foram confirmadas em quanto a suas características morfológicas, reportadas no catálogo individual para cada espécie nas bases de dados do LDBM, além disso, foi realizada a pureza dos isolados com repiques consecutivos. Os fungos foram inoculados em Ágar batata dextrose (BDA) (HiMedia™) suplementado com 1% de extrato de levedura e incubados por um período de nove dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, foram inoculados assepticamente aproximadamente 4 cm^2 do cultivo anterior em um volume de 0,1 L de meio líquido contendo (glicose 2%, NaCl 0,45%, KCl 0,45%, extrato de levedura

0.1%), seguido de incubação por 14 dias a uma temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$, em ausência de luz e sem agitação.

No final da incubação, o cultivo foi filtrado e o micélio foi separado do sobrenadante por filtração à vácuo. O micélio foi transferido para um frasco tipo Erlenmeyer e coberto com metanol P.A (aproximadamente o mesmo volume da massa do micélio). Em seguida, foi colocado sob agitação orbital por 2 h a 100 RPM (Incubadora Shaker NT 715 – Novatecnica). Após transcorrido o tempo, o micélio foi separado do metanol por filtração à vácuo e o metanol levado para evaporador rotativo (Fisatom 803). Uma vez evaporado 80% do volume no passo anterior, o extrato metanólico foi misturado com sílica, homogeneizado e aquecida até evaporar o solvente, posteriormente submetido a fracionamento através de coluna de sílica usando solventes de polaridade crescente. Em seguida, cada fração obtida levada para o evaporador rotativo e seca para ser utilizada em análises posteriores.

Para o sobrenadante, foi realizada uma separação líquido-líquido (sobrenadante:acetato de etila-EtOAc) nas proporções de (150:100 mL), por meio da utilização de funil de separação, sendo o solvente em seguida evaporado em evaporador rotativo. Os extratos orgânicos obtidos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana. Posteriormente, os extratos das linhagens que apresentaram algum tipo de atividade antimicrobiana (ver 3.3) foram selecionados e cultivados em volumes maiores (45 L) para a obtenção dos extratos como descrito anteriormente.

4.3 Atividade antimicrobiana

4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana: ensaio de difusão em disco

Para o método de difusão em ágar (Bauer *et al.*, 1966), foram avaliadas diferentes espécies de micro-organismos patogênicos: *Candida albicans* ATCC® 90028, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC® 208821, e as bactérias:

Staphylococcus aureus ATCC® 25904, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Proteus mirabilis* ATCC® 25933 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

A densidade celular para cada micro-organismo testado foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland com um espectrômetro UV/Vis 1600 (Pro-Tools) com valores entre 0,11-0,15 a 530 nm. Posteriormente, os inóculos contendo cada patógeno, foram transferidos com swab para a superfície do meio de cultura, constituindo um tapete homogêneo. Como controle positivo foram usados os seguintes antimicrobianos: Anfotericina B e Fluconazol na concentração de 64 – 8 µg/mL respectivamente, para os fungos, e os antibióticos Tetraciclina 10µg (Laborclin) e Gentamicina 10µg (Laborclin) para bactérias. Da mesma forma, o preparo dos extratos para o teste foi realizado como segue: discos de papel de 5 ± 0,5 mm de diâmetro foram impregnados com 5 µL de cada extrato fúngico solubilizado em mistura de água estéril e dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração final de 2%. Os extratos foram avaliados na faixa de concentração de 300 µg/mL - 50 µg/mL, dependendo da disponibilidade de massa obtida em cada extrato. Em seguida, os discos impregnados foram colocados em meios Ágar Mueller-Hinton (Alere Toxicology) e BHI (Brain Heart Infusion Broth), previamente inoculados com os fungos e bactérias patogênicas avaliadas, respectivamente.

As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h com leituras a cada 24 h. Os halos de inibição (IRs) foram medidos em milímetros (mm), sendo que o ponto onde houve uma diminuição considerável na densidade fúngica (IR-A) e o ponto de inibição completa do crescimento (IR-B) foram medidos. Os ensaios de difusão em disco foram realizados de acordo com o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) para estabelecimento do controle de qualidade e linhagens de referência, utilizando os documentos M44 (CLSIc, 2018) e M02 (CLSIa, 2018), onde todos os extratos de cada linhagem foram avaliados por triplicata em pelo menos duas concentrações de 300-500 µg/mL.

4.3.2 Ensaio para determinar a concentração inibitória mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), na qual se apresentou atividade antimicrobiana dos extratos avaliados contra os micro-organismos patogênicos que mostraram algum tipo de inibição no teste descrito anteriormente (3.3.1). Os inóculos das leveduras foram preparados em meio YEPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de dextrose e 2% de ágar), e para o inóculo das bactérias, estas foram cultivadas em meio de infusão cérebro-coração (BHI) (HiMedia™). A densidade celular foi ajustada para uma escala de McFarland de 0,5 com um espectrômetro UV/Vis 1600 (Pro-Tools) com valores variando de 0,11-0,15 a 530 nm. Posteriormente, os inóculos foram diluídos a 1:50, seguido de 1:20 em meio RPMI 1640 para obter uma concentração celular final entre $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ cfu/mL seguindo os protocolos M27 4ª ed. (CLSI, 2017) para fungos, e para bactérias o M07 11ª ed. protocolos (CLSI, 2018).

Diluições seriadas foram preparadas em microplacas de 96 poços, contendo 100 µL de meio RPMI 1640 (HiMedia™) em cada poço. O volume inicial prévio do processo de diluição seriada continha 200 µL, dos quais 196 µL correspondiam ao inóculo do micro-organismo testado e 4 µL, do extrato testado diluído em DMSO para uma concentração final de 2%. A primeira concentração avaliada foi de 400 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do primeiro poço foi transferida e as diluições seriadas realizada até o poço 10, em concentrações finais entre 400 a 0,781 µg/mL (100 µL). As faixas de concentração de antifúngicos testadas foram 64–0,03 µg/mL (anfotericina B) e 64–0,125 µg/mL (fluconazol). No poço 11, apenas o micro-organismo foi usado como controle positivo (100 µL) do inóculo e no 12 como controle negativo foi utilizado unicamente meio estéril.

4.3.3 Teste de determinação da concentração mínima bactericida/fungicida (MBC/MFC)

Para a determinação da concentração bactericida/fungicida mínima foi usado um subcultivo a partir do teste de CIM. Para isso, onde houve inibição visual do crescimento do micro-organismo e dos poços imediatamente superiores foram tomadas alíquotas de 10 µl e posteriormente inoculado em meio ágar Mueller-Hinton para os fungos e ágar BHI para bactérias. Em seguida incubado a 35 °C por 24 – 48 h. Após a incubação, foi avaliada a presença de crescimento na placa de Petri, e a concentração mínima sem crescimento visível foi tomada como concentração bactericida/fungicida mínima (Kebede; Shibeshi, 2022). Para cada concentração e cada micro-organismos testado o ensaio foi realizado em triplicata.

4.4 Desreplicação dos extratos de fungos filamentosos marinhos

Baseados nos resultados da triagem de bioatividade das linhagens previamente escolhidas, foram realizados estudos adicionais dos extratos, com a finalidade de realizar a anotação dos compostos produzidos por cada uma destas linhagens.

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-VIS SPD-20A (CLAE - UV) no modo semipreparativo

Foram realizadas análises para determinar o tempo de retenção (TR) e o grau de pureza (%) dos extratos e para isso utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu ® (Kyoto, Japão) com Detector UV-VIS SPD-20A (CLAE-UV) modelo SIL-20AHT, com Luna®. Foi utilizada coluna C18 100 Å de 5 µm (250 × 4,6 mm) e comprimento de onda (λ) 254 nm. Todas as amostras foram previamente dissolvidas em metanol de grau HPLC (1 mg/mL). Na fase móvel, um gradiente metanol:água ácida ultrapura (0,1% de ácido fórmico), foi utilizado em todas as execuções do detector CLAE-UV-VIS. A obtenção das frações foi feita utilizando a

metodologia de gradiente de solvente, que iniciou com 7% de metanol (MeOH) e foi mantido por cinco minutos, atingindo 85% até 60 min e depois diminuindo para 7% até 110 min. Se estabeleceu para a análises, uma parametrização específica, sendo (a) 1 mg/mL para a concentração da amostra; (b) 1 mL/min para a vazão; (c) tempo total de 110 minutos; e (d) 5 μ L para o volume injetado. Por fim, todos os valores do tempo de retenção (TR) foram computados em minutos (min), enquanto a absorvância foi computada em unidades de miliabsorvância (mAU) (Beni *et al.*, 2014; de Brito *et al.*, 2017; Passos *et al.*, 2014).

4.4.2 Análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS)

A realização da anotação dos compostos presentes nas amostras analisadas dos extratos fúngicos, foi feita através de um cromatógrafo gasoso (Shimadzu QP2010) acoplado à um espectrômetro de massas (CG-MS), equipado com auto injetor COA-20i. Para a injeção a temperatura foi de 250 °C e aplicado o modo *splitless*. Uma coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) foi usada e os espectros de massa foram obtidos por ionização eletrônica (IE) com energia de ionização de 70 eV. As amostras foram previamente solubilizadas em hexano (5 mg/mL). O volume de injeção das amostras foi de 1 μ L, e o programa de temperatura foi o seguinte: 60-240 °C aumentando 3 °C/min, 240-310 °C aumentando 15 °C/min, e mantido a 310 °C por 10 min (isotérmico). O gás de arraste utilizado foi o hélio e a pressão era de 79,7 kPa. Os índices de retenção (RI) foram calculados utilizando padrões de alceno C8-C40 (Sigma Aldrich). Os constituintes foram identificados comparando os espectros de massa registrados nas bibliotecas NIST, WILEY e FFNSC, já para os índices de retenção, foi utilizada Adams; Spackman, (2007).

4.4 Identificação dos fungos marinhos

4.5.1 Identificação molecular

Uma vez determinado o potencial antimicrobiano das linhagens de fungos selecionadas, foi realizada a identificação molecular dos isolados (Paulino; Félix; Landell, 2020).

A extração do DNA genômico foi realizada cultivando os fungos em condições aeróbias em caldo Sabouraud a 22-25 °C por sete dias. Posteriormente, a cultivo foi centrifugado por 5 min a 6.000 x g (Centrífuga MIKRO 220R – Hettich Lab technology), seguido de descarte do sobrenadante. O micélio foi lavado com água destilada estéril e centrifugado nas mesmas condições. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Em seguida, o micélio foi congelado com nitrogênio líquido e pulverizado com auxílio de almofariz e pistilo. Uma porção do macerado foi transferida para um tubo de 2 mL e adicionado tampão de extração (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS a 2%), seguido de agitação vórtex por 1 min. Posteriormente, o homogeneizado foi incubado por 1 h a 65 °C, e em seguida centrifugado a 18.500 x g por 10 min. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos em gelo e extraídos com solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), uma vez observada a interface clara. Foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e cloreto de sódio a uma concentração final de 200 mM para a precipitação do DNA *overnight* (16h). Seguidamente, foi separado por centrifugação a 18.500 x g por 20 min e lavado com etanol 70%. O sobrenadante foi removido, e o DNA precipitado mantido à temperatura ambiente para secar, ressuspendido com tampão TE (Tris-EDTA pH 7,4) e armazenado a -20°C.

A região ITS do rDNA e o gene *rpb2* foram amplificados utilizando os iniciadores universais ITS1 e ITS4 (Schoch *et al.*, 2012) e 5F2 e 7cR (Sung *et al.*, 2007; Liu; Whelen; Hall, 1999), respectivamente. As condições de amplificação foram: 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 15 s, 56°C por 45 s e 72°C por 90 s, e uma extensão

final a 72°C por 6 min para o Região ITS e os 5 ciclos de 5 min a 94 °C, 45s a 95 °C, 45s a 56 °C e 2 min a 72 °C, seguidos de 5 ciclos com 95 °C, 45s a 53 °C, e 2 min a 72 °C e 30 ciclos com 45s a 95 °C 45s a 50 °C e 2 min a 72 °C para o gene *rpb2* parcial. O processo de sequenciamento de DNA, foi realizado utilizando os mesmos conjuntos de oligonucleotídeos na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil) em um Analisador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA). As sequências foram analisadas e editadas utilizando o software Mega 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021), posteriormente comparadas com o banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando a ferramenta BLASTn, e as análises realizadas com as sequências tipo para cada espécie.

4.5.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada para a linhagem reportada como potenciais espécies novas no trabalho prévio de Paulino *et al.* (2020), e que apresentou atividade antimicrobiana nos testes de triagem. Os meios de cultura utilizados para determinar as variações estruturais macroscópicas e microscópicas, assim como a determinação e avaliação de estruturas reprodutivas) foram Ágar aveia (AA), Ágar extrato de malte (AEM) e Ágar batata dextrose (ABD). Os cultivos foram incubados a 28 °C, com ausência de luz por até 60 dias. As lâminas foram preparadas com água destilada estéril para estudar as estruturas micromorfológicas por exemplo, ascomas/conidíomas maduros, ascósporos/conídios e células asci/conidiogênicas (Hou *et al.*, 2020).

Capítulo I

Fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos na Amazônia azul: Triagem do potencial biotecnológico e descrições morfológica e molecular da espécie *Epicoccum chloridis* FMPV 05

Resumo

As condições bióticas e abióticas no oceano influenciam ou modulam os processos ecológicos. Recifes de coral são ecossistemas marinhos importantes, onde apresentam-se as mais diversas interações entre hospedeiros geralmente invertebrados e sua microbiota, entre elas fungos. Fungos marinhos são promotores de processos que buscam a estabilidade de seus hospedeiros e o equilíbrio nas condições desse ambiente. Estima-se que só 1% das espécies de fungos marinhos têm sido descritas, de um total calculado de cerca de 10 mil espécies. A quimiodiversidade fúngica é uma fonte prolífica e essencial na busca de moléculas antimicrobianas. Objetivou-se neste trabalho, avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos do ambiente marinho da Zona Econômica Exclusiva - Amazônia azul, na produção de compostos com propriedades antimicrobianas. Nove espécies foram selecionadas a partir da micoteca do Laboratório de Diversidade e Biotecnologia Microbiana - UFAL, e a capacidade de síntese de metabolitos secundários (MSs) com atividade antimicrobiana foi avaliada. Cinco extratos orgânicos de polaridades diferentes foram testados e a atividade antimicrobiana determinada para cada linhagem, através do método Kirbi-Bauer de difusão em disco. As espécies *Epicoccum chloridis* FMPV 05 e *Aspergillus sydowii* FMPV 10 foram consideradas promissoras como antagonistas dos patógenos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. As relações filogenéticas da linhagem *E. chloridis* FMPV 05 foi avaliada dentro do gênero utilizando análise multigênica e realizado o primeiro relato de suas características macro e micro morfológicos. Finalmente, as linhagens *E. chloridis* FMPV 05 e *A. sydowii* FMPV 10 se mostram promissoras na síntese de

MSs com potenciais antimicrobianos. Estas análises preliminares permitiram elaborar novas perguntas e hipóteses sobre o potencial biotecnológico destas linhagens, para o qual, outras análises biológicas e químicas são necessárias.

1. Introdução

Os recifes de coral tropicais contribuem com grande parte da produtividade marinha, e considerados pontos críticos na estabilidade ecossistêmica, apresentando diversas associações entre macro e micro-organismos, em particular fungos filamentosos que promovem a criação de novos nichos e estimulam os processos de diversificação (Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022; Silveira *et al.*, 2017).

Petersen em 1905 é considerado o pioneiro em trabalhar com fungos filamentosos marinhos neste ambiente (Abdel-Azeem *et al.* 2021). Porém, estudos sobre a diversidade taxonômica e funcional dos fungos não são tão abrangentes (Bahram; Netherway, 2022; Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022). Por outro lado, Roik *et al.* (2022) mostraram o panorama geral dos trabalhos que envolvem diversidade e taxonomia de fungos marinhos associados a recifes de coral.

Paulino *et al.* (2020) avaliaram a diversidade de fungos marinhos associados a corais e esponjas num ponto d região Setentrional do Oceano Atlântico no Brasil. A diversidade por eles reportada corresponde a entre o 25-30% das espécies reportadas para estes ambientes (Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Fungos frequentemente relatados em corais. Se indicam as classes taxonômicas, e gêneros/espécies reportados. I. relaciona fungos ascomycetos, II. relaciona os basidiomicetos, outros grupos de fungos também são reportados (Adaptado de Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022).

I. Espécies do filo <i>Ascomycota</i> corresponde a 90% dos táxons relatados associados a corais					
Classe	Gênero / Espécie	Classe	Gênero / Espécie	Classe	Gênero / Espécie
Sordariomicetos	<i>Lindra</i> sp.	Sacaromicetos	<i>Candida</i> spp.	Dotideomicetos	<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Hialorriocladiella</i> sp.		<i>Hifopiquia</i> sp.		<i>Micosphaerella</i> sp.
					<i>Alternaria</i> sp.

	<i>Fialospora</i> sp.	<i>Eurotiomicetos</i>	<i>Aspergillus sydowii</i> / sp.		<i>Estefílio</i> sp.
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Foma</i> sp.
	<i>Xilária</i> sp.		<i>Talaromyces</i> sp.		<i>Bissotécio</i> sp.
	<i>Trichoderma</i> sp.		<i>Hortéia werneckii</i> / sp.		<i>Lofiostoma</i> sp.
	<i>Clonostachys rosa</i>	<i>Dotideomicetos</i>			<i>Microsphaeropsis</i> sp.
	<i>Cordyceps</i> sp.				<i>Pirenochaetopsis</i> sp.
II. Espécies do filo <i>Basidiomycota</i> são menos relatados em comunidades de fungos associados a corais.					
Classe	Gênero / Espécie				
<i>Agaricomycetos</i>	<i>Flammulina</i> sp.				
	<i>Schizophyllum</i> sp.				
<i>Malasseziomicetos</i>	<i>Malassezia globosa</i> / <i>Malassezia</i> spp.				

A obtenção de produtos naturais marinhos (PNMs), assim como suas aplicações biotecnológicas no Brasil teve seu auge a começo do século XXI, onde fungos filamentosos contam com alguns reportes na produção de compostos de classes químicas diversificadas, como alcaloides, peptídeos e policetídeos com atividades anticancerígenas, antimicrobianas e antioxidantes (Berlinck et al., 2004; 2017).

Mais recentemente, avanços nas técnicas de elucidação de compostos e esforços multidisciplinares têm levado à descoberta de vários metabólitos bioativos produzidos por fungos e outros micro-organismos no mar de Brasil (Ióca, 2018). Destacando os fungos deste ambiente como sendo responsáveis por 13% da obtenção compostos reportados, destacando os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma*, e algumas espécies de *Aspergillus* e *Curvularia* (Ióca et al., 2014; 2018), apresentando destacados potenciais biológicos como, atividade antimicrobiana, potencial entomopatogênico, anticâncer, inibidor de biofilme, potencial citotóxico, Anti-*Trichomonas vaginalis* e antiplasmodial (da Costa Souza et al., 2016; de Amorim et al., 2023; Edres et al., 2022; Felício et al., 2015; Loges et al., 2020; Saraiva et al., 2015; Scopel et al., 2017; Wilke et al., 2021).

Dentro da diversidade de fungos associados aos recifes de coral no Brasil, está a linhagem FMPV 05 associada ao gênero *Epicoccum* (Ascomycota, Didymellaceae) (Paulino; Félix; Landell, 2020). Este gênero compreende 44 espécies, das quais existem poucos registros de associações ao ambiente marinho, entre eles estão *E. dickmanii*, *E. purpurascens* e *E. sorghinum* (Wright; Osterhage; König, 2003; Braga *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2021). Já *E. nigrum* é considerada uma espécie cosmopolita, sendo isolada de diferentes substratos no ambiente marinho (corais, peixes, algas marinhas, manguezais, leito marinho, esponjas) (Ahumada-Rudolph *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2019; Qader *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2019).

Espécies de *Epicoccum* spp. produzem MSs bastante quimiodiversos (estrutural e biologicamente), como policetídeos, policetídeos híbridos, dicetopiperazinas, pigmentos, ésteres, e outros constituintes com destacadas atividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, anticarcinogênica, antinematóide e potencial inibidor da replicação do HIV) (Braga *et al.*, 2018; Elkhateeb; Daba, 2019; Hufendiek *et al.*, 2017; Wangun; Hertweck, 2007).

No entanto o conhecimento sobre a diversidade taxonômica e química dos fungos marinhos ainda é limitada, fazendo-se necessário abordar a produção de moléculas únicas com diversas atividades biológicas, principalmente pela demanda crescente de fármacos que auxiliem o controle de patógenos emergentes (Murray *et al.*, 2022). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos do ambiente marinho da Zona Econômica Exclusiva (Amazônia azul), na produção de compostos com propriedades antimicrobianas, assim como corroborar as relações filogenéticas do fungo *Epicoccum chloridis* FMPV 05 através de caracteres morfológicos e moleculares.

2. Metodologia (ver 3.3.1 anterior)

3. Resultados

3.1. Seleção das espécies de fungos filamentosos marinhos com potenciais biotecnológicos

Inicialmente das 43 espécies depositadas na micoteca do LDBM-UFAL das quais 27 foram obtidas do de corais, sete de esponjas e nove das espécies compartilhadas nos dois substratos. Mais de 50% das espécies apresentaram reportes na literatura relacionadas à potencial biotecnológico. As principais atividades relacionadas foram antimicrobianas, antivirais, antiplasmodiais, anticarcinogênicas, antiprotozoários, anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica. As espécies selecionadas (n = 21), foram categorizadas com bases nos critérios de busca estabelecidos (secção 3.1), determinando como prioritárias, aquelas que não apresentaram ocorrência na literatura quanto à produção de produtos naturais (PNs), e/ou aplicações biotecnológicas, seguidas daquelas que apresentavam potenciais relevantes reportados na literaturas (ex. espécies potencialmente patogênicas para hospedeiros marinhos), e finalmente aquelas que foram reportadas como potenciais espécies novas (Paulino; Félix; Landell, 2020) (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de fungos filamentosos marinhos reportados por Paulino; Félix; Landell, (2020), selecionadas para avaliação da obtenção de produtos naturais advindos de micro-organismos marinhos (PNMMs) com potenciais aplicações biotecnológicas. Os códigos FMPV correspondem a fungos isolados na Praia da Ponta Verde, e (FMS) aos da Praia da Sereia. O (X), corresponde às linhagens selecionadas e avaliadas neste trabalho

Linhagem	Identificação molecular	Espécie do hospedeiro	Tipo de hospedeiro	Prioritários
FMPV 02	<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Taedania ignis</i>	Esponja	X
FMPV 05	<i>Epicoccum chloridis</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	X
FMPV 10	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Haliclona chlorilla</i>	Esponja	X
FMPV 11	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	X
FMPV 12	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Chondrilla nucula</i>	Esponja	X
FMPV 14	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	<i>Favia gravida</i>	Coral	X
FMPV 21	<i>Penicillium paneum</i>	<i>Biemna caribea</i>	Esponja	
FMPV 28	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	<i>Taedania</i> spp.	Esponja	
FMS 055	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	

FMS 066	<i>Penicillium pedernalense</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	X
FMS 069	<i>Aspergillus stromatoides</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	
FMS 084	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	
FMS 085	<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	
FMS 094	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	
FMS 099	<i>Penicillium tropicum</i>	<i>Zoanthus sociatus</i>	Coral	
FMS 104	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp.	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	X
FMS 107	<i>Penicillium terrigenum</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Coral	
FMS 60	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	
FMS 68	<i>Cladosporium halotolerans</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Coral	
FMS 70	<i>Cordyceps pruinosa</i>	<i>Zoanthus sociatus</i>	Coral	
FMS 96	<i>Aspergillus tonnophilus</i>	<i>Zoanthus sociatus</i>	Coral	

3.2. Obtenção dos extratos e avaliação de atividade antimicrobiana

3.2.1. Produção e obtenção dos extratos

As espécies selecionadas foram *A. ruber* FMPV 02; *E. chloridis* FMPV 05; *A. sydowii* FMPV 10; *A. flavus* FMPV 11; *Curvularia* sp. FMPV 12; *P. pedernalense* FMS 066; *Pyrenochaetopsis* sp. FMS 104. As massas dos extratos obtidos a partir dos solventes *n*-hexano, clorofórmio-CHCl₃; acetato de etila-EtOAc, e metanol-MeOH para o micélio, e do sobrenadante ao partir do solvente orgânico EtOAc relacionam-se na **tabela 3**.

Tabela 3. Extratos obtidos das espécies de fungos filamentosos marinhos selecionados para a avaliação da atividade antimicrobiana, mostrando a origem do extrato, solvente utilizado e as massas em miligramas (mg) e microgramas (µg).

Código linhagem	Origem do extrato	Solvente	Massa mg	Massa µg
FMPV 02	Intracelular-Micélio	MeOH	35,1	35100
FMPV 02	Intracelular-Micélio	MeOH	39,1	39100
FMPV 02	Intracelular-Micélio	MeOH	59,7	59700
FMPV 02	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	19,7	19700
FMPV 02	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	12,7	12700
FMPV 02	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	18,6	18600
FMPV 02	Intracelular-Micélio	EtOAc	11,3	11300
FMPV 02	Intracelular-Micélio	EtOAc	10,3	10300
FMPV 02	Intracelular-Micélio	EtOAc	19,9	19900
FMPV 02	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	9,2	9200
FMPV 02	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	10,9	10900
FMPV 02	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	13,6	13600
FMPV 02	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	13,4	13400
FMPV 02	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	14,5	14500
FMPV 02	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	10,4	10400

FMPV 05	Intracelular-Micélio	MeOH	19,6	19600
FMPV 05	Intracelular-Micélio	MeOH	21,3	21300
FMPV 05	Intracelular-Micélio	MeOH	42,6	42600
FMPV 05	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	10,4	10400
FMPV 05	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	13,7	13700
FMPV 05	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	11,9	11900
FMPV 05	Intracelular-Micélio	EtOAc	16	16000
FMPV 05	Intracelular-Micélio	EtOAc	14,1	14100
FMPV 05	Intracelular-Micélio	EtOAc	26,4	26400
FMPV 05	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	16,9	16900
FMPV 05	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	18,8	18800
FMPV 05	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	10,6	10600
FMPV 05	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	9,9	9900
FMPV 05	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	11,5	11500
FMPV 05	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	12,3	12300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	MeOH	66,8	66800
FMPV 10	Intracelular-Micélio	MeOH	152,8	152800
FMPV 10	Intracelular-Micélio	MeOH	206	206000
FMPV 10	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	14,2	14200
FMPV 10	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	10,5	10500
FMPV 10	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	15,3	15300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	EtOAc	10,3	10300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	EtOAc	11	11000
FMPV 10	Intracelular-Micélio	EtOAc	14,3	14300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	10	10000
FMPV 10	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	11,5	11500
FMPV 10	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	14,3	14300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	13,1	13100
FMPV 10	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	14,3	14300
FMPV 10	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	17,1	17100
FMPV 11	Intracelular-Micélio	MeOH	16	16000
FMPV 11	Intracelular-Micélio	MeOH	34,5	34500
FMPV 11	Intracelular-Micélio	MeOH	221,1	221100
FMPV 11	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	8,2	8200
FMPV 11	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	11,1	11100
FMPV 11	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	23,9	23900
FMPV 11	Intracelular-Micélio	EtOAc	0,2	200
FMPV 11	Intracelular-Micélio	EtOAc	10,4	10400
FMPV 11	Intracelular-Micélio	EtOAc	13,7	13700
FMPV 11	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	12,3	12300
FMPV 11	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	15	15000
FMPV 11	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	16,1	16100
FMPV 11	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	10,3	10300
FMPV 11	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	11	11000
FMPV 11	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	12,6	12600
FMPV 12	Intracelular-Micélio	MeOH	68,7	68700
FMPV 12	Intracelular-Micélio	MeOH	79,2	79200
FMPV 12	Intracelular-Micélio	MeOH	122,8	122800
FMPV 12	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	12,5	12500
FMPV 12	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	13,3	13300
FMPV 12	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	15,4	15400
FMPV 12	Intracelular-Micélio	EtOAc	9,1	9100
FMPV 12	Intracelular-Micélio	EtOAc	12,9	12900
FMPV 12	Intracelular-Micélio	EtOAc	11,8	11800

FMPV12	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	12,3	12300
FMPV 12	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	14,1	14100
FMPV 12	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	18,5	18500
FMPV 12	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	10,5	10500
FMPV 12	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	11,8	11800
FMPV 12	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	14,9	14900
FMS 104	Intracelular-Micélio	MeOH	38,4	38400
FMS 104	Intracelular-Micélio	MeOH	52,1	52100
FMS 104	Intracelular-Micélio	MeOH	56,7	56700
FMS 104	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	11,9	11900
FMS 104	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	12,3	12300
FMS 104	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	13,4	13400
FMS 104	Intracelular-Micélio	EtOAc	13,8	13800
FMS 104	Intracelular-Micélio	EtOAc	13,9	13900
FMS 104	Intracelular-Micélio	EtOAc	14,4	14400
FMS 104	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	10,2	10200
FMS 104	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	11,3	11300
FMS 104	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	9,5	9500
FMS 104	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	12,7	12700
FMS 104	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	13,1	13100
FMS 104	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	13,8	13800
FMS 66	Intracelular-Micélio	MeOH	32,9	32900
FMS 66	Intracelular-Micélio	MeOH	50,6	50600
FMS 66	Intracelular-Micélio	MeOH	70,5	70500
FMS 66	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	10,1	10100
FMS 66	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	10,5	10500
FMS 66	Extracelular-Sobrenadante	EtOAc	12,3	12300
FMS 66	Intracelular-Micélio	EtOAc	11,4	11400
FMS 66	Intracelular-Micélio	EtOAc	11,6	11600
FMS 66	Intracelular-Micélio	EtOAc	12,7	12700
FMS 66	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	15,8	15800
FMS 66	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	19	19000
FMS 66	Intracelular-Micélio	CHCl ₃	17,5	17500
FMS 66	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	17,6	17600
FMS 66	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	19,2	19200
FMS 66	Intracelular-Micélio	<i>n</i> - Hexano	16,7	16700

3.2.2. Triagem para determinação da atividade antimicrobiana

Os extratos foram avaliados como antagonistas dos patógenos *Candida albicans* ATCC® 90028, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC® 208821, e as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904, e *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Proteus mirabilis* ATCC® 25933 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e mostraram perfis diferentes.

A triagem inicial mostrou atividade antimicrobiana dos extratos obtidos dos sobrenadantes a partir do solvente orgânico EtOAc das linhagens *E. chloridis* FMPV

05 e *A. sydowii* FMPV 10. Os valores mínimos e máximos dos graus de inibição (IRs) obtidos para as triplicatas foram apresentados em milímetros (mm) (**Tabela 4**). Nenhum dos outros extratos obtidos, a partir das demais linhagens avaliadas, mostraram atividade nas concentrações testadas.

Tabela 4. Extratos EtOAc – Sobrenadante, dos fungos marinhos que apresentaram atividades biológicas para os patógenos emergentes testados. As concentrações testadas para as duas linhagens foram de 500 µg/mL, as medições em milímetros (mm) correspondem ao halo de inibição.

	Fungos com extratos bioativos	
	<i>E. chloridis</i> FMPV 05	<i>A. sydowii</i> FMPV 10
Micro-organismos testados		
<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028	11,5 - 12,8 mm	9,5 - 10,2 mm
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC® 208821	10 - 12 mm	12,5 - 13,7 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25904	12 - 13 mm	NPI*
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	NPI*	NPI*
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 25933	NPI*	NPI*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	NPI*	NPI*

*(NPI), indicam que não houve inibição para esse patógeno,

3.3. Caracterização morfológica e molecular de *E. chloridis* FMPV 05

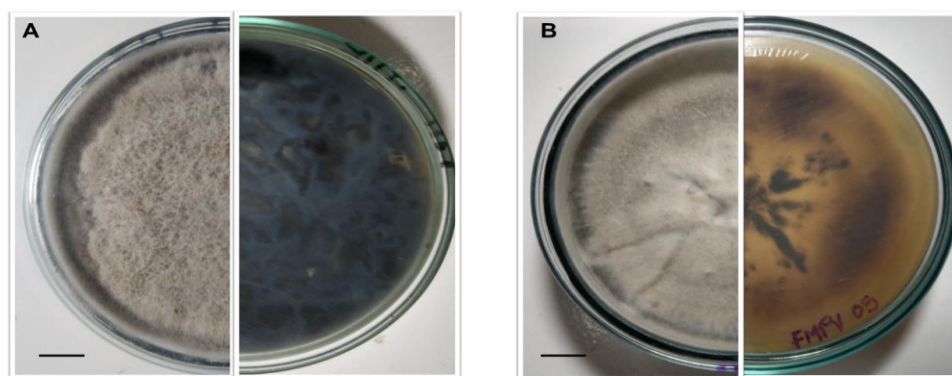
3.3.1. Macro e micromorfologia

A identificação da espécie foi baseada em análises macro e micromorfológica, assim como análises com marcadores moleculares específicos para este grupo de fungos filamentosos (Hou *et al.*, 2020). A morfologia mostra as características dos conidiomas/ascomatos, bem como a presença de micélios/cerdas fora dos conídios/ascomatos, o número de ostíolos, a espessura da parede picnidia/pseudotecial, o formato celular da parede picnidial/pseudotecial; e o comprimento e largura das células conidiogênicas/ascos e conídios/ascósporos.

Para as características macroscópicas: do crescimento fúngico em meio ABD atingiram 40-45 mm de diâmetro após 7 dias, mostrando uma margem regular,

cobertas por micélio abundante aéreo branco/rosa a cinza pálido com formato de algodão, verso de cor marrom claro (**Figura 1A**). Colônias em meio AA atingiram 40 mm de diâmetro após 7 dias a 25°C, com margem regular, micélio aéreo em forma de vilosidades, branco a cinza; verso marrom escuro a preto (**Figura 1B**). As colônias em meio AEM apresentam características semelhantes ao crescimento em AA com um micélio menor e uma cor marrom claro a bege escuro com verso de cor marrom escuro.

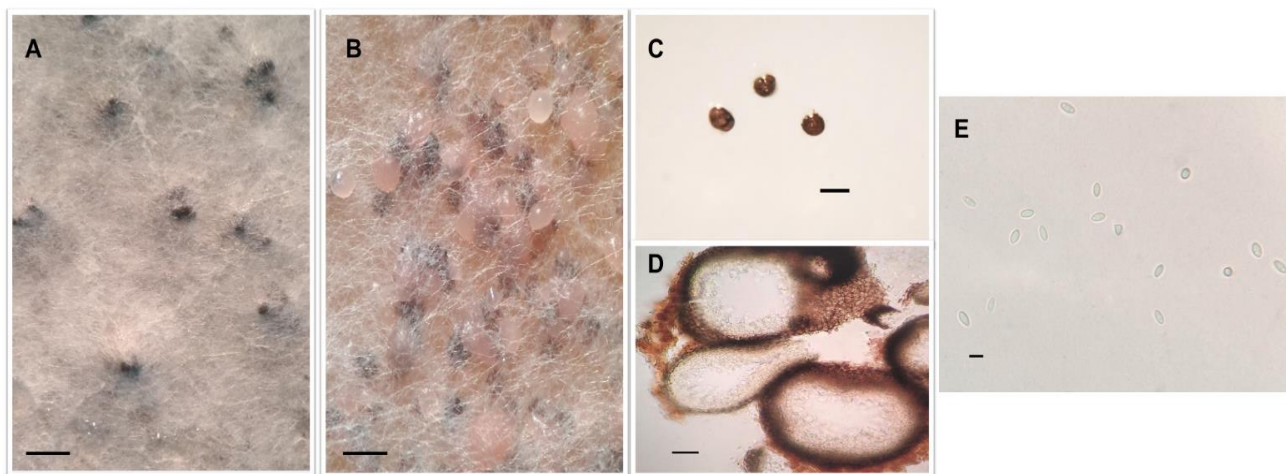
Figura 1. *E. chloridis* FMPV 05 crescendo em meio ABD, frente e verso (A); e em meio AA, frente e verso (B), após 7 dias de inoculado. Barra inferior esquerda 1 cm.



O meio AA se mostrou a melhor fonte para as análises de produção de estruturas conidiomatas para o FMPV 05. Os picnídios foram encontrados semisubmersos a submerso no ágar, formando agregações proeminentes quando submerso, na superfície formou-se mais disperso, em sua maioria (subgloboso a globoso irregular, marrom escuro a preto em estado maduro, os picnídios imaturos apresentaram uma coloração rosa pálido se obscurecendo com o tempo (**Figura 2A-B**). As paredes dos picnídios apresentaram camadas finas de células, com protuberâncias de hifas, ostiolados, 120–350 × 135–265 µm, ostíolo único ligeiramente papilado (**Figura 2C**). Parede picnidial de aspecto pseudoparenquimatoso, composta por células subglobosas, 3 a 5 camadas, 14 a 24,5 µm de espessura, com duas ou mais camadas de células externas levemente pigmentadas, com células fialídicas

conidiogênicas, hialinas, globosas a ampuliformes, $4,5\text{--}7,5 \times 3,5\text{--}7 \mu\text{m}$ (**Figura 2D**). Conídios ovóides pouco elipsóides, hialinos, lisos e de paredes finas, $3,2\text{--}5 \times 2,7\text{--}3,1 \mu\text{m}$, matriz de conídios hialinos (**Figura 2E**).

Figura 2. *E. chloridis* FMPV 05 crescendo em meio AO, picnídios maduros (A), imaturos (B) barra inferior esquerda (0,2 cm). Picnídios com ostíolo único ligeiramente papilado, barra inferior direita 250 μm (C). Corte longitudinal, parede picnídica e células anexas (D) barra inferior esquerda 50 μm . Conídios ovóides (E), barra inferior esquerda 4 μm .



3.3.2. Análises molecular

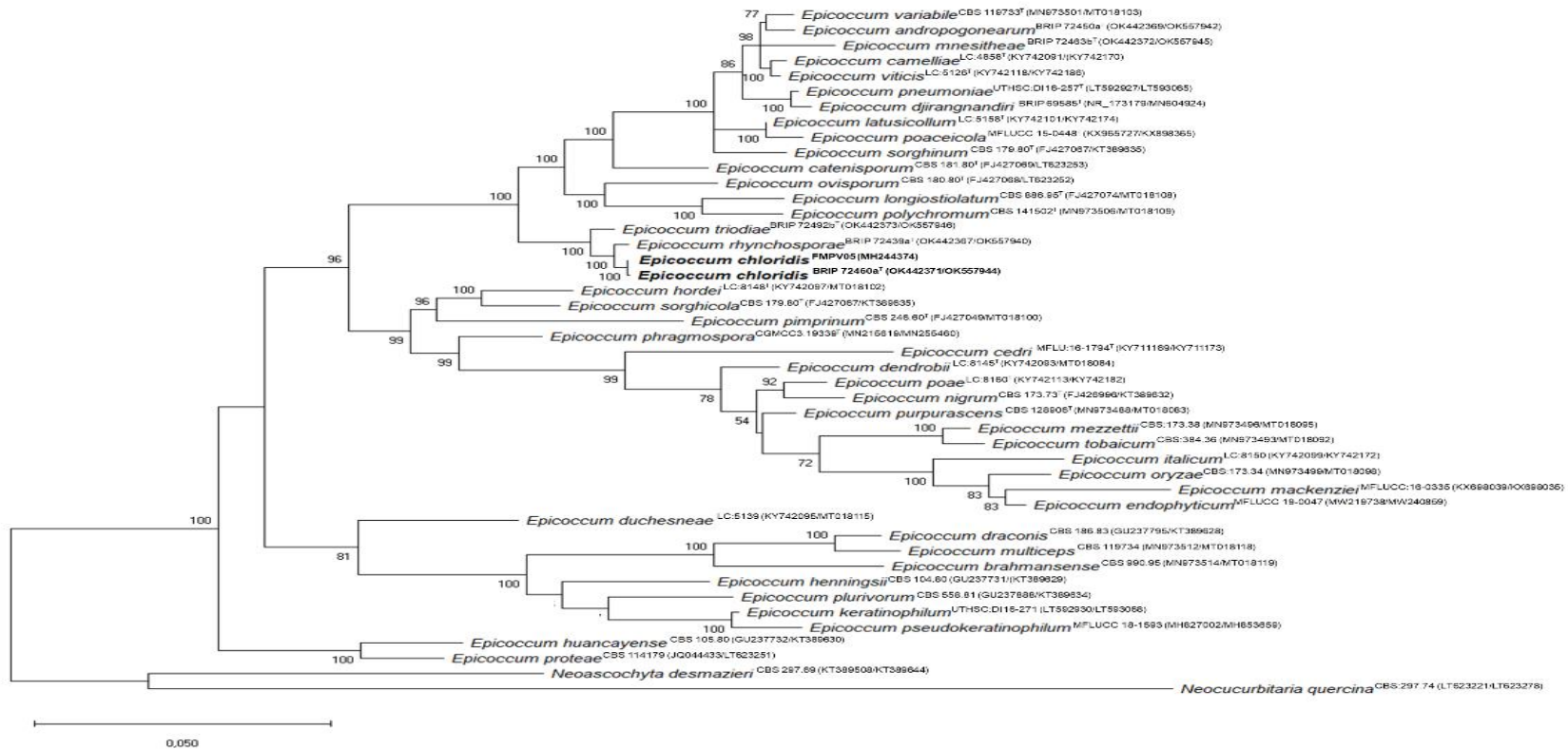
Análises individuais para a região ITS e o gene *rpb2* da linhagem FMPV 05 foram feitas no megablast por meio da avaliação de sequências de nucleotídeos no banco de dados do NCBI GenBank (5 de setembro de 2023). As linhagens com maior grau de similaridade usando sequências da região ITS foram; “*Epicoccum triodiae*” (BRIP 72492b, GenBank NR176182) Identities = 833/839 (99,78%), 1 Gap (0%); *Epicoccum chloridis*” (BRIP 72460a, GenBank NR176181) Identities = 824/839 (99,4%), 1 Gap (0%); “*Dothideomyces* sp.” (PS1, GenBank MK685125); Identities = 822/839 (99,34%), 1 Gap (0%); “*Phoma* sp.” (JL-2016a), GenBank LT555228; Identities = 822/839 (99,34%), 1 Gap (0%); “*Phoma* sp.” (Y9), GenBank MT729933; Identities = 822/839 (99,34%), 6Gap (1%);

"*Dothideomycetes* sp." (G1, GenBank KX186684); Identidades = 822/839 (99,34%); "*Phoma* sp." (isolado JMSL-2016), GenBank KU948381; Identidades = 822/839 (99,34%), 5 Gap (1%); "*Phoma herbarum*" (isolado PPH1, GenBank KX443631); Identidades = 813/839 (98,91%), 5 Gap (1%).

Para o gene *rpb2* foram *Epicoccum chloridis* (BRIP 72460a, GenBank OK557944) Identidades = 1724/1724 (99,89%), 1 Gap (0%); "*Epicoccum rynchosporae*." (BRIP 72439a, GenBank OK557940); Identidades = 1724/1672 (98,52%), 2 Gap (0%); "*Epicoccum triodiae*" (BRIP 72439a, GenBank OK557946) Identidades = 1724/1685 (99,35%), 2 Gap (0%); "*Epicoccum sorghinum*" (HM19bsp, GenBank MT127630; Identidades = 1724/1471 (9,5%), 9 Gap (0%); "*Epicoccum ovisporum*" (CBS 181.80), GenBank LT623253; Identidades = 1724/839 (99,34%), 11 Gap (1%); "*Epicoccum* sp. 2 (NV-2016, GenBank LT593065; Identidades = 1724/1395 (93,16%) 16 Gap (1%). As análises poligênicas mostraram uma relação filogenética mais próxima entre a linhagem FMPV 05 e a de *E. chloridis* BRIP 72460a^T, outras linhagens relacionadas nas análises foram *Epicoccum rynchosporae* BRIP 72439a^T, e *Epicoccum triodiae* BRIP 72439a^T.

A partir das análises individuais pela busca de uma melhor resolução filogenética, foram feitas análises concatenando (ITS - *rpb2*). Estas análises se mostram na **figura 3**.

Figura 3. Árvore filogenética inferida a partir de uma análise de Máxima Verossimilhança baseada em um alinhamento concatenado de sequências ITS e *rpb2* de 45 linhagens representando *Epicoccum* spp. (Didymellaceae), e sequências de grupo externo. Os valores de suporte de inicialização RAXML (MLBS) acima de 50%. A barra de escala representa o número esperado de alterações por site. As espécies-tipo são indicadas com uma letra sobrescrita após o número de acesso (T: ex-type). As espécies são impressas em fonte preta. A árvore está enraizada nas linhagens *Neocucurbitaria quercina* CBS 297.74 e *Neosascochyta desmazieri* CBS 297.69.



Discussão

Espécies do gênero *Aspergillus* são amplamente estudadas e consideradas uma fonte promissora na produção de produtos naturais de ambiente marinho, apresentando diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, anticâncer, antioxidante entre outras (Braga *et al.*, 2018; Elkhateeb; Daba, 2019; Li; Fun; Song, 2023). No entanto, na avaliação dos extratos obtidos a partir das linhagens FMPV 02 e FMPV 11 feitas neste trabalho, não apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos testados.

Resultados semelhantes foram apresentados para as linhagens *Curvularia* sp. FMPV 12; *Pyrenochaetopsis* sp. FMS 104, estas espécies foram selecionadas por seu potencial como espécies novas, e no caso *P. pedernalense* FMS 66; espécie isolada e descrita em 2016 no Equador, associada a estruturas de organismos de ambiente marinho (Laich; Andrade, 2016), possui ainda poucos reportes na literatura sobre suas atividades biológicas.

El Hajj Assaf *et al.* (2020) apresentaram em sua revisão sobre a regulação do metabolismo secundário do gênero *Penicillium* diversas espécies associadas ao gênero com reportes na literatura sobre a produção de metabólitos secundários. *P. pedernalense* não foi relacionada. Recentemente, a linhagem de *P. pedernalense* 604 EAN foi utilizada como precursora a partir de seus produtos metabólicos na síntese de bionanopartículas de prata (Ag-NPs), com a finalidade de avaliar a eficiência na inativação de esporos de fungos, considerados altamente frequentes e de risco em ambiente hospitalar, como são *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus* var. *columnaris* e *A. aculeatus* (Noman *et al.*, 2022).

Os produtos naturais de fungos marinhos resultam das condições presentes em seus habitats e de suas inter-relações com seus hospedeiros, porém em ambiente laboratorial, existem limitações na obtenção destes metabólitos (Frank *et al.*, 2019).

Estes eventos podem estar relacionados ao processo de silenciamento de genes causando inativação de rotas biossintéticas, em respostas às condições de manutenção e de cultura, pelo uso convencional de fontes nutricionais (carbono, nitrogênio, íons, etc), e componentes físicos como (pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio luz entre outros), limitando assim a descoberta de novos compostos com estruturas únicas e potenciais aplicações biológicas (Bode *et al.*, 2002; da Silva Lima *et al.*, 2018; Frank *et al.*, 2019).

Por outro lado, as linhagens *E. chloridis* FMPV 05 e *A. sydowii* FMPV 10 mostraram ter atividade principalmente contra os patógenos fúngicos *C. albicans* ATCC® 90028 e *Cr. neoformans* ATCC® 208821. Destacamos que *A. sydowii* pode ser considerada uma espécie cosmopolita, isolada de diversos ambientes terrestres e aquáticos. No mar tem relatos de ser parte da microbiota de recifes de coral, mas também, como uma espécie considerada patogênica oportunista, principalmente acometendo corais do gênero *Gorgonia* (Hayashi *et al.*, 2016; Soler-Hurtado *et al.*, 2016). Além disso, diversos trabalhos mostram o potencial biotecnológico na obtenção de PNMMs, com aplicações na saúde pública e na indústria agropecuária (Kamat *et al.*, 2023; Mohamed *et al.*, 2023). Já por sua vez, a linhagem FMPV 05 foi descrita recentemente (Tan; Shivas, 2022), contando com o reportado em ambiente continental na Austrália, e o reportado de ambiente marinho no presente trabalho. Esta espécie, não conta com nenhum reporte na literatura sobre seu potencial biotecnológico e de avaliação da sua quimiodiversidade.

As linhagens FMPV 05 e FMPV 10, se mostraram como potenciais produtoras de PNMMs, as quais podem fornecer novos metabólitos com estruturas únicas de diversas aplicações. Principalmente, contribuindo com o entendimento dos possíveis papéis ecológicos que estes fungos podem ter nos de recifes de coral, promovendo assim, a compreensão das suas relações ecológicas (Roik; Reverter;

Pogoreutz, 2022). Além disso, estes fungos têm potencial na produção de compostos úteis contra micro-organismos patogênicos considerados de alto risco pela OMS, os quais vem causando inúmeros contágios e mortes, devido a capacidade que estes vêm adquirido na resistência ou tolerância aos antifúngicos e antibióticos disponíveis na atualidade, colocando como prioridade à procura de novas moléculas que possam contribuir com o bem-estar da saúde humana e ambiental (Qader *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2022).

O fungo *E. chloridis* espécie recentemente descrita por Tan; Shivas, (2022), não conta com informações de caráter morfológico. As análises macro e micromorfológicas realizadas a partir da linhagem FMPV 05 mostraram diferenças estruturais com as espécies mais próximas que contam com estas descrições. O gênero *Epicoccum* é o único gênero da família Didymellaceae que produz um morfo hifomicetos, caracterizado pela formação de conídios multisseptados de pigmentação escura (dictioclamidósporos) formados em esporodóquios (Aveskamp *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; 2017; Hou *et al.*, 2020).

Hou *et al.* (2020) descreveram a espécie *Epicoccum longiostiolatum* CBS 886.95, a qual apresenta uma relação filogenética próxima com *E. chloridis* FMPV 05 (**Figura 3**). Morfológicamente estas espécies têm estruturas e composições semelhantes nas estruturas de seus conidiomatas, picnídios característicos com um único ostíolo e células constituintes semelhantes da parede, se diferenciam claramente na forma das conídias, apresentadas de forma mais ovóides e de menor tamanho em *E. chloridis* FMPV 05, também não foram observadas células conidiogênicas. Por outro lado, espécies distantes filogeneticamente, varia no número de ostíolos, apresentam paredes com maior número de camadas de células nos picnídios, como é o caso de *E. sorghinum*, *E. multiceps* (Cheng *et al.*, 2017). Se destaca que as espécies mais próximas *E. triodiae* e *E. rhynchosporae* também

descritas recentemente (TAN; SHIVAS, 2022), não contam com dados morfológicos.

O gênero *Epicoccum* (Ascomycota), nos últimos anos tem sido foco de esforços para estabelecer claramente suas relações filogenéticas (Chen *et al.*, 2015; 2017; Hou *et al.*, 2020). Diversas espécies de Didymellaceae foram reclassificadas e outras realocadas em gêneros como *Epicoccum* spp., isto com o objetivo de redefinir e evidenciar a natureza de suas relações evolutivas (Cheng *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2020). Por outro lado, recentemente Hou *et al.* (2020) realizaram uma revisão utilizando caracteres morfo-fisiológicos, e filogenéticos, através de uma abordagem a partir de regiões marcadores parciais de DNA LSU, ITS, *rpb2* e *tub2*, contribuindo assim para a resolução de gêneros considerados polifiléticos, como é o caso de *Epicoccum*.

Análises filogenéticas individuais da região ITS e o gene *rpb2*, não mostraram uma resolução filogeneticamente eficiente. Portanto, análises multigênicas foram necessárias para contribuir com a elucidação das relações filogenéticas de FMPV 05. Com base em Hou *et al.* (2020), que determinaram que a análise das regiões marcadores *tub2*, *rpb2* e ITS resolveu as relações do gênero *Epicoccum* spp., a combinação da análise filogenética dos loci ITS e *rpb2* utilizada aqui, mostraram uma resolução eficiente nas relações filogenéticas de *E. chloridis* FMPV 05.

Conclusões

As linhagens fúngicas marinhas *E. chloridis* FMPV 05 e *A. sydowii* FMPV 10 se mostraram promissoras na obtenção de extratos com presença de compostos com atividade antimicrobiana, particularmente com atividade antifúngica contra patógenos de alto risco para a saúde humana categorizados pela OMS como *C. albicans* e *Cr. neoformans* e com atividade fraca por parte do FMPV 05 contra *S.*

aureus. Outras análises químicas e biológicas serão necessárias para elucidar as estruturas dos metabólitos produzidos por *E. chloridis* FMPV 05 e *A. sydowii* FMPV 10, assim como seus principais mecanismos de ação contra os patógenos avaliados.

Por outro lado, os caracteres morfológicos e moleculares se mostraram esclarecedores para de estabelecer as relações filogenéticas do fungo marinho *E. chloridis* FMPV 05. Análises multigênicas (ITS e *rpb2*), bem como os caracteres morfológicos contribuíram com a compreensão das relações dentro da família Didymellaceae. *E. chloridis* conta com duas únicas linhagens reportadas até agora, um de ambiente continental na Austrália e a outra apresentada neste trabalho de ambiente marinho associado a recifes de corais. Destacamos que outros trabalhos podem contribuir ainda mais para o conhecimento sobre a distribuição desta espécie.

Referências

AB´SABER, Aziz Nacib. Litoral do Brasil/Brazilian Coast,. **Metalivros**, 1st edition, p. 1–281, 2001.

ABD RASHED, Aswir et al. Antifungal properties of essential oils and their compounds for application in skin fungal infections: Conventional and nonconventional approaches. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1093, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26041093>

ABDEL-AZEEM, Ahmed M. *et al.* (Ed.). Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: **Biodiversity and Ecological Perspectives**. Springer International Publishing, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5>

ADAMS, Robert. P.; SPARKMAN, David. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal American Society Mass Spectrometry**. v. 18, n. 4 p. 803-806, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.001>

AFROZ TOMA, Maria *et al.* Fungal Pigments: Carotenoids, Riboflavin, and Polyketides with Diverse Applications. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 454, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9040454>

AHUMADA-RUDOLPH, Ramón; NOVOA, Vanessa; BECERRA, José. Morphological response to salinity, temperature, and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7166-5>

AINSWORTH, T. D.; FORDYCE, A. J.; CAMP, E. F. The other microeukaryotes of the coral reef microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 980-991, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.007>

ALBAUGH, David *et al.* Cell Wall Active Antifungal Compounds Produced by the Marine Fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256 III. Biological Properties of 15G256γ. **The Journal of antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 317-322, 1998. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.317>

ALLISON, David G.; LAMBERT, Peter A. Modes of action of antibacterial agents. In: **Molecular medical microbiology**. Academic Press, 2015. p. 583-598. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9>

AMEEN, Fuad; ALNADHARI, Saleh; AL-HOMAIDAN, Ali A. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 224-231, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>

ANDERSON, Rosaleen *et al.* **Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications.** John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-0-470-97244-1 (cloth) – ISBN 978-0-470-97245-8 (pbk.)

ANISZEWSKI, Tadeusz. **Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications.** Elsevier, 2015. ISBN: 0444594337,9780444594334

AVALOS, Javier; LIMÓN, M. Carmen. Fungal secondary metabolism. **Encyclopedia**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2021. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>

AVESKAMP, M. M *et al.* Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v. 65, n. 1, p. 1-60, 2010. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>

BAHRAM, Mohammad; NETHERWAY, Tarquin. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 2, p. fuab058, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>

BAI, Hong *et al.* Zebrafish embryo toxicity microscale model for ichthyotoxicity evaluation of marine natural products. **Marine Biotechnology**, v. 18, p. 264-270, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9688-6>

BAJPAI, Vivek K. Antimicrobial secondary metabolites from marine fungi: A mini review. 2016.

BALDRIAN, Petr *et al.* High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. **Fungal Diversity**, v. 114, n. 1, p. 539-547, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y>

BANHA, Thomás NS. *et al.*, The Great Amazon Reef System: A fact. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 1088956, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1088956>

BASSO, Rossana Patricia *et al.* COVID-19-associated histoplasmosis in an AIDS patient. **Mycopathologia**, v. 186, p. 109-112, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00505-1>

BAUER A., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, V. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.

BEHERA, Abhaya Dayini; DAS, Surajit. Ecological insights and potential application of marine filamentous fungi in environmental restoration. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 1-38, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11157-023-09655-2>

BELLWOOD, David R. *et al.* The meaning of the term 'function' in ecology: A coral reef perspective. **Functional Ecology**, v. 33, n. 6, p. 948-961, 2019. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13265>

BENGTSON, Stefan *et al.* Fungus-like mycelial fossils in 2.4-billion-year-old vesicular basalt. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 6, p. 0141, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0141>

BERLINCK, Roberto GS *et al.* Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004. <https://doi.org/10.1021/np0304316>

BERLINCK, Roberto GS *et al.* The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BHADURY, Punyasloke; MOHAMMAD, Balsam T.; WRIGHT, Phillip C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 325, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0070-3>

BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C. *Candidiasis* and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BHATTARAI, Keshab *et al.* Fungal natural products galaxy: Biochemistry and molecular genetics toward blockbuster drugs discovery. **Advances in genetics**, v. 107, p. 193-284, 2021. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.11.006>

BILLS, Gerald F.; GLOER, James B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 6, p. 4.6. 01, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>

BLUNT, John W. *et al.* Marine natural products. **Natural product reports**, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009. <https://doi.org/10.1039/B805113P>

BODE, Helge Björn *et al.* Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9)

BORGMAN, Paul; LOPEZ, Ryan D.; LANE, Amy L. The expanding spectrum of diketopiperazine natural product biosynthetic pathways containing cyclodipeptide synthases. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 17, n. 9, p. 2305-2314, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8OB03063D>

BOSCH, Thomas CG; MILLER, David J. The holobiont imperative. **Vienna: Springer**, v. 10, p. 1 - 10, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1896-2_1

BOVIO, Elena *et al.* Marine fungi from the sponge *Grantia compressa*: biodiversity, chemodiversity, and biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 220, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17040220>

BRAGA, Raíssa Mesquita; PADILLA, Gabriel; ARAÚJO, Welington Luiz. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 6, p. 759-778, 2018. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>

BRAKHAGE, Axel A.; SCHROECKH, Volker. Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>.

BUGNI, Tim S.; IRELAND, Chris M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural product reports**, v. 21, n. 1, p. 143-163, 2004. <https://doi.org/10.1039/B301926H>

CARDOSO, Joana *et al.* Marine-derived compounds and prospects for their antifungal application. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5856, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245856>

CAROLUS, Hans *et al.*, Amphotericin B and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040321>

CARRILLO-MUNOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CARROLL, Anthony R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, 2023. <https://doi.org/10.1039/D2NP00083K>

CHANDRIKA, KVS Mani; SHARMA, Sahida. Promising antifungal agents: A minireview. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 7, p. 115398, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115398>

CHEN, Qian *et al.* A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. **Phytotaxa**, v. 197, n. 4, p. 267-281, 2015. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.197.4.4>

CHEN, Yu *et al.* Halometabolites isolated from the marine-derived fungi with potent pharmacological activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1038487, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1038487>

CHI, Lu-Ping *et al.* Cytotoxic thiodiketopiperazine derivatives from the deep sea-derived fungus *Epicoccum nigrum* SD-388. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 160, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18030160>

COSTELLO, Mark J.; CHAUDHARY, Chhaya. Marine biodiversity, biogeography, deep-sea gradients, and conservation. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R511-R527, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.060>

DA COSTA SOUZA, P. Nirlane *et al.* Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 12-22, 2016. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000168>

DA SILVA LIMA, Gesiane *et al.* Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 39-45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.007>

DE AMORIM, Marcelo R. *et al.* Polyketide-and Terpenoid-Derived Metabolites Produced by a Marine-Derived Fungus, *Peroneutypa* sp. **Journal of Natural Products**, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00175>

DE MAHIQUES, Michel Michaelovitch *et al.* Insights on the evolution of the living Great Amazon Reef System, equatorial West Atlantic. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13699, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50245-6>

DESHMUKH, Sunil K.; PRAKASH, Ved; RANJAN, Nihar. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2536, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02536>

DEVI, Rubee *et al.* Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2020. p. 147-161.

DONG, Yu-Liang *et al.* Diketopiperazine Alkaloids and Bisabolene Sesquiterpenoids from *Aspergillus versicolor* AS-212, an Endozoic Fungus Associated with Deep-Sea Coral of Magellan Seamounts. **Marine Drugs**, v. 21, n. 5, p. 293, 2023. <https://doi.org/10.3390/md21050293>

DURÃES, Fernando *et al.* Metabolites from marine-derived fungi as potential antimicrobial adjuvants. **Marine drugs**, v. 19, n. 9, p. 475, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19090475>

EARP, Hannah S.; LICONTI, Arianna. Science for the future: the use of citizen science in marine research and conservation. In: **YOUMARES 9-The Oceans: Our Research, Our Future: Proceedings of the 2018 Conference for Young Marine**

Researcher in Oldenburg, Germany. Springer International Publishing, 2020. p. 1-19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_1

EBEL, Rainer. Terpenes from marine-derived fungi. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2340-2368, 2010. <https://doi.org/10.3390/md8082340>

EL HAJJ ASSAF, Christelle et al. Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9462, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21249462>

EL MADDAH, Fayrouz; KÖNIG, Gabriele M.; FISCH, Katja M. Non-ribosomal Peptides from Marine-derived Fungi: Chemistry, Bioactivity, and Biosynthesis. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**, v. 4, p. 2261-2322, 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch103>

EL-BONDKLY, et al. Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. **Heliyon**, v. 7, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06362>

ELISSAWY, Ahmed M. et al. Bioactive terpenes from marine-derived fungi. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1966-1992, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13041966>

ELKHATEEB, Waill A.; DABA, Ghoson M. *Epicoccum* species as potent factories for the production of compounds of industrial, medical, and biological control applications. **Biomedical Journal of Scientific and Technical Research**, v. 14, n. 3, p. 10616-10620, 2019. <https://doi.org/10.26717.BJSTR.2019.14.002541>

ENDRES, Carla Teresinha et al. Mass Spectrometry Metabolomics Approach Reveals Anti-*Trichomonas vaginalis* Scaffolds from Marine Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1014-1022, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10164-6>

FELÍCIO, Rafael de et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 641-650, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.003>

FENG, Yuanyuan et al. Responses of marine microbes to multiple environmental drivers of global change: The interplay of abiotic and biotic factors. **Frontiers Microbiology**, n. 6, v. 13, 975841, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.975841>

FISHER, Matthew C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>

FOSTEL, Jennifer M.; LARTEY, Paul A. Emerging novel antifungal agents. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 1, p. 25-32, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01430-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01430-0)

FRANK, Marian *et al.* Cryptic secondary metabolites from the sponge-associated fungus *Aspergillus ochraceus*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 99, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17020099>

GARCIA-RUBIO, Rocio *et al.* The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>

GERWICK, William H.; FENNER, Amanda M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial ecology**, v. 65, p. 800-806, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0169-9>

GHIZELINI, Angela Michelato *et al.* Fungal communities in oil contaminated mangrove sediments—who is in the mud?. **Marine pollution bulletin**, v. 139, p. 181-188, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.040>

GHIZELINI, Angela Michelato; MENDONÇA-HAGLER, Leda Cristina Santana; MACRAE, Andrew. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1242-1254, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400002>

GIDDINGS, Lesley-Ann; NEWMAN, David J. Bioactive compounds from extremophilic marine fungi. **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, p. 349-382, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_18

GIDDINGS, Lesley-Ann; NEWMAN, David J. Bioactive compounds from extremophiles: genomic studies, biosynthetic gene clusters, and new dereplication methods. **Springer**, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14836-6>

GLADFELTER, Amy S.; JAMES, Timothy Y.; AMEND, Anthony S. Marine fungi. **Current Biology**, v. 29, n. 6, p. R191-R195, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.009>

GOMES, Nelson GM *et al.* Biosynthetic versatility of marine-derived fungi on the delivery of novel antibacterial agents against priority pathogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111756, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111756>

GONÇALVES, Micael FM; ESTEVES, Ana C.; ALVES, Artur. Marine fungi: Opportunities and challenges. **Encyclopedia**, v. 2, n. 1, p. 559-577, 2022. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010037>

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, Ricardo A. *et al.* Overview of fungal terpene synthases and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 194, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03635-y>

GROSSART, Hans-Peter; ROJAS-JIMENEZ, Keilor. Aquatic fungi: targeting the forgotten in microbial ecology. **Current opinion in microbiology**, v. 31, p. 140-145, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.016>

HAN, Jianying *et al.* Genome-inspired chemical exploration of marine fungus *Aspergillus fumigatus* MF071. **Marine drugs**, v. 18, n. 7, p. 352, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18070352>

HANSEN, Frederik T. *et al.* An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*. **Fungal genetics and biology**, v. 75, p. 20-29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.12.004>

HARIKRISHNAN, M. *et al.* Multi-functional bioactive secondary metabolites derived from endophytic fungi of marine algal origin. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100037, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100037>

HASAN, Saba *et al.* Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. **Bioinformation**, v. 11, n. 4, p. 176, 2015. <https://doi.org/10.6026/97320630011176>

HATJE, Vanessa *et al.* Pollutants in the South Atlantic Ocean: sources, knowledge gaps and perspectives for the decade of Ocean Science. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 644569, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.644569>

HATTAM, Caroline. *et al.* Marine ecosystem services: linking indicators to their classification. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 61–75, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.026>

HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016, 2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>

HAY, Mark E. Marine chemical ecology: what's known and what's next?. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 200, n. 1-2, p. 103-134, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02659-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02659-7)

HAYASHI, Aiko *et al.* *Aspergillus sydowii* marine fungal bloom in Australian coastal waters, its metabolites and potential impact on Symbiodinium dinoflagellates. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 59, 2016. <https://doi.org/10.3390/md14030059>

HOEGH-GULDBERG, Ove *et al.* Coral reef ecosystems under climate change and ocean acidification. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 158, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00158>

HOEKSMAN, Jelmer *et al.* A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 17546, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54127-9>

HONG, Qi *et al.* Four previously undescribed diketopiperazines from marine fungus *Aspergillus puniceus* FAHY0085 and their effects on liver X receptor α . **Phytochemistry**, v. 214, p. 113816, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113816>

HOU, L. W. *et al.* The phoma-like dilemma. **Studies in Mycology**, v. 96, p. 309-396, 2020.

HOU, Xue-Mei *et al.* Chemical and bioactive marine natural products of coral-derived microorganisms (2015-2017). **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 38, p. 6930-6941, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190626153819>

HUFENDIEK, Peter. **Enzyme-inhibitory secondary metabolites and their exudation in the marine-derived fungus *Epicoccum nigrum* link.** 2017. Tese de Doutorado. Dissertation, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2017.

HUO, Ruiyun *et al.* New prenylated indole diketopiperazine alkaloids and polyketides from the mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 1097594, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1097594>

IÓCA, Laura P.; ALLARD, Pierre-Marie; BERLINCK, Roberto GS. Thinking big about small beings—the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 5, p. 646-675, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3NP70112C>

IÓCA, Laura P.; NICACIO, Karen J.; BERLINCK, Roberto GS. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 998-1031, 2018. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180016>

JACOBS, Samantha E.; ZAGALIOTIS, Panagiotis; WALSH, Thomas J. Novel antifungal agents in clinical trials. **F1000Research**, v. 10, 2021. <https://doi.org/10.12688/f1000research.28327.2>

JAKUBCZYK, Dorota; DUSSART, Francois. Selected fungal natural products with antimicrobial properties. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 911, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25040911>

JEEWON, Rajesh *et al.* Pharmaceutical potential of marine fungal endophytes. **Endophytes and Secondary Metabolites**, p. 1-23, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76900-4_6-1

CALABON, Mark S. *et al.*, Updates on the classification and numbers of marine fungi. **Botanica Marina**, v. 66, n. 4, p. 213-238, 2023. <https://doi.org/10.1515/bot-2023-0032>

JI, Nai-Yun; WANG, Bin-Gui. Mycochemistry of marine algicolous fungi. **Fungal diversity**, v. 80, p. 301-342, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0358-9>

JIANG, Minghua *et al.* A review of terpenes from marine-derived fungi: 2015–2019. **Marine drugs**, v. 18, n. 6, p. 321, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18060321>

JIN, Liming *et al.* Potential pharmacological resources: Natural bioactive compounds from marine-derived fungi. **Marine drugs**, v. 14, n. 4, p. 76, 2016. <https://doi.org/10.3390/md14040076>

JONES, EB Gareth *et al.* An online resource for marine fungi. **Fungal Diversity**, v. 96, p. 347-433, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5>

JONES, EB Gareth. Fifty years of marine mycology. **Fungal diversity**, v. 50, n. 1, p. 73-112, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0119-8>

JONES, EB Gareth; PANG, Ka-Lai (Ed.). **Marine fungi: and fungal-like organisms**. Walter de Gruyter, 2012. <https://doi.org/10.1515/9783110264067>

KAARI, Manigundan; MANIKKAM, Radhakrishnan; BASKARAN, Abirami. Exploring Newer Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microbial Prospecting. **Marine Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 448-467, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10118-y>

KALRA, Rishu; CONLAN, Xavier A.; GOEL, Mayurika. Fungi as a potential source of pigments: Harnessing filamentous fungi. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, p. 369, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00369>

KAMAT, Siya *et al.* Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. In: **Microbial Biomolecules**. Academic Press, 2023. p. 181-209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00001-6>

KEBEDE, Bedaso; SHIBESHI, Workineh. In vitro antibacterial and antifungal activities of extracts and fractions of leaves of *Ricinus communis* Linn against selected pathogens. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 4, p. 1802-1815, 2022. <https://doi.org/10.1002/vms3.772>

KELECOM, Alphonse. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151-170, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000100012>

KELLER, Nancy P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167-180, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>

KOSSUGA, Miriam H. *et al.* Two polyketides from a co-culture of two marine-derived fungal strains. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 6, p. 1934578X1300800610, 2013. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800>

LAICH, Federico; ANDRADE, Jacinto. *Penicillium pedernalense* sp. nov., isolated from whiteleg shrimp heads waste compost. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4382-4388, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001360>

LAJEUNESSE, Todd C. *et al.* Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. **Current Biology**, v. 28, n. 16, p. 2570-2580. e6, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>

LANG, Gerhard *et al.* New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination and biosynthetic studies. **Tetrahedron**, v. 63, n. 48, p. 11844-11849, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.09.025>

LAWRENCE, Christopher; WEISZ, George (Ed.). **Greater than the parts: holism in biomedicine, 1920-1950**. Oxford University Press, USA, 1998.

LEAL, Miguel Costa *et al.* Marine microorganism-invertebrate assemblages: Perspectives to solve the “supply problem” in the initial steps of drug discovery. **Marine drugs**, v. 12, n. 7, p. 3929-3952, 2014. <https://doi.org/10.3390/md12073929>

LI, Honghua; FU, Yanqi; SONG, Fuhang. Marine *Aspergillus*: A Treasure Trove of Antimicrobial Compounds. **Marine Drugs**, v. 21, n. 5, p. 277, 2023. <https://doi.org/10.3390/md21050277>

LI, Yuanning *et al.* A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, v. 31, n. 8, p. 1653-1665. e5, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074>

LI, Zhiyong (Ed.). Sponges and coral microbiome Chapter 2, In: **Symbiotic microbiomes of coral reefs sponges and corals**. Springer, p. 17 – 28. 2019. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1>

LIAO, Baolin; XIAO, Baohua; LI, Zhiyong. Coral reef ecosystem. **Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals**, p. 1-15, 2019. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_1

LIM, Yoon Ji *et al.* Genetic localization of the orevactaene/epipyronone biosynthetic gene cluster in *Epicoccum nigrum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 14, p. 127242, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127242>

LIN, Miaoping *et al.* An epipolythiodioxopiperazine alkaloid and diversified aromatic polyketides with cytotoxicity from the Beibu Gulf coral-derived fungus *Emericella nidulans* GXIMD 02509. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 24, n. 3, p. 275-280, 2023. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2200622>

LINI, Israt Farha *et al.* Identification and bioactive potential of endophytic fungi from marine weeds available in the coastal area of Bangladesh **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 11, n. 3, p. 1249-1257, 2020. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(3\).1249-57](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(3).1249-57)

LIU, Yajuan J.; WHELEN, Sally; HALL, Benjamin D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>

LOGES, Luciana A. *et al.* Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo. **Microbial pathogenesis**, v. 143, p. 104066, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104066>

LÜCKING, Robert *et al.* Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. **Nature microbiology**, v. 6, n. 5, p. 540-548, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x>

LUO, Gaoyang *et al.* Determining the Contribution of Micro/Nanoplastics to Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 33, p. 12137–12152, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01128> 2023

MACHELEIDT, Juliane *et al.* Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>

MANI-LÓPEZ, Emma; CORTÉS-ZAVALA, Orlenda; LÓPEZ-MALO, Aurelio. A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. **SN Applied Sciences**, v. 3, p. 1-25, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04102-1>

MAYER, Alejandro MS *et al.* Marine pharmacology in 2014–2015: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, antiviral, and anthelmintic activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 5, 2019. <https://doi.org/10.3390/md18010005>

MENEZES, Cláudia BA *et al.* Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.09.005>

MOHAMED, Amin R. *et al.*, The coral microbiome: towards an understanding of the molecular mechanisms of coral–microbiota interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 2, p. fuad005, 2023. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad005>

MORIARTY, T. *et al.* Coral disease causes, consequences, and risk within coral restoration. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 793-807, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.002>

MORROW, Kathleen M.; PANKEY, M. Sabrina; LESSER, Michael P. Community structure of coral microbiomes is dependent on host morphology. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2022. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01308-w>

MUKHERJEE, Gunjan; MISHRA, Tulika; DESHMUKH, Sunil K. Fungal pigments: an overview. **Developments in fungal biology and applied mycology**, p. 525-541, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_26

MURRAY, Christopher JL *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

NARCHI, Nemer *et al.* (Ed.). **Ethnobiology of corals and coral reefs**. Cham: Springer International Publishing, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23763-3>

NEU, Harold C.; GOOTZ, Thomas D. Antimicrobial chemotherapy. **Medical Microbiology**. 4th edition, 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/>

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NOMAN, Efaq *et al.* Inactivation of fungal spores from clinical environment by silver bio-nanoparticles; optimization, artificial neural network model and mechanism. **Environmental research**, v. 204, p. 111926, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111926>

NOORJAHAN, A. *et al.* Exploring Marine Fungal Diversity and Their Applications in Agriculture. In: **Fungal diversity, ecology and control management**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 293-310. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8877-5_13

NWAKANMA, C.; NJOKU, E. N.; PHARAMAT, T. Antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from leaves of bush mango. **Journal of next generation sequencing and applications**, v. 3, n. 135, p. 2, 2016. <https://doi.org/10.4172/2469-9853.1000135>

OH, Kyoung-Ho; LEE, Seung-Hoon. COVID-19 and fungal diseases. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 803, 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060803>

OREN, Aharon; GUNDE-CIMERMAN, Nina. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. **FEMS microbiology letters**, v. 269, n. 1, p. 1-10, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x>

ORLIĆ, Sandi. Microbial diversity of sponge/coral microbiome. **Symbiotic microbiomes of coral reefs sponges and corals**, p. 29-41, 2019. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_3

ORTEGA, Scarlet Nere *et al.* Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**, v. 22, p. 43-50, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9374-8>

OVECHKINA, Yulia Y. *et al.* Unusual antimicrotubule activity of the antifungal agent spongistatin 1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1993-1999, 1999. <https://doi.org/10.1128/aac.43.8.1993>

P DE CARVALHO, M.; ABRAHAM, W.-R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3564-3577, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712801323243>

PANG, Ka-Lai *et al.* Pathogenic fungi of marine animals: A taxonomic perspective. **Fungal Biology Reviews**, v. 38, p. 92-106, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.008>

PATEL, Neha P.; KUMAR, Sweta B.; HALDAR, S. Role of bacteria in coral ecosystem. **Systems biology of marine ecosystems**, p. 317-341, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62094-7_16

PATHAK, Jainendra *et al.* Genetic regulation of scytonemin and mycosporine-like amino acids (MAAs) biosynthesis in cyanobacteria. **Plant Gene**, v. 17, p. 100172, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100172>

PAULINO, Gustavo Vasconcelos Bastos *et al.*, Microbiota of healthy and bleached corals of the species *Siderastrea stellata* in response to river influx and seasonality in Brazilian northeast. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 26496-26509, 2023.

PAULINO, Gustavo VB; FÉLIX, Ciro R.; LANDELL, Melissa F. Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 2, p. 103-111, 2020. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900394>

PEACE, Nwaerema *et al.*, Impact of climate change on insects, pest, diseases and animal biodiversity. **International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources**, v. 23, n. 5, p. 151-153, 2020. <https://doi.org/10.19080/IJESNR.2020.23.556123>

PEIXOTO, Raquel S. *et al.*, Beneficial microorganisms for corals (BMC): proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 341, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>

PEIXOTO, Raquel S.; SWEET, Michael; BOURNE, David G. Customized medicine for corals. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 686, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00686>

PENG, Jixing *et al.* Sorbicatechols A and B, antiviral sorbicillinoids from the marine-derived fungus *Penicillium chrysogenum* PJX-17. **Journal of natural products**, v. 77, n. 2, p. 424-428, 2014. <https://doi.org/10.1021/hp400977e>

PETERSEN, Lars-Erik; KELLERMANN, Matthias Y.; SCHUPP, Peter J. Secondary metabolites of marine microbes: From natural products chemistry to chemical

ecology. **YOUMARES**, v. 9, p. 159-180, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_8

PHONGPAICHIT, S. *et al.* Aspergillosis of the gorgonian sea fan *Annella* sp. after the 2004 tsunami at Mu Ko Similan National Park, Andaman Sea, Thailand. **Coral reefs**, v. 25, p. 296-296, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0104-y>

PHUKHAMSAKDA, Chayanard *et al.* The numbers of fungi: Contributions from traditional taxonomic studies and challenges of metabarcoding. **Fungal diversity**, v. 114, n. 1, p. 327-386, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00502-3>

PILLAY, Lynise C. *et al.* Epigenetic activation of silent biosynthetic gene clusters in endophytic fungi using small molecular modifiers. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 815008, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.815008>

POLLOCK, F. Joseph *et al.* The urgent need for robust coral disease diagnostics. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002183, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002183>

PUGLISI, Melany P. *et al.* Marine chemical ecology in benthic environments. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 410-429, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8NP00061A>

QADER, M. Mallique *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of the fungal metabolites isolated from the marine endophytes *Epicoccum nigrum* M13 and *Alternaria alternata* 13A. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 232, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19040232>

RÄDECKER, Nils *et al.* Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning?. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 8, p. 490-497, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.008>

RAETZ, Christian RH *et al.* Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 295-329, 2007. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>

RAGAVENDRAN, Chinnasamy *et al.* Larvicidal, histopathological, antibacterial activity of indigenous fungus *Penicillium* sp. against *Aedes aegypti* L and *Culex quinquefasciatus* (Say)(Diptera: Culicidae) and its acetylcholinesterase inhibition and toxicity assessment of zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 427, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00427>

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. 2008. <http://drs.nio.org/drs/handle/2264/1392>

RAGHUKUMAR, Chandralata; RAVINDRAN, J. Fungi and their role in corals and coral reef ecosystems. In: **Biology of marine fungi**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 89-113. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_5

RAGHUKUMAR, Seshagiri; RAGHUKUMAR, Seshagiri. The marine environment and the role of fungi. **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi**, p. 17-38, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8_2

RAMÍREZ-RENDON, Dulce *et al.*, Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.106, n. 5-6, p. 1855–1878. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11821-5>

RÉDOU Vanessa. *et al.* Marine Fungi. In: Stal L., Cretoiu M. (eds) *The Marine Microbiome*. Springer, Cham. 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33000-6_4

REYGAERT, Wanda C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482, 2018. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

ROIK, Anna; REVERTER, Miriam; POGOREUTZ, Claudia. A roadmap to understanding diversity and function of coral reef-associated fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 6, p. fuac028, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac028>

RYPIEN, Krystal L.; ANDRAS, Jason P.; HARVELL, C. Drew. Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4068-4078, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03894.x>

SALAZAR, Fabián *et al.* Pathogenesis of respiratory viral and fungal coinfections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. e00094-21, 2022. <https://doi.org/10.1128/CMR.00094-21>

SARAIVA, Natália N. *et al.* Cytotoxic compounds from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. recovered from the sediments of the Brazilian coast. **Natural Product Research**, v. 29, n. 16, p. 1545-1550, 2015. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.987772>

SCHOCH, Conrad L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the national academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

SCOPEL, Marina *et al.* Arvoredol—An unusual chlorinated and biofilm inhibiting polyketide from a marine *Penicillium* sp. of the Brazilian coast. **Phytochemistry letters**, v. 20, p. 73-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.010>

SEN, Kalyani; SEN, Biswarup; WANG, Guangyi. Diversity, abundance, and ecological roles of planktonic fungi in marine environments. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 491, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8050491>

SHABANA, Syed; LAKSHMI, K. Rajya; SATYA, A. Krishna. An updated review of secondary metabolites from marine fungi. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 602-642, 2021. <https://doi.org/10.2174/13895575200666200925142514>

SHANG, Jun *et al.* Cheminformatic insight into the differences between terrestrial and marine originated natural products. **Journal of chemical information and modeling**, v. 58, n. 6, p. 1182-1193, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00125>

SILVEIRA, Cynthia B. *et al.* Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 4, p. 575-595, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux018>

SMITH, Cameron J. *et al.* Novel polyketide metabolites from a species of marine fungi. **Journal of natural products**, v. 63, n. 1, p. 142-145, 2000. <https://doi.org/10.1021/np990361w>

SOBHA, T. R.; VIBIJA, C. P.; FAHIMA, P. Coral Reef: A Hot Spot of Marine Biodiversity. In: **Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 171-194. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5841-0_8

SOLER-HURTADO, M. Mar *et al.* *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in gorgonian octocorals of the Ecuadorian Pacific. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0165992, 2016.

SONG, Zhiqiang *et al.* Structures and biological activities of diketopiperazines from marine organisms: A review. **Marine Drugs**, v. 19, n. 8, p. 403, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19080403>

STAL, Lucas J.; CRETOIU, Mariana Silva (Ed.). **The marine microbiome**. Springer, 2022. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-90383-1>

SUN, Hai-Hong *et al.* Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by the marine fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and their antioxidant activities. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 1048-1055, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9368-5>

SUNG, Gi-Ho *et al.* A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.011>

SÜSSMUTH, Roderich D.; MAINZ, Andi. Nonribosomal peptide synthesis—principles and prospects. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 14, p. 3770-3821, 2017. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>

SWEET, Michael *et al.* Compositional homogeneity in the pathobiome of a new, slow-spreading coral disease. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0759-6>

SWEET, Michael J.; BULLING, Mark T. On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 9, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00009>

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

TARMAN, Kustiariyah. Marine Fungi as a Source of Natural Products. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**, v. 4, p. 2147-2160, 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch96>

TEDERSOO, Leho *et al.* Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. **Molecular ecology**, v. 31, n. 10, p. 2769-2795, 2022. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>

TEPLITSKI, Max *et al.* Microbial interactions on coral surfaces and within the coral holobiont. **The Cnidaria, Past, Present and Future: The World of Medusa and Her Sisters**, p. 331-346, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_21

THOMPSON, Fabiano L. *et al.* The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro *et al.*, 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. **Systematic and applied microbiology**, v. 24, n. 4, p. 516-519, 2001. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00065>

THOMPSON, Janelle R. *et al.* Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 176, 2015. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00176>

TIAN, Yuan; LI, Yanling. A review on bioactive compounds from marine-derived chaetomium species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 541, 2022. <https://doi.org/10.4014/jmb.2201.01007>

TOHME, Rita; DARWICHE, Nadine; GALI-MUHTASIB, Hala. A journey under the sea: The quest for marine anti-cancer alkaloids. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9665-9696, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16119665>

TREWICK, Steven A.; MORGAN-RICHARDS, Mary. Phylogenetics and conservation in New Zealand: the long and the short of it. **Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics: Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis**, p. 81-97, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22461-9_5

VALA, Anjana K.; DAVE, Bharti P. Marine-derived fungi: prospective candidates for bioremediation. **Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 1**, p. 17-37, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_2

VAN DE WATER, Jeroen AJM *et al.* Coral holobionts and biotechnology: from Blue Economy to coral reef conservation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 110-121, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.013>

VANWONTERGHEM, Inka; WEBSTER, Nicole S. Coral reef microorganisms in a changing climate. **Iscience**, v. 23, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100972>

VARGAS-GASTÉLUM, Lluvia; RIQUELME, Meritxell. The mycobiota of the deep sea: What omics can offer. **Life**, v. 10, n. 11, p. 292, 2020. <https://doi.org/10.3390/life10110292>

VINALE, Francesco *et al.* Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, v. 347, n. 2, p. 123-129, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>

VISBECK, Martin. Ocean science research is key for a sustainable future. **Nature Communications**, v.15, n.9, 690, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03158-3>

VITA-MARQUES, Aline Maria de *et al.* A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500030>

VOSER, Tanja M.; CAMPBELL, Max D.; CARROLL, Anthony R. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial

counterparts?. **Natural Product Reports**, v. 39, n. 1, p. 7-19, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1NP00051A>

WANG, Huan-Nan *et al.* Natural bioactive compounds from marine fungi (2017–2020). **Journal of Asian natural products research**, v. 24, n. 3, p. 203-230, 2022. <https://doi.org/10.1080/10286020.2021.1947254>

WANGUN, Hilaire V. Kemami; HERTWECK, Christian. Epicoccarines A, B and epihydridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1702-1705, 2007. <https://doi.org/10.1039/B702378B>

WILKE, Diogo. V. *et al.* Anticancer potential of compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, v. 87, n. 01/02, p. 49–70, 2021. <https://doi.org/10.1055/a-1257-8402>

WILLEMS, Thomas *et al.* Alkaloids from marine fungi: Promising antimicrobials. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 340, 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060340>

WRIGHT, Anthony D.; OSTERHAGE, Claudia; KÖNIG, Gabriele M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 3, p. 507-510, 2003. <https://doi.org/10.1039/B208588G>

WU, Bin *et al.* Lindgomycin, an unusual antibiotic polyketide from a marine fungus of the Lindgomycetaceae. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 4617-4632, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13084617>

WU, Bin *et al.* Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. **Marine drugs**, v. 12, n. 3, p. 1208-1219, 2014. <https://doi.org/10.3390/md12031208>

WU, Bing *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>

WU, Bing *et al.*, Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>

XU, Jianzhou *et al.* A review of anti-inflammatory compounds from marine fungi, 2000–2018. **Marine drugs**, v. 17, n. 11, p. 636, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17110636>

XU, Lijian *et al.* Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. **Marine drugs**, v. 13, n. 6, p. 3479-3513, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13063479>

YAN, Zhangyuan *et al.* The purification, characterization, and biological activity of new polyketides from mangrove-derived endophytic fungus *Epicoccum nigrum* SCNU-F0002. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 414, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17070414>

YARDEN, O. Fungal association with sessile marine invertebrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00228>

YIN, Qizhao *et al.* Chemistry and bioactivities of alkaloids isolated from marine fungi (covering 2016–2022). **Fitoterapia**, p. 105377, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105377>

YOUSSEF, Fadia S. *et al.* A comprehensive review of bioactive peptides from marine fungi and their biological significance. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, p. 559, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17100559>

ZHANG, Fan *et al.* A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. **Science**, v. 370, n. 6519, p. 974-978, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd69>

ZHANG, Peng; LI, Xin; WANG, Bin-Gui. Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity. **Planta Medica**, v. 82, n. 09/10, p. 832-842, 2016. <https://doi.org/10.1055/s-0042-103496>

ZHANG, X. Y. *et al.* Biodiversity and antifouling activity of fungi associated with two soft corals from the South China Sea. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 6, p. 757–767, 1 ago. 2019b. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01639-7>

ZHANG, Xuan *et al.* Novel natural products from extremophilic fungi. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 194, 2018. <https://doi.org/10.3390/md16060194>

ZHAO, Shujiang *et al.* Screening of marine fungus from Nanji Island and activity of their metabolites against pathogenic *Vibrio* from *Pseudosciaena crocea*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, p. 746-756, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-2003-0>

ZHGUN, Alexander A. Fungal BGCs for Production of Secondary Metabolites: Main Types, Central Roles in Strain Improvement, and Regulation According to the Piano Principle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11184, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241311184>

ZHOU, Kang *et al.* Phylogenetically diverse cultivable fungal community and polyketide synthase (PKS), non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes associated with the South China Sea sponges. **Microbial ecology**, v. 62, p. 644-654, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9859-y>

ZILBERBERG, Carla *et al.* Conhecendo os recifes brasileiros **Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016.

ZOFFOLI, María Laura *et al.* Spatial distribution patterns of coral reefs in the Abrolhos region (Brazil, South Atlantic ocean). **Continental Shelf Research**, v. 246, p. 104808, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2022.104808>

ZOU, Ge *et al.* Furobenzotropolones A, B and 3-hydroxyepicoccone B with antioxidative activity from mangrove endophytic fungus *Epicoccum nigrum* MLY-3. **Marine Drugs**, v. 19, n. 7, p. 395, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19070395>

Capítulo II

Submetido em (Marine Biotechnology – Under review)

**Secondary metabolites from the marine fungus
Epicoccum chloridis FMPV 05: biological activity and
potential modes of action against emerging pathogens**

Hector Mauricio Casanova Navarro^{1,2}, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior³, Johnnatan Duarte de Freitas⁴, Orlando Francisco da Silva Moura⁴, Victor Daniel Firmino dos Santos Tavares²; Nadla Soares Cassemiro⁵, Denise Brentan da Silva⁵, Ciro Ramon Félix^{1,2}, João Xavier de Araújo-Júnior⁶,
Melissa Fontes Landell^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

²Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, AL, Brazil.

³Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, AL, Brazil.

⁴Instituto Federal de Alagoas, Departamento de Química, Maceió, AL, Brazil

⁵Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM); Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

⁶Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Maceió, AL, Brazil.

Correspondence: M.F. Landell (melissa.landell@gmail.com).

Abstract

Marine fungi have gained prominence in recent decades for yielding potent compounds with diverse biological activities, including antimicrobial properties. That said, this study aimed to evaluate the secondary metabolites of the marine fungus *Epicoccum chloridis* FMPV 05 against important pathogens such as the fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* and the bacteria *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. Initially, ethyl acetate extract from the fungal culture's supernatant exhibited bioactivity. Subsequently, it was divided into two extracts, with the *n*-hexane fraction retaining activity. This fraction was further partitioned into five, with Fr-1 and Fr-2 showing promising results. The compounds within the fractions were noted using the chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique, and identified compounds were evaluated for biological activities, virulence factor control, and mechanisms of action. Diketopiperazines (DKPs) and compounds such as *p*-hydroxybenzaldehyde stood out among the annotated compounds, suggesting implications in antimicrobial and virulence factor control effects. It was particularly significant for *Cr. neoformans* with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 100 µg/mL and efficient control of biofilm inhibition and capsule destruction. Furthermore, hyphal formation, an important virulence factor of *C. albicans*, was controlled through the administration of fractions and a weak biofilm inhibition activity at the highest concentration used. Our findings underscore the potential of marine fungi in yielding candidate antimicrobials or adjuvants targeting virulence factors, thereby mitigating fungal infections.

Keywords:

Diketopiperazines, high-risk pathogens, biofilm disruption activity, capsule degradation.

1. Introduction

In the pre-antibiotic period, infectious diseases were one of the main limiting factors for life expectancy (Adedeji 2016; Ouyang et al. 2021). Antibiotics gained prominence in the ancient host-pathogen evolutionary arms dispute in 1928, and the discovery of penicillin changed this poor reality (Melo et al. 2021). Currently, the tolerance and resistance of several emerging pathogens to existing antimicrobials have become one of the most relevant threats to human health (Davies 2010; Ouyang et al. 2021; Papon et al. 2022; Singulani et al. 2022). In addition to affecting human health, it compromises food security worldwide, becoming a public health problem and a global economic threat (Ferri et al. 2017; Li et al. 2021; Melo et al. 2021).

Species associated with the genus *Candida*, recognized as emerging pathogens, have gained prominence due to their escalating tolerance to established therapeutic compounds and the host's immune system. This phenomenon has catapulted them into a severe global threat (Fisher et al. 2018; Kainz et al. 2020). Concomitantly, bacteria such as *Staphylococcus aureus* have caused more severe infections, leading to an increase in host mortality rates. Despite a 20% decrease in persistent colonization, this bacterium was responsible for over 100,000 deaths in 2019 (Murray et al. 2022; Raheem and Straus 2019). The elucidation and in-depth comprehension of the mode of action of novel compounds assume a pressing and imperative stance in managing these pathogens.

Despite discovering novel antimicrobial agents there is still a pressing need to explore and obtain compounds with new chemical cores and modes of action that help control diseases caused by microorganisms, especially bacteria and fungi (Agrawal et al. 2021). Marine environments stand out in obtaining natural products with important biological activities. In this environment, at least 33,056 natural products are reported, of which 9,858 correspond to microorganisms and it is estimated that approximately 65% of them come from fungal origin (Conrado et al. 2022; Orfali et al. 2021; Shin 2020; Voser et al. 2022; Wang et al. 2021). Recent studies show that the biosynthetic machinery of marine fungi is like a "*Pandora's box*" when it comes to the production and the discovery of new molecules, which may be helpful in the development of drugs or potential adjuvants with critical biological activities (Conrado et al. 2022; Durães et al. 2021; Vitale et al. 2022).

The genus *Epicoccum* was reported in the marine environment for the first time by Abdel-Lateff et al. (2003) and Wright et al. (2003) from jellyfish-derived and marine algae-associated. The secondary metabolites (SMs) related to this fungal genus include polyketides, polyketide hybrids, diketopiperazines, siderophores, and carotenoids (Abdel-Lateff et al. 2003; Braga et al. 2018; Chang et al. 2021; Elkhateeb and Daba 2019; Kamat et al. 2023). The *Epicoccum* spp. produce a wide range of molecules (e.g., heterocyclic, phenolic, carotenoid pigments, etc.). Furthermore, many of these molecules exhibit numerous biological activities, such as antimicrobial, herbicide, antiviral, phytotoxic, antitumor, and antioxidant. Mainly,

marine strains of *E. nigrum* species have been extensively studied due to their production of bioactive molecules and biological activities (Qader et al. 2021; Yan et al. 2019; Zou et al. 2021).

Given the lack of studies regarding the biotechnological potential of non-*nigrum* species, the great potential of the genus *Epicoccum* for molecules of interest, and the potential of marine fungi as a source of new molecules, this study aimed to identify the secondary metabolites produced by the marine *E. chloridis* FMPV 05, evaluate their antimicrobial properties, assess their impact on virulence factors and their potential mechanisms of action against the pathogenic microorganisms *Candida albicans* ATCC® 90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC® 208821, the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904, and Gram-negative *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Proteus mirabilis* ATCC® 25933 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

2. Material and Methods

2.1 Strain screening and molecular taxonomy

The fungi *E. chloridis* FMPV 05 was isolated from the soft-coral *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing and Michelotti, 1860), collected at the Ponta Verde coral reef (9°66'32"S35°69'82"W), Northeast Brazil, during the fall season (April/May - 2014). The taxonomy identification was carried out by molecular methods, in which all data were previously published (Paulino et al. 2020).

For the molecular identification, the ITS region of rDNA and the *rpb2* gene were amplified using the universal primers ITS1 and ITS4 (Schoch et al. 2012) and 5F2 and 7cR, respectively (Liu et al. 1999; Sung et al. 2007; Tan and Shivas 2022).

2.2 Extract obtention

The fungal strain FMPV 05 was reactivated in potato dextrose agar (PDA) (HiMedia™). Then, the strain was inoculated in PDA supplemented with 1% yeast extract and incubated at 28 °C for 9 days. Subsequently, fragments of 1 cm² were inoculated in 300 mL of liquid medium (2% glucose; 0.45% NaCl; 0.45% KCl; 0.1% yeast extract) and incubated at 25-28 °C for 14 days under static conditions (Senger et al. 2022). The mycelium and the supernatant were separated under vacuum filtration. The supernatant was initially processed by liquid-liquid extraction using ethyl acetate (EtOAc) solvent in the proportion (150:100 mL), respectively. Subsequently, the crude extract obtained in EtOAc was dried and subjected to a liquid-liquid partition using methanol and n-hexane. The resulting fractions were finally dried under reduced pressure (Rotary evaporator, Fisatom 803) and stored in glass vials. The fractions were tested for antimicrobial activity.

2.3 Chemical analysis of fungal extracts

2.3.1 Preparative High-performance liquid chromatography with UV-VIS SPD-20A detector (HPLC- UV) for fractionation

To determine the retention time (RT) and purity degree (%), a Shimadzu® (Kyoto, Japan) High-Performance Liquid Chromatographer with UV-VIS SPD-20A Detector (HPLC-UV) model SIL-20AHT, with a Luna® 5 µm C18 100 Å column (250 × 4.6 mm) and the wavelength (λ) 254 nm was used. All samples were previously dissolved in HPLC-grade methanol (1 mg/mL). In the mobile phase, a gradient of methanol and ultrapure acidic water (0.1% formic acid) was used in all HPLC-UV-VIS Detector runs. The fractions were obtained by using a solvent gradient, which began with 7% methanol (MeOH) and was maintained for five minutes, reaching 85% up to 60 min and then decreasing to 7% up to 110 min. A specific parametrization was assumed for analysis, being (a) 1 mg/mL for the sample concentration; (b) 1 mL/min for the flow rate; (c) 110 min total time; and (d) 5 µL for the volume injected. Finally, all retention time (RT) values were computed in minutes (min), while the absorbance was computed as milli-absorbance unities (mAU) (Beni et al. 2014; De Brito et al. 2017; Passos et al. 2020).

2.3.2 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

A gas chromatograph (Shimadzu QP2010) coupled to a mass spectrometer (CG-MS) equipped with autoinjector COA-20i was used for sample analysis. The injection temperature was 250 °C, and the splitless mode was applied. An RTX-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was applied, and the mass spectra were obtained by electron ionization (EI) with an ionization energy of 70 eV. The

samples were previously solubilized in hexane (5 mg/mL). The injection volume of the samples was 1 μ L, the injection temperature was 250 $^{\circ}$ C, and the temperature program was the following: 60-240 $^{\circ}$ C increasing 3 $^{\circ}$ C/min, 240-310 $^{\circ}$ C increasing 15 $^{\circ}$ C/min, and maintained at 310 $^{\circ}$ C for 10 min (isothermic). The carrier gas was helium, and the pressure was 79.7 kPa. Retention indices (RI) were calculated using C8-C40 alkane standards (Sigma Aldrich). The constituents were identified by comparing the mass spectra registered with NIST, WILEY, and FFNSC libraries and the retention indices with the literature (Adams and Spackman 2007).

2.4 Antimicrobial activity assay

Disk diffusion and broth microdilution assays were performed according to the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) for the establishment of quality control and reference strain, using the documents M02 13th ed. (CLSI 2018a), M07 11th ed. (CLSI 2018b), M27 4th ed. (CLSI 2017) and M44 3rd ed. (CLSI 2018c). The target strains tested were *C. albicans* ATCC[®] 90028, *Cr. neoformans* var. *grubii* ATCC[®] 208821, *S. aureus* ATCC[®] 25904, *E. coli* ATCC[®] 25922, *P. mirabilis* ATCC[®] 25933, and *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853.

The broth microdilution assay was used to determine minimum inhibitory concentrations (MIC). We used the pathogenic microorganisms that showed some degree of susceptibility in the disk diffusion test, including *C. albicans* ATCC[®] 90028, *Cr. neoformans* ATCC[®] 208821, and *S. aureus* ATCC[®] 25904. We then evaluated

the antimicrobial activity of the fractions (Fr-1 – Fr-5) for these microorganisms. The yeast inoculums were prepared for the minimum inhibitory concentration test in YEPD medium (0.5% yeast extract, 1% peptone, 2% dextrose and 2% agar). The bacteria inoculum was prepared by culturing the strains on brain heart infusion (BHI) (HiMedia™). The cell density was adjusted to a 0.5 McFarland scale with a UV/Vis 1600 Spectrometer (Pro-Tools) with OD values ranging from 0.11-0.15 at 530 nm. Subsequently, the inoculums were diluted to 1:50, followed by 1:20 in RPMI 1640 medium to obtain a final cellular concentration between 5.0×10^2 to 2.5×10^3 CFU/mL. Serial dilutions were prepared in 96-well microplates with 100 μ L of RPMI 1640 medium (HiMedia™) in each well, performing the first in which the volume was 196 μ L, then adding an aliquot of the EtOAc extract diluted in DMSO to a concentration of 400 μ g/mL and a final DMSO concentration of 2% in the first well. A 100 μ L aliquot from the first well was transferred by serial dilutions to the subsequent 10 wells, obtaining final concentrations of 400 to 0.781 μ g/mL (100 μ L). The antifungal drug concentration ranges tested were 64–0.03 μ g/mL (amphotericin B) and 64–0.125 μ g/mL (fluconazole). The plates were incubated at 35 °C for 24-48 h.

2.4.1 Determination of the minimum bactericidal/fungicide concentration (MBC/MFC)

The determination of minimum bactericidal/fungicidal concentration was determined by subculturing 10 μ L of the contents of the microtiter plate well greater than or equal to the lowest minimum inhibitory concentration on Mueller Hinton

agar/Sabouraud Dextrose agar respectively and incubated at 35 °C for 24 h. After the incubation, the presence of growth in the petri dish was evaluated, and the minimum concentration without visible growth was taken as the minimum bactericidal/fungicidal concentration (Kebede et al. 2022). The test was done in triplicate.

2.5 Cellular toxicity and virulence factor assessment

2.5.1 Evaluation of disruption and inhibition of biofilm formation

Disruption of biofilm formation of *C. albicans*, *Cr. neoformans*, and *S. aureus* by Fr-1 and Fr-2 was evaluated using a 96-well plate. The yeasts were cultivated in 200 µL of Sabouraud broth and *S. aureus* in a BHI medium containing Fr-1 and Fr-2 in 800 - 1.25 µg/mL concentrations. A culture medium was used with the microorganisms without extract as a negative control and 10 % DMSO as a positive control (biofilm disruptor). After incubating for 24 h at 28 °C for bacteria and 48 h for yeasts, the medium was carefully decanted to avoid disturbing the biofilm. Then, 100 µL of the medium was added to all wells for microdilution. For each microorganism, the first well contained 196 µL of medium and 4 µL of fractions Fr-1 and Fr-2 and was incubated for 4 h.

Afterward, the broth was decanted from each well and lightly washed with sterilized distilled water to avoid disturbing the biofilm. Once dried at room temperature, each well was stained with 100 µL of 0.1% crystal violet and held for

10 min. Then, the dye was decanted, and the wells were rewashed with sterilized distilled water and dried at room temperature. 100 μ L of 33% acetic acid was added to each well and held for 30 min with gentle agitation to remove cell-bound crystal violet. The optical densities of the acetic acid solution were then measured at 595 nm using a UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700) (Ajesh et al. 2013; Chatterjee et al. 2020).

Pathogenic microorganisms and the fractions Fr-1 and Fr-2 were incubated for biofilm inhibition at time zero, ensuring prolonged exposure for 24 h for bacteria and 48 h for the yeasts. Subsequent procedures were performed as described in the assessment of biofilm disruption above.

2.5.2 Hemolytic activity assay

The hemolytic activity of the Fr-1 and Fr-2 were evaluated in human erythrocytes. For the experiment, 5 mL of fresh blood was washed with 15 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS - pH 7.4) and centrifuged at 1,500 x g for 5 min at 4 °C (Hettich® mikro 220r centrifuge, Germany). Then, 2.0 g of erythrocyte pellet was suspended with 10 mL of PBS, and 1 mL of the suspension was diluted in a final volume of 25 mL containing approximately 5×10^7 cells/mL of erythrocytes in suspension. The test was done using the micro-dilution method, containing 196 μ L in the first well of the erythrocyte solution and in wells 2-10, 100 μ L of the same solution. As a positive control, 100 μ L of the erythrocyte solution containing Triton X-

100 (1%) was used to obtain 100% hemolysis. Four microliters of Fr-1 and Fr-2 were added to the first well for a final volume of 200 μL . For each fraction, the test was done in triplicate. Once the serial dilution was made containing concentrations of 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fr-1, and 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fr-2, respectively; then, the 96-well plates were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Then, the suspension was centrifuged at 1,500 \times g at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The absorbance of the supernatant was read at 540 nm (BIOBASE-EL10B Elisa Microplate Reader) (Endres et al. 2022; Kiss et al. 2010; Kumar et al. 2011). The percentage of hemolytic activity was calculated as follows:

$$\text{Percentage of hemolytic activity} = \frac{\text{Absorbance of extract}}{\text{Absorbance of positive control}} \times 100\%$$

2.5.3 Antioxidant assay

The antioxidant activity was determined through the ability of the antioxidants present in Fr-1 and Fr-2 to scavenge the stable radical DPPH \cdot . Fr-1 and Fr-2 to be tested were dissolved in MeOH and the solution (160 μL) was dispensed into wells of a 96-well plate. 40 μL of the DPPH \cdot solution in MeOH (1.5×10^{-4} M) was added to each well. The mixture was stirred and allowed to stand for 30 min in the dark. Subsequently, the absorbance of the resulting solution was measured at 520 nm with a microplate reader (Molecular Devices, VERSAmax). Each sample was treated in triplicate with the same concentrations of the tested compounds. The scavenging activity on the DPPH \cdot radical was expressed as IC $_{50}$, considering the concentration

of the tested compound necessary to give a 50% decrease in absorbance of the blank solution consisting of MeOH (160 μ L) and DPPH• solution (40 μ L) (Leutou et al. 2014).

2.5.4 Effect of *E. chloridis* FMPV 05 secondary metabolites on mitochondrial function (MTT assay)

The activity of Fr-1 and Fr-2 was studied by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay to cell viability and cytotoxicity assays in the function of redox potential. Concisely, from the pre-inoculum of the pathogenic yeasts *C. albicans* and *Cr. neoformans*, 100 μ l of a suspension of 5×10^5 cells/mL in PBS were incubated with 2 μ L of Fr-1 and Fr-2 at concentrations of 800 μ g/mL and 560 μ g/mL, respectively, separately for each microorganism 18 h at 37 °C in 96-well plates. Then, the supernatants were discarded and 100 μ L of MTT (Invitrogen) were added to each well at a concentration of 0.5 mg/mL in RPMI 1640 medium (HiMedia™). The plates were incubated for six hours at 37 °C and once more, the supernatants were discarded. One hundred microliters of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to each well, and the dark formazan product formation developed by cells with active mitochondria was read in a 96-well plate reader at a wavelength of 550 nm. The medium containing the cells without exposure to the compounds of the fractions was used as a positive control.

The protocols were similar for the two pathogenic microorganisms tested (Moragues et al. 2003; Pinto et al. 2013).

2.5.5 Study of inhibition of the development of *C. albicans* filaments

The effect on the inhibition of pseudohyphae and hyphae formation in *C. albicans* was determined by the method proposed by Chatterjee et al. (2020). For the test, 10 mL of YEPD broth at 30 °C for 24-48 h. Then, *C. albicans* was cultured under non-hyphal production-inducing conditions. An aliquot (1%) of the culture was inoculated into YEPD broth containing 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37 °C to induce hyphal growth. After transferring the inoculum for hyphal induction, the cultures were subjected to different concentrations (0.5, 1, and 2 × MIC) of the fractions Fr-1 and Fr-2. 10% DMSO was used as a positive control. After 4 h, an aliquot of 10-20 µL was placed into the Neubauer chamber and observed by light microscopy for cell counting and comparison (Ajesh et al. 2013; Carlisle and Kadosh 2010; Chatterjee et al. 2020).

2.5.6 Evaluation of the polysaccharide capsule through India Ink Stain and melanin productions of *Cr. neoformans*

We used the India Ink test to determine whether the compounds present in Fr-1 and Fr-2 alter the polysaccharide capsule of *Cr. neoformans* (Atkinson et al.

2019). Based on the results obtained in the previously described minimum inhibitory concentration tests, we evaluated concentrations of 100 µg/mL- 6.25 µg/mL, containing the secondary metabolites of Fr-1 and Fr-2 and yeasts' cultivation after 48 h. We placed 15 µL from each well at the respective concentrations and their respective triplicates on a glass slide, covered it with a drop of India Ink, and observed it by optical microscopy at 100X. The images were obtained, and measurements of the diameters of the cells and the cells together with the capsules were made using the ImageJ software (Rasband 2018). For each concentration, we made 25 measurements of different cells and analyzed the data to determine the differences in the sizes of the polysaccharide capsules of *Cr. neoformans* cells. The assessment of melanin production for *Cr. neoformans* was performed, according to McTaggart et al. (2011), with minor modifications. Briefly, taking the MIC values for *Cr. neoformans* (see 2.4), concentrations lower than the MIC were used. These concentrations (in triplicate) of the fractions Fr-1 and Fr-2 were inoculated in the medium. Free inoculum of the fractions was used as the negative control.

2.6 Potential mode of action

2.6.1 Sorbitol protection assay

Sorbitol was used as an osmotic protective agent for the yeast's cell wall and to evaluate the possible mechanisms involved in the antifungal activity of the Fr-1, and Fr-2, on the cell wall of the yeasts *C. albicans* and *Cr. neoformans*. The assay

was performed using the broth microdilution technique by CLSI guidelines for yeast (M27-A2), using 96-well plates containing the inoculum of the microorganisms tested in Sabouraud broth with sorbitol at a final concentration of 0.8 mM, and the test compound at a concentration final 800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for Fr-1 and 560 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for Fr-2, amphotericin B was used as a controlled drug. Subsequently, the plates were aseptically sealed, incubated at 35 °C, and readings were taken at 2 and 7 days (Leite et al. 2014; Miron et al. 2014).

2.6.2 Ergosterol binding assay-MIC

The potential binding generated between the compounds present in Fr-1 and Fr-2 to yeasts' membrane sterol was determined through this assay. For the test, a solution containing pulverized ergosterol was prepared at the time of execution (with the aid of a pre-sterilized porcelain mortar), later dissolved in DMSO (at a concentration not 10% of the final volume) and 1% Tween[®] 80, considering the desired concentration and volume. Finally, the obtained emulsion was homogenized, heated to increase its solubility, and diluted with the liquid culture medium.

The concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Fr-1 and 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Fr-2 were tested against *C. albicans* and *Cr. neoformans*. For this, the test medium contains exogenous ergosterol (Sigma-Aldrich). Inoculum of 200 μL was prepared, individually containing the yeasts. The plates containing ergosterol were placed in the tested concentrations of 400 - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and Fr-1, and Fr-2, in the already

described concentrations. Amphotericin B was used as the positive control, whose interaction with membrane ergosterol is already known. Plates were sealed and incubated at 35 °C. The plates were read after 24 h. This test was performed in triplicate and geometric mean values were calculated (Leite et al. 2014; Miron et al. 2014).

2.7 Statistical analysis

The significance of the different biological activities and mechanisms of action evaluated was estimated using linear models (LMs). Fractions and/or concentrations were used as independent variables and test results (expressed as optical density, percentage, or count) were the dependent variables. The control of each test was included as the reference level of the independent variable. In addition, before the analysis, the residuals' normality and homoscedasticity assumptions were evaluated using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Graphs were built using the ggplot2 package (Wickham 2016). All analyses and visualizations were generated in the R software (RStudio Team 2020).

3. Results

3.1 Chemical analysis of fungal extracts

In this study, the marine fungus *E. chloridis* FMPV 05, cultivated in a liquid medium, provided two fractions of the supernatant material from the solvents EtOAc and *n*-hexane. Consequently, it was determined that the extract obtained from the organic solvent *n*-hexane was responsible for containing the SMS, which showed antimicrobial activity against studied pathogens. Subsequently, this active *n*-hexane fraction (182 mg) was separated into five fractions (Fr-1 to Fr-5) using preparative HPLC runs, yielding Fr-1 (27,0 mg (14,84%), RT = 0-10 min); Fr-2 (14,1 mg (7,75%), RT = 10.5-22.0 min), Fr-3 (20,1 mg (11,04%), RT = 22.5-32.0), Fr-4 (57,1 mg (31,37%), RT = 32.5-60 min), and Fr-5 (36,1 mg (19,84%), RT = 90-110 min).

Therefore, it was determined that the lipophilic fractions Fr-1 and Fr-2 (Fig. 1) showed the most active antimicrobial activity against the pathogens *C. albicans*, *Cr. neoformans*, and *S. aureus*. Lastly, these were analyzed by GC-MS to determine their chemical components.

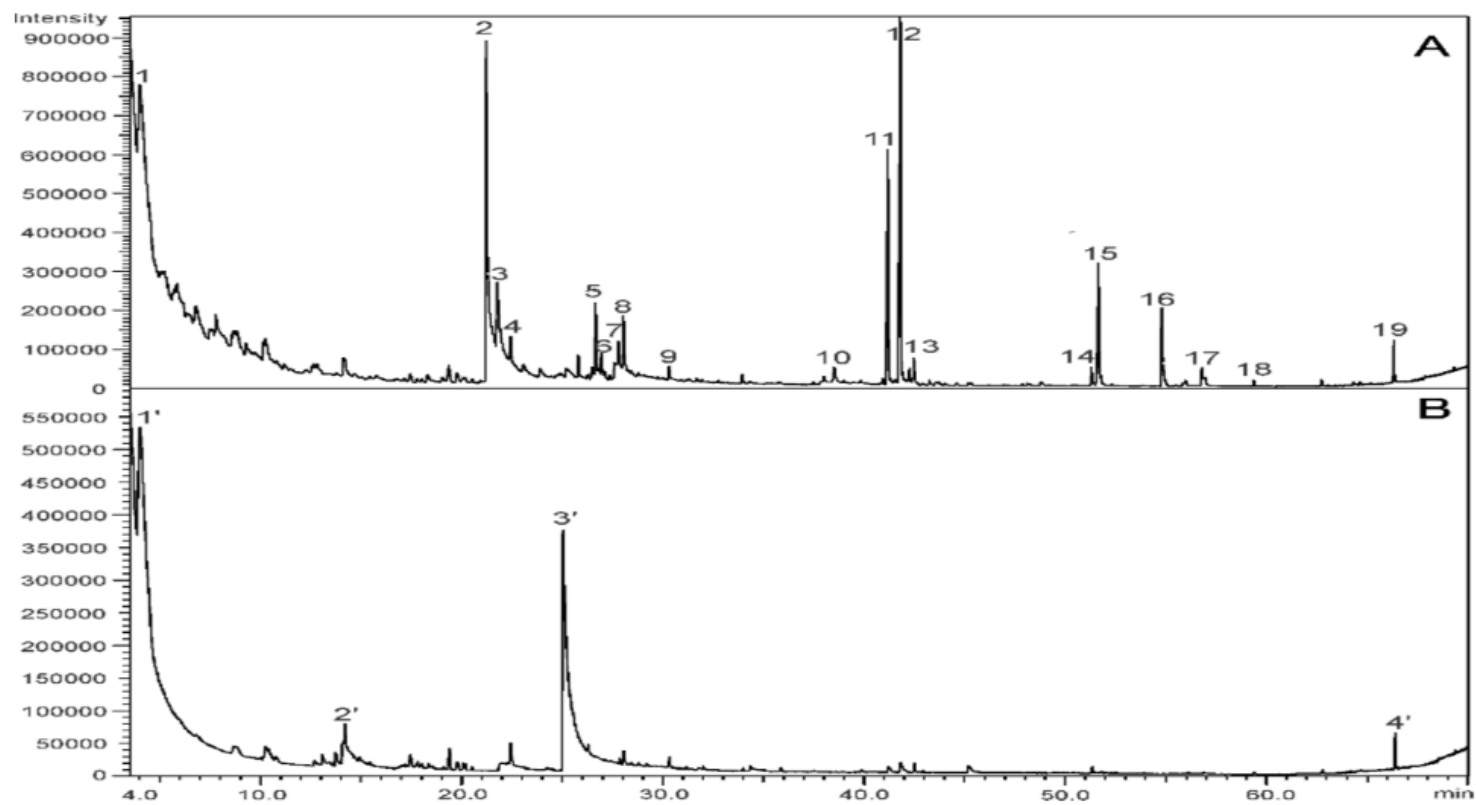


Fig. 1 Total ion chromatogram of Fr-1 (A) and Fr-2 (B) (*n*-hexane extract) from *E. chloridis* FMPV 05.

From the fractions Fr-1 and Fr-2 were annotated 19 and 4 compounds, respectively (Fig. 2 and Supplementary Table 1). Thus, isoamyl acetate (14.80%), *p*-hydroxybenzaldehyde (20.85%), orcinol (5.37%) and diketopiperazine cyclo Leu-Pro (12.62 %) and its isomer (21.15%), cyclo Phe-Val (6.22%) and cyclo Pro-Phe (4.50%) were annotated from Fr-1. From the fraction Fr-2, isoamyl acetate (60.65%), methyl *p*-hydroxybenzoate (35.86%), and octacosane (2.39%) were annotated.

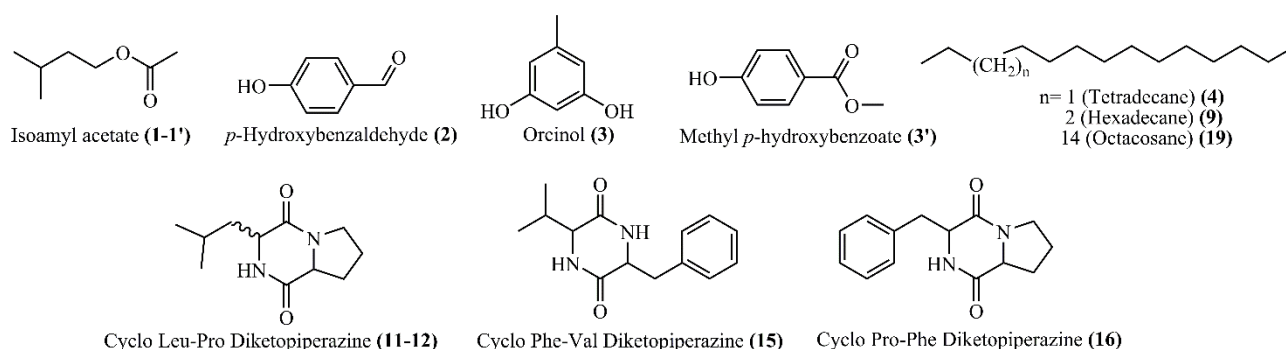


Fig. 2 Annotated chemical constituents of fractions (Fr-1 and Fr-2) of *n*-hexane extract of *E. chloridis* FMPV 05 by GC-MS. For Fr-1 the numbers (1, 2, 3, 4, 9, 11, 12, 15, 16, 19), and Fr-2 numbers (1' and 3'), correspond to the peaks presented in the chromatograms Figure 1. A-B and supplementary Table 1.

3.2. Antimicrobial activity

The extracts obtained from *E. chloridis* FMPV 05 were previously screened against pathogens such as *E. coli*, *P. mirabilis* and *P. aeruginosa* (Gram-negative bacteria), as well as the Gram-positive *S. aureus*, and the unicellular fungi *C. albicans* and *Cr. neoformans*. Subsequently, microorganisms that showed some type of growth inhibition by the extracts were selected for the minimum inhibitory

concentration test (MIC). The *n*-hexane extracts showed activity against *S. aureus* with growth inhibition at the highest concentration tested (200 µg/mL), and against *C. albicans* (400 µg/mL) and *Cr. neoformans*, with growth inhibition at the highest concentration tested (100 µg/mL).

After fractionation of the *n*-hexane extract, only Fr-1 and Fr-2 showed activity in the MIC test, and demonstrated growth inhibition against *C. albicans*, *Cr. neoformans*, and *S. aureus* at concentrations of 400 µg/mL, 100 µg/mL, and 200 µg/mL, respectively (Table 1), which also corresponded to the minimum bactericidal/fungicidal concentrations (MBC/MFC). Then, Fr-1 and Fr-2 were considered the most promising and were the only ones evaluated in subsequent tests.

Table 1. Antimicrobial activity of *E. chloridis* fractions. Minimum Inhibitory Concentration (MIC - µg/mL*).

<i>n</i> -Hexane fractions	Tested microorganisms		
	<i>C. albicans</i> (MIC)*	<i>Cr. neoformans</i> (MIC)*	<i>S. aureus</i> (MIC)*
Fr-1	400	100	200
Fr-2	400	100	200
Fr-3	NA	NA	NA
Fr-4	NA	NA	NA
Fr-5	NA	NA	NA
Ciprofloxacin	-	-	1.25
Amphotericin B	3.25	1.25	-
Fluconazole	1.25	0.63	-

NA: Not show antimicrobial activity.

3.3 Cellular toxicity and virulence factor assessment

3.3.1 Hemolytic and antioxidant activities

None of the tested concentrations exhibited a hemolytic effect on human erythrocytes. Although we noted a dose-dependent increase in hemolytic activity that was directly proportional, it is important to highlight that even at the highest concentrations investigated, the hemolytic activity remained insignificant. To evaluate the effect of the fractions Fr-1 and Fr-2 in combating oxidative stress, they were evaluated through DPPH[•]. The results show that the DPPH[•] inhibition concentration (IC₅₀) for the two evaluated fractions was 2,755.9 for Fr-1 and 1,562.47 for Fr-2 (µg/mL), showing weak antioxidant activity (IC₅₀ > 1,000 µg/mL).

3.3.2. Effect on mitochondrial function (MTT assay)

Through the MTT assay, we found that the compounds present in Fr-1 and Fr-2 did not affect the activity of mitochondrial reductase enzymes. A reduction in enzymatic activity was observed only at concentrations that presented MIC, 400 µg/mL for *C. albicans* and up to 100 µg/mL for *Cr. neoformans*. It indicates no impairment in the energy generation capacity of the tested pathogenic yeast cells at the tested concentrations (400 µg/mL - 1 µg/mL).

3.3.3. Disruption and inhibition of biofilm formation

The strategy employed to evaluate biofilm disruption in the tested emerging pathogens yielded promising outcomes, particularly in the case of *Cr. neoformans*. The compounds within Fr-1 exhibited noteworthy *Cr. neoformans* biofilm disruption effects at lower concentrations, demonstrating activity up to 3 $\mu\text{g/mL}$. However, the extent of disruption, although lower than the positive control (PC = 10% DMSO). Notably, at concentrations above 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ($p\text{-value} \leq 0.01$), the Fr-1 activity exceeded that of the PC, leading to over 50% biofilm disruption. In concentrations of 200, 400, and 800 $\mu\text{g/mL}$, the disruption ranged between 71 and 78%. The disruption profile for Fr-2 followed a similar trend, with disruption exceeding that of the PC only at concentrations above 25 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3).

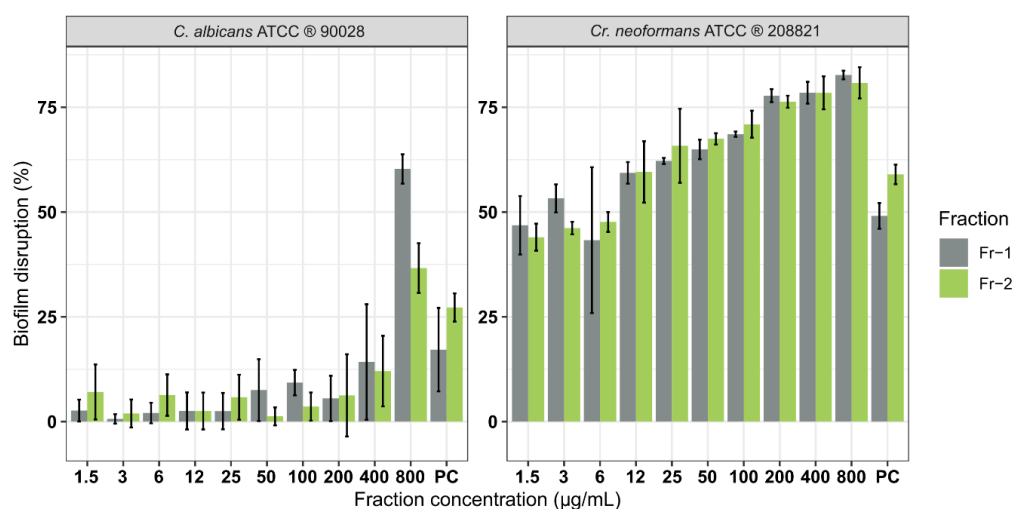


Fig. 3 Effect of compounds present in the fractions Fr-1 and Fr-2 produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the disruption of biofilm formation for the emerging pathogens *C. albicans* ATCC® 90028 and *Cr. neoformans* ATCC® 208821, PC (positive control).

The tested fractions had no biofilm disruption activity for *C. albicans* and *S. aureus*. Specifically, the *C. albicans* biofilm showed a significant reduction ($p\text{-value}$

< 0.0001), only becoming significant at the 800 µg/mL concentration. Within Fr-1, it stopped biofilm formation by about 60%; whereas in the case of Fr--2, this halt reduced to around 37%. From a 400 µg/mL concentration in both fractions, the inhibition dropped to values around 15% (Supplementary Fig. 1). Conversely, *S. aureus* showed no disruption in biofilm inhibition at any concentration tested.

Regarding the inhibition of biofilm formation, both Fr-1 and Fr-2 exhibited significant activity against *Cr. neoformans*. Compared to the PC, significant biofilm inhibition activity was observed for Fr-1 and Fr-2 at concentrations as low as 6 µg/mL, effectively curtailing *Cr. neoformans* biofilm production (p-value ≤ 0.0001). The concentrations up to 25 µg/mL, in biofilm formation for both fractions decreased to 45%. Concentrations greater than 50 µg/mL led to inhibition greater than 50%, like the control. Concentrations above 100 µg/mL were excluded from consideration due to the prior demonstration of favorable antimicrobial activity through prolonged compound exposure (Fig. 4).

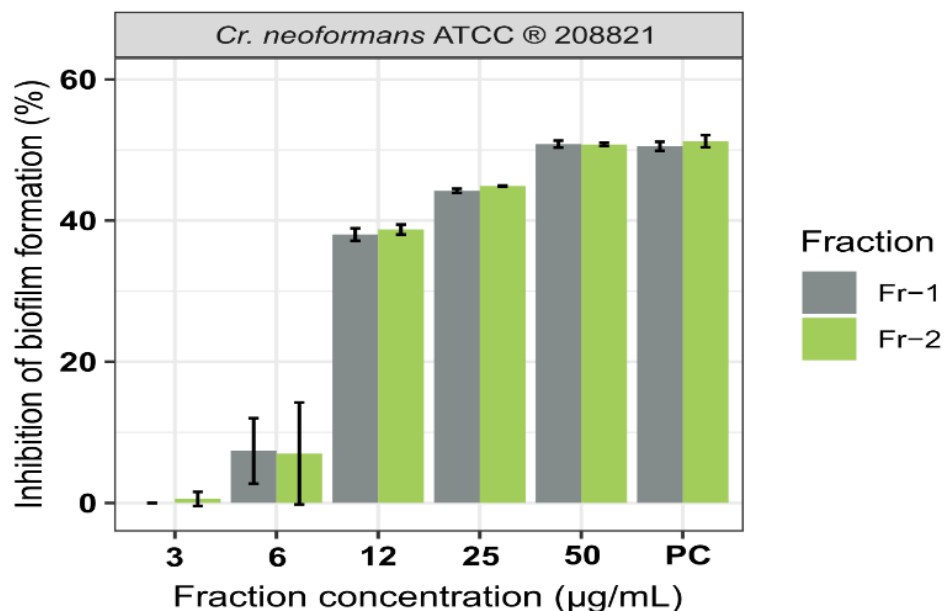


Fig. 4 Effect of compounds present in the fractions (Fr-1 and Fr-2) produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the inhibition of biofilm formation for the opportunistic pathogen *Cr. neoformans* ATCC® 208821. PC (positive control).

On the other hand, for *C. albicans* and *S. aureus*, biofilm inhibition activity was only discernible at concentrations that correlated with the minimum inhibitory concentration (MIC), suggesting no biofilm inhibition but cell death. Notably, no biofilm inhibition activity was observed at other concentrations (Supplementary Fig. 2 and 3).

3.3.4 Inhibition of pseudohyphae and hyphae formation

In comparison to the control group (medium lacking inhibitor), a significant reduction in the production of pseudohyphae and hyphae formation in *C. albicans* promoted by Fr-1 and Fr-2 at concentrations of 200, 400, and 800 µg/mL (p -value \leq

0.0001). These concentrations reduced 68%, 75%, and 100% in the production of pseudohyphae and hyphae in *C. albicans*, respectively. However, at the lowest concentrations, there was no significant pseudohyphal reduction (p-value > 0.05).

3.3.5. Polysaccharide capsule and melanin production by *Cr. neoformans*

The cells of *Cr. neoformans* have a polysaccharide capsule, considered a major virulence factor of this and several other pathogens. Upon exposure to Fr-1 at concentrations of 50 µg/mL (Supplementary Fig. 4), yeast cells exhibited a substantial reduction of the polysaccharide capsule (p-value ≤ 0.0001). The capsule was almost wholly reduced compared to cells not exposed to Fr-1 (control). However, no significant difference was observed at concentrations ≤ 25 µg/mL compared to the control. Likewise, it was determined through the evaluation test of melanin production using the Niger seed agar medium, a method commonly employed for rapid identification of *Cr. neoformans* and other pathogenic species within the genus. Notably, it was determined that none of the tested fractions (Fr-1 and Fr-2) exhibited any inhibition of melanin production in *Cr. neoformans*.

3.4. Antimicrobial mode of action

3.4.1 Sorbitol protection

The MIC profile presented by Fr-1 and Fr-2 in the sorbitol assay was increased. In the case of *C. albicans*, the positive osmoprotective effect of sorbitol was observed with a MIC of 400 µg/mL for both fractions in the absence of sorbitol within the medium. In contrast, when subjected to the sorbitol assay, the MIC increased to 800 µg/mL for Fr-1 and 600 µg/mL for Fr-2. Regarding *Cr. neoformans*, the effect of Fr-1 and Fr-2 was even more notable, as they presented a MIC of up to 100 µg/mL in the sorbitol-free medium, while in the sorbitol-containing medium, the MIC was 400 µg/mL for Fr-1 and 300 µg/mL for Fr-2.

3.4.2 Ergosterol binding

The activity of the fractions Fr-1 and Fr-2 tested in the presence of exogenous ergosterol showed an increase in MIC for each of the tested pathogenic yeasts. In the case of *C. albicans*, from the test without resemblance of exogenous ergosterol, the fractions even inhibited growth up to a concentration of 400 µg/mL, whereas, in the presence of exogenous ergosterol, growth was observed up to the maximum tested concentration of 800 µg/mL for both tested fractions. It indicates that the stability of its membranes was favored, and it could tolerate the compounds present in the two fractions. For *Cr. neoformans*, where the antifungal activity measured by

the medium without exogenous ergosterol reached 100 µg/mL, an increase in the MIC was shown in the test where the medium contained ergosterol, reaching an increase in yeast growth for Fr-1 up to a concentration of 200 µg/mL and 400 µg/mL for Fr -2.

4. Discussion

4.1. Secondary metabolites and antimicrobial activity

The diketopiperazines (DKPs) produced by *E. chloridis* FMPV 05, cycle Pro-Leu, its isomer cycle Pro-Leu, cycle Phe-Val, and cycle Pro-Phe, are a substantial part of the molecules that showed antimicrobial activity in this work, mainly against the fungus pathogenic *Cr. neoformans*. Previously, these DKPs were reported for the terrestrial fungi *Talaromyces pinophilus* AF-02, where antibacterial activity was evaluated against *S. aureus* and other bacteria showing weak activity (Zhai et al. 2015). They were also produced by *Aspergillus sydowii* obtained through the One Strain Many Compounds (OSMAC) approach, from which their acetylcholinesterase (AChE) inhibiting activity was evaluated (da Silva Lima et al. 2018). In the marine environment, *Streptomyces* spp. and *Bacillus subtilis* bacteria show synergistic activities against human pathogens (Makarasen et al. 2018; Wang et al. 2010).

DKPs are organic compounds that contain two oxygen atoms of piperazine and are obtained from amino acids. Since the 1970s, these compounds have been isolated from fungal sources, particularly associated with *Epicoccum* genus

(Deffieux et al. 1978). DKPs have several activities, including antiviral, antitumor, and immunosuppressive. Specifically for the *Epicoccum* genus, DKPs such as Epicoccin, Epicorazine, Ent-epicoccus G, Rostratin A, cyclo Pro-Val, cyclo Pro-Ile, cyclo Pro-Phe, cyclo Pro-Tyr, and N-(2-phenylethyl)acetamide have been reported to have anti-inflammatory and antimicrobial activities, as well as, inhibitory effects on the HIV-1 replication (Guo et al. 2009; Qader et al. 2021; Song et al. 2021; Wang et al. 2010; Zhang et al. 2007).

The DKPs produced by *E. chloridis* present in fractions Fr-1 and Fr-2, are potentially compounds that play a role in antimicrobial activity and in the control of virulence factors and potential modes of action evaluated. The DKPs cyclo Phe-Pro and cyclo Leu-Pro results were particularly promising for *Cr. neoformans*, constituting the first report on the production and evaluation of antimicrobial activity and against virulence factors of these DKPs from marine fungi.

These DKPs were isolated by Rhee (2004), from a bacterial strain associated with the genus of *Streptomyces* spp., where it was determined that cyclo Phe-Pro and cyclo Leu-Pro showed synergistic antimicrobial activity against *S. aureus* (50 µg/mL), *C. albicans* (64 µg/mL) and *Cr. neoformans* (above 256 µg/mL). These findings corroborate our results where DKPs as major constituents of Fr-1, showed similar results, showed greater efficiency for *Cr. neoformans* at a concentration of 100 µg/mL.

Reports of DKPs annotated in our analyses have been mainly associated with bacteria. Wang et al. (2010) isolated some isomers of DKPs cyclo (S-Phe-S-Pro)

and cyclo (S-Leu-S-Pro) obtained from marine bacteria *Bacillus subtilis* had synergistic effects in inhibiting the growth of pathogens tested by us in this work at concentrations of 0.25 mg/L - 0.50 mg/L. Other antimicrobial activities of DKPs, cyclo L-Pro-L-Val, cyclo D-Pro-D-Phe, and cyclo L-Pro-L-Leu, have been reported mainly for pathogenic Gram-positive bacteria and against fungi phytopathogenic filamentous (Long et al. 2011; Xu et al. 2009).

Song et al. (2021) reviewed the DKPs produced by marine organisms and found that out of 241 marine-derived DKPs, about 83% ($n = 199$) were of fungal origin. The DKPs cyclo (Pro-Phe) and cyclo (Pro-Leu) produced by *E. chloridis* FMPV 05 were also reported as compounds obtained from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12, found in the marine environment in Antarctica. However, these reported compounds have not been subjected to bioactivity testing (Bharudin et al. 2018).

Bofinger et al. (2017) evaluated the coexistence of the Gram-negative bacteria *Cronobacter sakazakii* and the Gram-positive *Bacillus cereus* by obtaining metabolic profiles of the microorganisms separately and together. They produced DKP cyclo Pro-Leu in all cases. The bacteria use as a communication mechanism to explain their coexistence in the same niche in industrial environments and participate in the maintenance of biofilms. The DKP cyclo Phe-Val, also present in Fr-1 of *E. chloridis* FMPV 05, was reported in secondary metabolites obtained from the ethyl acetate extract by the bacteria of the genus *Sulfitobacter* sp. M44, collected

at seabed depth in the East China Sea. However, no biological activity was evaluated in this work (Long et al. 2011).

The annotated DKPs of *E. chloridis* cycle Pro-Leu, and its isomer, cycle Phe-Val, and cycle Pro-Phe, have been reported for marine and terrestrial filamentous fungi. However, we did not find in any of these reports evidence that these DKPs coming from filamentous fungi, mainly marine ones, showed antimicrobial activity, particularly antifungal activity against *Cr. neoformans* (Ortiz and Sansinenea 2017; Hassani et al. 2022; Song et al. 2021; Xu et al. 2009; Youssef et al. 2019).

Additionally, *p*-hydroxybenzaldehyde and the benzenoid compound methylparaben have been widely reported as secondary metabolites in plants and other organisms, as well as related *p*-hydroxybenzaldehyde from the oxidative degradation of hardwood lignin (Baker et al. 1968; Kang et al. 2014; Lin et al. 2020; Parameswaran et al. 1997).

4.2 Hemolytic activity and cellular toxicity

The annotated SMs of *E. chloridis* FMPV 05, mainly the significant compounds such as DKPs Pro-Leu cycle, its isomer Pro-Leu cycle, Phe-Val cycle, and Pro-Phe cycle, showed no hemolytic effect on human red blood cells, nor changes in function mitochondrial metabolism through the MTT test. Cytotoxic effects have been reported for DKPs against various cancer cell lines; for example, cyclo-(Phe-Val) DKPs identified from the marine fungus *Penicillium oxalicum* via the MTT assay inhibited the growth of HepG II and LNCaP cell lines at relatively high concentrations.

minimums of 50 µg/mL (Xu et al. 2009). In the research by Hawas and El-Kassem (2019), DKPs identified from the marine fungus *Penicillium chrysogenum* were tested against 12 cancer cell lines. The authors restored the activity of the alkaloid haenamindole DKPs against colon cancer cells-38.

Other findings in the literature show cytotoxic activity exerted by DKPs focused on cancer cell lines from compounds identified from marine and terrestrial fungal filaments (Bojarska et al. 2021; Braga et al. 2018; Fátima et al. 2016; Yurchenko et al. 2016).

4.3. Control of virulence factors and potential modes of action

The DKPs annotated from *E. chloridis* FMPV 05 cycle Pro-Leu and its isomer, cycle Phe-Val, and cycle Pro-Phe, proved to be potential products in controlling different virulence factors produced by *Cr. neoformans* and *C. albicans*. Pathogenic microorganisms have molecular and cellular mechanisms, known as virulence factors, that give them an advantage in infection. These mechanisms allow them to tolerate or subvert the host's defense systems or antimicrobial agents. However, these can be targeted or modulated rather than targeting the pathogen itself, which may represent a new approach to antimicrobial development (Mayer and Kronstad, 2017). The biofilm formation is responsible for about 65% of microbial infections (Jamal et al. 2018) and among the compounds most used for biofilm inhibition are phenols, imidazoles, furanone, indole, and bromopyrrole (Di Somma et al. 2020).

The DKPs annotated from *E. chloridis* FMPV 05 showed significant results of both the inhibition and the disruption of the *Cr. neoformans* biofilm. They prove to be efficient in both scenarios and project themselves as relevant compounds in controlling the virulence factors of this emerging pathogen, which is currently considered one of the most critical fungi by WHO (Fisher and Denning 2023). DKPs such as cis-Cyclo (Leucyl-Tyrosyl) were identified from the marine fungus *Penicillium* sp. F37 inhibited up to 85% of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* (Scopel et al. 2013). The bacteria *Vibrio vulnificus* produced the DKPs Cyclo(L-PheL-Pro), also produced by *E. chloridis* in this work, which showed activity of biofilm inhibition, through the inhibition of gene expression and finally of the OmpU protein, involved in the pathogenicity processes of *E. coli* (Park et al. 2006). Other DKPs have also been reported as weak inhibitors of *B. subtilis* and *S. aureus* biofilm (Chatterjee et al. 2020; de Carvalho and Abraham 2012; Durães et al. 2021).

The fractions Fr-1 and Fr-2 also inhibited efficiently the formation of hyphae and pseudohyphae in *C. albicans*. This yeast is considered an opportunistic pathogen with several virulence factors, including the formation of hyphae and pseudohyphae, which can favor its pathogenicity (Carlisle and Kadosh 2010; Kainz et al. 2020; Karkowska-Kuleta et al. 2009; Lu et al. 2014; Stempinski et al. 2023; Zuzarte et al. 2011). The concentrations ≥ 200 $\mu\text{g/mL}$ inhibited the formation of hyphae and pseudohyphae by approximately 70%, indicating that we may be facing a promising compound or molecule that can be used to control this important

virulence factor of *C. albicans*, no reports of annotated DKPs against inhibition of hyphae or pseudohyphae in fungi were found.

Likewise, our assessment of virulence factors evidenced that DKPs annotated as potential MSs responsible for bioactivity showed that *Cr. neoformans* is strongly affected by the reduction of the polysaccharide capsule. We did not find any report in the literature that indicates that DKPs have been evaluated against the capsule or any of its constituents, mainly Glucuronoxylomannan (GXM) and Glucuroxylomannogalactan (GXMGal). The capsule contributes to the virulence of the fungus (Boral et al. 2018; Casadevall et al. 2019). In contrast, the annotated compounds did not influence the synthesis of the melanin pigment in *Cr. neoformans*. This pigment reduces the effectiveness of the compounds synthesized by *E. chloridis* FMPV 05, since it is known that melanin significantly reduces the activity of antifungals, as reported for amphotericin B and caspofungin (Martinez and Casadevall 2015).

4.4. Antimicrobial potential modes of action

When evaluating the protective effects of ergosterol and sorbitol on fungal cells of the pathogens *Cr. neoformans* and *C. albicans*, a positive result of osmoprotection was observed. The annotated compounds considerably reduced their MIC effectiveness, even inhibiting growth for *C. albicans* up to the maximum concentration used. The cell wall of yeasts is generally structured with multiple layers

of compounds, mainly mannoproteins, which modulate the molecular architecture of the cell wall (Leite et al. 2014, Pippi et al. 2019; Ribeiro et al. 2021). These results indicate that the possible mechanism of action of the compounds found in the fractions targets the cell walls of *C. albicans* and *Cr. neoformans*. The protective effect of sorbitol has already been reported in the literature for *Candida* and *Cryptococcus* species as an indicator in the determination of several compounds that act on the cell wall of these fungi (Almeida et al. 2020; Alves et al. 2017; Makarasen et al. 2018; Mani-López et al. 2021).

Ergosterol is a sterol that makes up the cell membrane of fungi and other organisms, which provides stability and maintains cell structure, as observed in the results obtained for Fr-1 and Fr-2. Several antifungals, such as azoles and allylamines, are related to the inactivation of enzymes involved in the synthesis of ergosterol, generating an accumulation of methylated fatty acids that lead to membrane instability and fungal death. These results, together with the response to the presence of sorbitol as a protective agent, suggest that the potential mechanisms of action of the *E. chloridis* fractions are related to the membrane and cell wall of the tested pathogenic fungal cells (Boral et al. 2018; Makarasen et al. 2018; Pippi et al. 2019).

5. Conclusions

This is the first report of this species *E. chloridis* in the marine environment. Our results show that the mycocompounds produced by strain FMPV 05 have high antimicrobial potential against the pathogenic fungi microorganisms *C. albicans* and *Cr. neoformans* and the bacteria *S. aureus*. Of the secondary metabolites obtained, we highlight the DKPs cyclo Pro-Leu, Isomer cyclo Pro-Leu, cyclo Phe-Val, and cyclo Pro-Phe, as potential compounds with activity against the tested emerging pathogens. The compounds produced by *E. chloridis* FMPV 05 were efficient in controlling the tested virulence factors, mainly from *Cr. neoformans*, which was much more susceptible to the SMs produced by *E. chloridis* FMPV 05. We also emphasize that potentially, the DKPs produced by *E. chloridis* FMPV 05 are tentatively directed to act on the fungal wall and membrane. However, further chemical and biological analyses of these compounds can be performed to clarify their specific targets.

Funding statement: This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, number of grants 475378/2013-0, 408718/2013-7, 311553/2018-4 and 312889/2021-6) and Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES). We are also thankful for collaborating with Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO-CNPQ N° 465536/2014-0). We also thank the Federal University of Alagoas and the Organization of American States for their financial support through doctoral scholarships through the PAEC OEA-GCUB agreement.

Reference

Abdel-Lateff A, Fisch KM, Wright AD, König GM (2003) A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. *Planta medica* 69:831-834 <https://doi.org/10.1055/s-2003-43209>

Adedeji WA (2016) The treasure called antibiotics. *Ann Ib Postgrad Med* 14:56-57. PMID: 28337088

Adams RP and Sparkman OD (2007) Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 18:803-806 <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.001>

Agrawal S, Nandeibam J, Sarangthem I (2021) Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) induced by metabolites of thermophilous fungi *Acrophialophora* *levis*. *PLoS ONE* 16 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258607>

Ajesh K, Sudarshil S, Arunan C, Sreejith K (2013) Kannurin, a novel lipopeptide from *Bacillus cereus* strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities. *J Appl Microbiol* 115:1287-1296 <https://doi.org/10.1111/jam.12324>

Almeida F, Nosanchuk JD, Niño-Vega GA (2020) The Fungal Cell Wall. *Front Microbiol* 11:1682 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01682>

Alves JCO, Ferreira GF, Santos JR et al (2017) Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus*. *Front Microbiol* 7:2419 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02419>

Atkinson K, Mabey D, Mitchell HK et al (2019) India Ink Stain and Cryptococcal Antigen Test for Cryptococcal Infection. In *Rev T Med.* (ed) K. Atkinson and D. Mabey <https://doi.org/10.1002/9781119282686.ch18>

Baker JE, Rainey DP, Norris ND, Strong FM (1968) p-Hydroxybenzaldehyde and Other Phenolics as Feeding Stimulants for The Smaller European Bark Beetle. *Forest Science* 14: 91–95 <https://doi.org/10.1093/forestscience/14.1.91>

Bharudin I, Bakar MFA, Hashim A et al (2018) Unravelling the adaptation strategies employed by *Glaciozyma antarctica* PI12 on Antarctic Sea ice. *Mar Envir Res* 137:169-176

Beni A, Soki E, Lajtha K, Fekete I (2014) An optimized HPLC method for soil fungal biomass determination and its application to a detritus manipulation. study J Microbiol Methods 103:124-130 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.022>

Bofinger MR, de Sousa LS, Fontes JEN, Marsaioli AJ (2017) Diketopiperazines as Cross-Communication Quorum-Sensing Signals between *Cronobacter sakazakii* and *Bacillus cereus*. ACS Omega 31:1003-1008 <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00513>

Bojarska J, Mieczkowski A, Ziora ZM et al (2021) Cyclic dipeptides: The biological and structural landscape with special focus on the anti-cancer proline-based scaffold. Biomolecules 11:1515 <https://doi.org/10.3390/biom11101515>

Boral H, Metin B, Döğen A et al (2018) Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. Fungal Genet Biol 111:92-107 <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.008>

Braga RM, Padilla G, Araújo WL (2018) The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. Crit Rev Microbiol 44:759-778 <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>

Carlisle PL and Kadosh D (2010) *Candida albicans* Ume6, a filament-specific transcriptional regulator, directs hyphal growth via a pathway involving Hgc1 cyclin-related protein. Eukar cell 9:1320-1328 <https://doi.org/10.1128/EC.00046-10>

Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB et al (2019) The capsule of *Cryptococcus neoformans*. Virulence 10:822-831 <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>.

Chang CC, Li CY, Tsai YH et al (2021) Bioactive polyketides from the pathogenic fungus of *Epicoccum sorghinum*. Planta 253:116 <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03635-y>

Chatterjee S, Ghosh R, Mandal NC (2020) Inhibition of biofilm- and hyphal-development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. Microbiol Research 232:0944-5013 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126386>

CLSI (2017) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th (ed) CLSI standard M27 Wayne PA Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018a) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th (ed) CLSI standard M02 Wayne PA Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018b) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th (ed) CLSI standard M07 Wayne PA Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018c) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd (ed) CLSI guideline M44 Wayne PA Clinical and Laboratory Standards Institute

Conrado R, Gomes TC, Roque GSC, De Souza AO (2022) Overview of bioactive fungal secondary metabolites: cytotoxic and antimicrobial compounds. *Antibiotics* 11:1604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111604>

da Silva Lima G, da Rocha AM, dos Santos et al (2018) Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochemistry Letters* 24:39-45 <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.007>

Davies J and Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417-33 <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>

Deffieux G, Baute MA, Baute R, Filleau MJ (1978) New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. II. Epicorazine A: structure elucidation and absolute configuration *J Antibiot* 31:1102-5 <https://doi.org/10.7164/antibiotics.31.1102>

De Brito AW, Dantas GM, Nogueira AFH et al (2017) Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanylhydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. *Mol* 22:1394 <https://doi.org/10.3390/molecules22091394>

De Carvalho MP and Abraham WR (2012) Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Curr Med Chem* 19:3564-77 <https://doi.org/10.2174/092986712801323243>

Di Somma A, Moretta A, Canè C et al (2020) Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* 23:652 <https://doi.org/10.3390/biom10040652>

Durães F, Szemerédi N, Kumla D et al (2021) Metabolites from Marine-Derived Fungi as Potential Antimicrobial Adjuvants. *Mar Drugs* 19:475 <https://doi.org/10.3390/md19090475>

Elkhateeb W and Daba G (2019) *Epicoccum* Species as Potent Factories for the Production of Compounds of Industrial, Medical, and Biological Control Applications. J Sci Res 14:1-5 <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.14.002541>

Endres CT, Rigo GV, Loges LA et al (2022) Mass Spectrometry Metabolomics Approach Reveals Anti-*Trichomonas vaginalis* Scaffolds from Marine Fungi. Mar Biotechnol 24: 1014-1022 <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10164-6>

Fátima N, Ismail T, Muhammad SA et al (2016) *Epicoccum* sp. An emerging source of unique bioactive metabolites. Acta Pol Pharm 73:13-21

Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V (2017) Resistência antimicrobiana: uma ameaça emergente global aos sistemas de saúde pública. Crit Rev Food Sci Nutr 57:2857-2876 <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

Fisher MC, Hawkins J, Sanglard D et al (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science 360:739-742 <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>

Fisher MC and Denning DW (2023) The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. Nat Rev Microbiol 21:211-212 <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x>

Guo H, Sun B, Gao H et al (2009) Diketopiperazines from the Cordyceps-colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. J Nat Prod 72:2115-9 <https://doi.org/10.1021/np900654a>

Hawas U, Abou El-Kassem L (2019) Anticancer and antiviral Diketopiperazine produced by the Red Sea endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*. Lett Org Chem 16:409-414

Hassani MA, Oppong-Danquah E, Feurtey A et al (2022) Differential Regulation and Production of Secondary Metabolites among Isolates of the Fungal Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. Appl Environ Microbiol 22:e0229621 <https://doi.org/10.1128/aem.02296-21>

Jamal M, Ahmad W, Andleeb S et al (2018) Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc 81:7-11 <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

Kainz K, Bauer MA, Madeo F, Carmona-Gutierrez D (2020) Fungal infections in humans: the silent crisis. Microb Cell 7:143-145 <https://doi.org/10.15698/mic2020.06.718>

Kamat S., Kumar S, Philip S, Kumari M (2023) Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. Dev A Microbiol Biotech Chapter 10:181-209 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00001-6>

Kang YF, Chien SL, Wu HM et al (2014) Secondary metabolites from the leaves of *Aquilaria sinensis*. Chem Nat Compounds 50:1110-1112 <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1174-7>

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta biochimica Polonica 56:211-224 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19543556/>

Kiss T, Fenyvesi F, Bácskay I et al (2010) Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction Eur J Pharm Sci 40:376-380. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>

Kumar G, Karthik L, Rao KVB (2011) Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an *in vitro* study. Elixir Appl Botany 40: e5537

Kebede B and Shibeshi W (2022) *In vitro* antibacterial and antifungal activities of extracts and fractions of leaves of *Ricinus communis* Linn against selected pathogens. Vet Med Sci 8:1802-1815 <https://doi.org/10.1002/vms3.772>

Leite MCA, Bezerra APDB, Sousa JPD et al (2014) Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. Evid Based Complementary Altern Med 17:234 <https://doi.org/10.1155/2014/378280>

Leutou AS, Yun K, Son BW (2014) Microbial transformation of dihydroxyphenylacetic acid by the marine-derived bacterium *Stappia* sp. Bul K Chem Soc 35:2870-2872 <https://doi.org/10.5012/BKCS.2014.35.9.2870>

Li S, Wang Y, Xue Z et al (2021) The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. Trends Food Sci Technol 109:103-115 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>

Lin RJ, Kao CL, Yeh HC et al (2020) Secondary Metabolites of *Michelia pilifera*. Chem Nat Compd. 56:1176-1177 <https://doi.org/10.1007/s10600-020-03260-3>

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol Biol Evol 16:1799-1808 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>

Long C, Lu XL, Gao Y (2011) Description of a *Sulfitobacter* strain and its extracellular cyclodipeptides. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:393752 <https://doi.org/10.1155/2011/393752>

Lu L, Zhu L X, Yang Z et al (2022) Metabolomics analysis of freeze–thaw tolerance enhancement mechanism of ϵ -poly-l-lysine on industrial yeast. *Food Chem* 15:368-382 <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodchem.2022.132315>

Makarasen A, Reukngam N, Khlaychan P et al (2018) Mode of action and synergistic effect of valinomycin and cereulide with amphotericin B against *Candida albicans* and *Cryptococcus albidus*. *J Mycol Med* 28:112-121 <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.11.007>

Mani-López E, Cortés-Zavaleta O, López-Malo AA (2021) review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Appl Sci* 44 <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04102-1>

Martinez LR, and Casadevall A (2015) Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Spectr* 3 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.MB-0006-2014>

Melo MCR, Maasch JRMA, de la Fuente-Nunez C (2021) Accelerating antibiotic discovery through artificial intelligence. *Commun Biol* 9:1050 <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02586-0>

Mayer FL, and Kronstad JW (2017) Disarming Fungal Pathogens: *Bacillus safensis* Inhibits Virulence Factor Production and Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *mBio* 3:e01537-17 <https://doi.org/10.1128/mBio.01537-17>

Miron D, Battisti F, Silva FK et al (2014) Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev bras Farmacogn* 24:660-667 <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>

Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N et al (2003) A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-*C. albicans* Activities. *Inf Immunity* 71:5273-5279 <https://doi.org/10.1128/iai.71.9.5273-5279.2003>

Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F et al (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629–655 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Orfali R, Aboseada MA, Abdel-Wahab NM et al (2021) "Recent updates on the bioactive compounds of the marine-derived genus *Aspergillus*." RSC advances 11:17116-17150

<https://doi.org/10.1039/D1RA01359A>

Ortiz A and Sansinenea E (2017) Cyclic Dipeptides: Secondary Metabolites Isolated from Different Microorganisms with Diverse Biological Activities. Curr Med Chem 24: 2773-2780 <https://doi.org/10.2174/0929867324666170623092818>

Ouyang X, Hoeksma J, van der Velden G et al (2021) Berkchaetoazaphilone B has antimicrobial activity and affects energy metabolism. Sci Rep 11:18774 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98252-w>

Papon N, Copp BR, Courdavault V (2022) Mar. drugs. Biology, pipelines, current and future prospects for production. Biotechnol Adv 54:107871 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107871>

Parameswaran PS, Naik CG Vinod R (1997) "Secondary metabolites from the sponge *Tedania anhelans*: Isolation and characterization of two novel pyrazole acids and other metabolites." J Nat Products 60:802-803 <https://doi.org/10.1021/np970134z>

Park DK, Lee KE, Baek CH et al (2006) Cyclo (Phe-Pro) modulates the expression of ompU in *Vibrio* spp. J Bacteriol Mar 188:2214-21 <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2214-2221.2006>

Passos GFS, Gomes MGM, Aquino TM et al (2020) Computer-Aided Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of Novel Acrylamides as Potential Inhibitors of E3-E2-E1 Glycoproteins Complex from Chikungunya Virus. Pharmaceuticals 13:141 <https://doi.org/10.3390/ph13070141>

Paulino GVB, Félix CR, Landell MF (2020) Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil. J Basic Microbiol 60:103-111 <https://doi.org/10.1002/jobm.201900394>

Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G et al (2013) Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 32:1311–1320 <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1881-1>

Pippi B, Lopes W, Reginatto P et al (2019) New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. Saudi Pharm J 27:41-48 <https://doi.org/10.1016/j.isps.2018.07.017>

Qader MM, Hamed AA, Soldatou et al (2021) Antimicrobial and antibiofilm activities of the fungal metabolites isolated from the marine endophytes *Epicoccum nigrum* M13 and *Alternaria alternata* 13A. Mar Drugs 19:232 <https://doi.org/10.3390/md19040232>

Rhee KH (2004) Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. Int J Antimicrob Agents 24:423-7 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.05.005>

Raheem N, and Straus SK (2019) Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides with Antibacterial and Antibiofilm Functions. Front Microbiol 10 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02866>

Rasband WS (2018) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>

Ribeiro RA, Vitorino MV, Godinho CP et al (2021) Yeast adaptive response to acetic acid stress involves structural alterations and increased stiffness of the cell wall. Sci Rep 11:12652 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92069-3>

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA (2020). <http://www.rstudio.com/>

Schoch CL, Seifert KA, Huhndor S et al (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci 109:6241-6246 <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Scopel M, Abraham WR, Henriques AT, Macedo AJ (2013) Dipeptide *cis*-cyclo (Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. Bio Med Chem Let 23:624-626. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.020>

Senger FR, Campos-Silva R, Landell MF et al (2022) Anti-*Trichomonas vaginalis* activity and chemical analysis of metabolites produced by marine-associated fungi. Parasitol Res 121:981–989 <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07442-6>

Shin HJ (2020) Natural Products from Marine Fungi. Mar drugs 18:227-230 <https://doi.org/10.3390/md18050230>

Singulani JL, Silva DL, Lima et al (2022) The impact of COVID-19 on antimicrobial prescription and drug resistance in fungi and bacteria. *Braz J Microbiol* 53:1925-1935. (2022). <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00818-x>

Song Z, Hou Y, Yang Q et al (2021) Structures and Biological Activities of Diketopiperazines from Marine Organisms: A Review. *Mar Drugs* 21:403 <https://doi.org/10.3390/md19080403>

Stempinski PR, Gerbig GR, Greengo SD, Casadevall A (2023) Last but not yeast-The many forms of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 5:e1011048 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011048>

Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL (2007) A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol Phylogenet Evol* 44:1204-1223 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.011>

Tan YP and Shivas RG (2022) *Index Fungorum*. 511:1–8 <https://www.indexfungorum.org/Publications/Index%20Fungorum%20no.511.pdf>

McTaggart L, Richardson SE, Seah C et al (2011) Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 49:2522-7 (2011). <https://doi.org/10.1128/JCM.00502-11>

Vitale S, Colanero S, Placidi M et al (2022) Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research. *Molecules* 27:3566 <https://doi.org/10.3390/molecules27113566>

Voser TM, Campbell MD, Carroll AR (2022) How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts. *Nat Prod Rep* 39:7-19 <https://doi.org/10.1039/d1np00051a>

Wang G, Dai S, Chen M et al (2010) Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. *Chem Nat Compd* 46:583-585 <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9680-8>

Wang A, Tang S, Cao S (2021) Antimicrobial compounds from marine fungi. *Phytochem. Rev* 20:85-117 <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09705-5>

Wickham H (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4 <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wright AD, Osterhage C, König GM (2003) Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. *Org Biomol Chem* 7:507-10 <https://doi.org/10.1039/b208588g>

Xu LL, Han T, Wu JZ et al (2009) Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of Panax ginseng and its endophytic fungus. *Phytomedicine* 16:609-16 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.03.014>

Yan ZWS, Ding M, Guo H et al (2019) The Purification, Characterization, and Biological Activity of New Polyketides from Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Epicoccum nigrum* SCNU-F0002. *Mar Drugs* 12:414 <https://doi.org/10.3390/md17070414>

Youssef FS, Ashour ML, Singab ANB, Wink MA (2019) Comprehensive Review of Bioactive Peptides from Marine Fungi and Their Biological Significance. *Mar Drugs* 29:559 <https://doi.org/10.3390/md17100559>

Yurchenko A.N, Smetanina OF, Ivanets EV et al (2016) Pretrichodermamides D-F from a Marine Algicolous Fungus *Penicillium* sp. KMM 4672. *Mar Drugs* 27:14:122 <https://doi.org/doi:10.3390/md14070122>

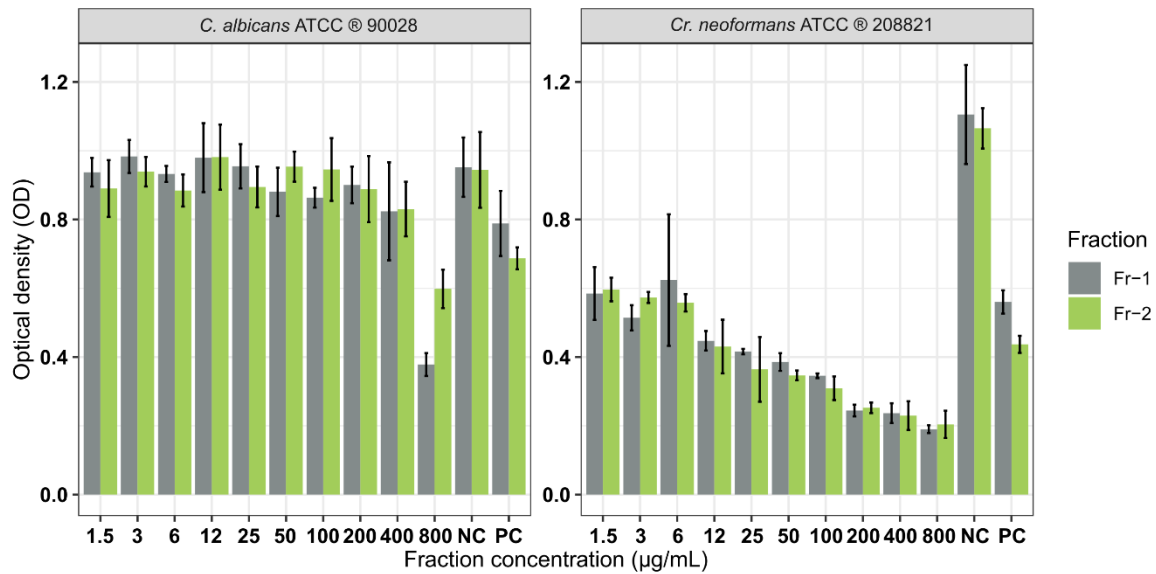
Zhai MM, Niu HT, Li J et al (2015) Talaromycolides A-C, Novel Phenyl-Substituted Phthalides Isolated from the Green Chinese Onion-Derived Fungus *Talaromyces pinophilus* AF-02. *J Agric Food Chem* 4:9558-64 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04296>. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26466717

Zhang Y, Liu S, Che Y, Liu X (2007) Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a Cordyceps-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. *J Nat Prod* 70:1522-5 <https://doi.org/10.1021/np070239u>

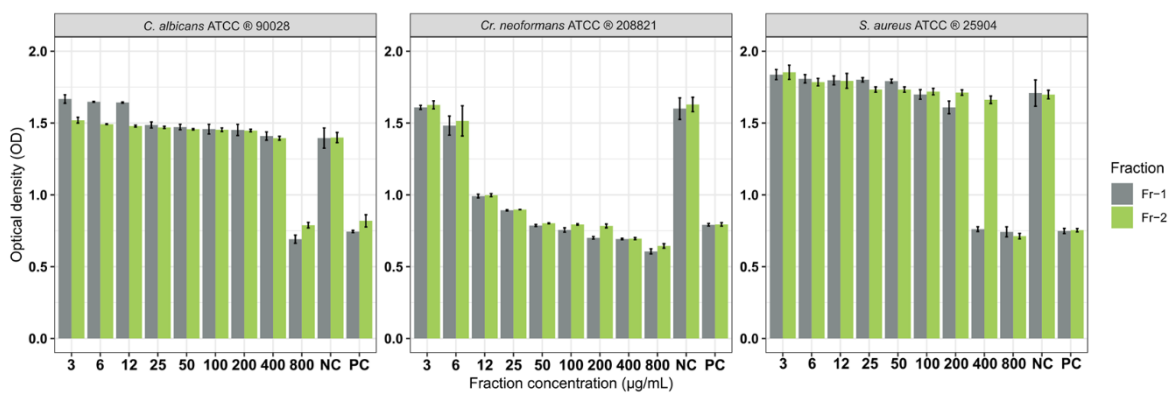
Zou G, Tan Q, Chen Y et al (2021) Furobenzotropolones A, B and 3-hydroxyepicoccone B with antioxidative activity from mangrove endophytic fungus *Epicoccum nigrum* MLY-3. *Mar Drugs* 19:395 <https://doi.org/10.3390/md19070395>

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C et al (2011) Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. *J med microbiol* 60:612-618 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.027748-0>

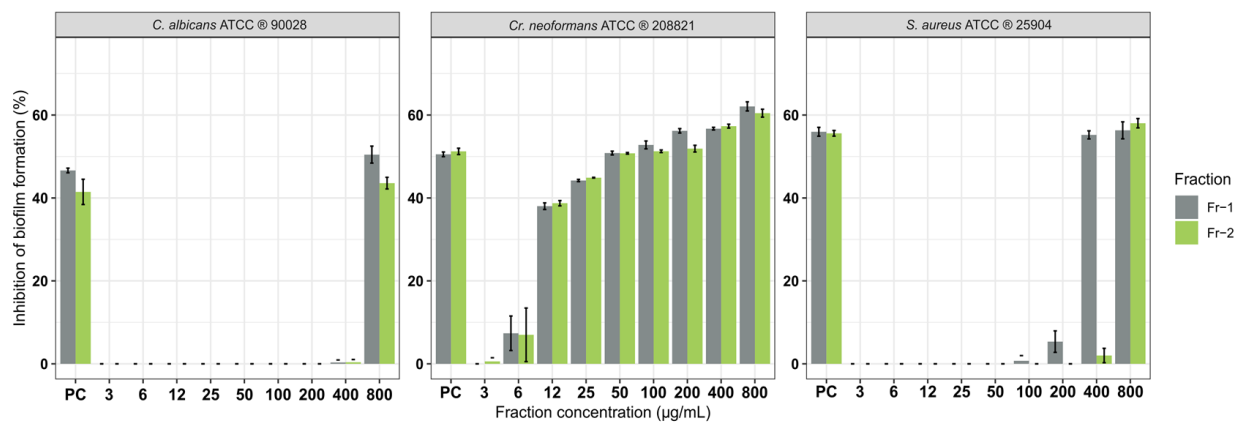
Supplementary Material



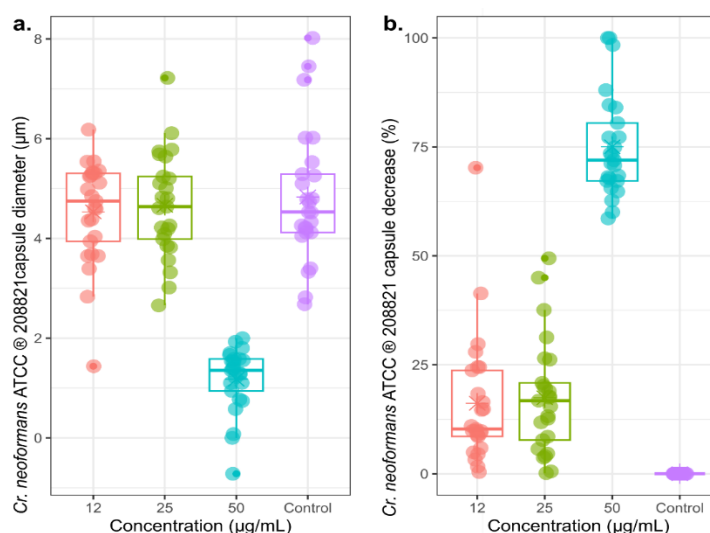
Supplementary Fig. 1 Effect of compounds present in the fractions Fr-1 and Fr-2 produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the disruption of biofilm formation for the emerging pathogens *C. albicans* ATCC® 90028 and *Cr. neoformans* ATCC® 208821, PC (positive control). Calculated with references to optical densities (OD) measured for the spectrophotometry.



Supplementary Fig. 2 Effect of compounds present in the fractions Fr-1 and Fr-2 produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the inhibition of biofilm formation for the emerging pathogens *C. albicans* ATCC® 90028, *Cr. neoformans* ATCC® 208821 and Gram-positive bacteria *S. aureus* ATCC®25904, PC (positive control). Calculated with references to optical densities (OD) measured for the spectrophotometry.



Supplementary Fig. 3 Effect of compounds present in the fractions Fr-1 and Fr-2 produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the inhibition of biofilm formation for the emerging pathogens *C. albicans* ATCC® 90028, *Cr. neoformans* ATCC® 208821, and Gram-positive bacteria *S. aureus* ATCC® 25904, PC (positive control).



Supplementary Fig. 4 Effect of compounds produced by *E. chloridis* FMPV 05 on the reduction of the *Cr. neoformans* ATCC® 208821 capsule. Cell culture without the evaluated agent was used as control. **a.** Capsule diameter in micrometers (μm) and **b.** Decrease in capsule diameter in percentage.

Supplementary Table 1. Chemical constituents annotated from Fr-1 and Fr-2 from *E. chloridis* FMPV 05 by GC-MS

	Peak	RT (min)	Compound	Area (%)	RI ^a
Fr- 1	1	4.07	Isoamyl acetate	14.80	-
	2	21.23	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	20.85	1372 ^b
	3	21.77	Orcinol	5.37	1385
	4	22.44	Tetradecane	1.07	1400
	5	26.66	NI	3.38	1505
	6	26.95	NI	1.12	1513
	7	27.81	NI	0.94	1536
	8	28.05	NI	2.60	1543
	9	30.32	Hexadecane	0.49	1600
	10	38.53	NI	1.08	1832
	11	41.21	Cyclo Leu-Pro	12.62	1912 ^{c,d}
	12	41.83	Cyclo Leu-Pro (isomer)	21.15	1932 ^{c,d}
	13	42.50	NI	1.03	1953
	14	51.35	NI	0.66	-
	15	51.68	Cyclo Phe-Val	6.22	2259 ^e
	16	54.84	Cyclo Pro-Phe	4.50	2375 ^{d,e}
	17	56.84	NI	0.44	2451
	18	59.40	Diocetyl phthalate	0.18	2551

	19	66.38	Octacosane	1.51	2816
Fr- 2	1'	4.01	Isoamyl acetate	60.65	-
	2'	14.20	NI	1.10	1199
	3'	25.04	Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	35.86	1466 ^f
	4'	66.39	Octacosane	2.39	2816

NI: not identified; RT: retention time; RI: retention indices on RTx-5MS capillary column. Leu: leucine, Ile: isoleucine; Pro: proline; Phe: phenylalanine; Val: valine. References: ^aAdams, 2007, ^bWu et al., 1991, ^cBofinger et al., 2017, ^dXu et al., 2009; ^eKim et al., 2014; ^fLalel et al., 2003.

Capítulo III

Metabolic constituents of the marine fungus *Aspergillus sydowii* FMPV 10 and its antifungal activity

Hector M. C. Navarro^{1,2}, Victor D. F. dos Santos Tavares², João X. de Araújo-Júnior³, Melissa F. Landell^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

²Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, AL, Brazil.

³Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Maceió, AL, Brazil.

Correspondence: M.F. Landell (melissa.landell@gmail.com).

Abstract

Filamentous fungi from the marine environment are synthetic machinery of secondary metabolites (SMs) that can contribute to treating emerging pathogens with biological potential. *Aspergillus sydowii* is a cosmopolitan species of filamentous fungi that establishes relationships with hosts as part of their microbiota. The synthesis of SMs can be limited using common cultivation strategies in the laboratory. The One Strain Many Compounds (OSMAC) strategy promotes the reactivation of silenced biosynthetic routes, allowing the synthesis of new molecules with biological potentials of interest. Synthesis of SMs by strain *A. sydowii* FMPV 10 were obtained through OSMAC with culture media containing glucose or chitosan as carbon sources, producing various molecules from different chemical classes. These molecules demonstrated antagonistic activity against the pathogenic fungi *C. albicans* and *Cr. neoformans*. The extract obtained with ethyl acetate containing glucose as a carbon source (AsG-EtOAc) was responsible for the antagonism, and from this, 21 compounds were annotated through ESI-MS. The most representative were sulfolithocholic acid (13a) in cation mode and aspergoterpenin C (4b) in anion profiling as the potential compounds responsible for weak antifungal activity against *C. albicans* and strong activity against *Cr. neoformans*. The compound (13a) has no reports in the literature on biological activities nor of fungal origin. In contrast, the compound (4b) is reported to be produced by fungi and with reports for marine strains of *A. sydowii*. It was not possible to annotate other compounds produced. SMs obtained with the medium containing chitosan as a carbon source did not present antimicrobial activity against the pathogens tested; however, the annotated compounds are not reported in the literature associated with fungi. The use of the OSMAC strategy shows a synthesis of different compounds, and it cannot be ruled out that these compounds may present other biological activities.

Keywords: Antimicrobial activity; coral reef;; secondary metabolites.

1. Introduction

Likewise to numerous species within the genus, *Aspergillus sydowii* is a cosmopolitan filamentous fungi established in different ecological niches that can be found in a variety of environments, including soil, freshwater water, plant derived material, desertic, hypersaline and arctic environments (Abdel-Azeem et al., 2016; Cong et al., 2017; Mohamed et al., 2021; Pennerman et al., 2016). The life cycle of *A. sydowii* is essentially terrestrial, being unable to fully develop its life cycle in marine environments, where they have been isolated from mangroves, coral reefs, estuaries, and marine animals (de Silva Lima et al., 2018; Gao et al., 2017; Kumar et al., 2021; Smith et al., 1996). In marine environments, it has been noted for participating in pathogenic processes (aspergillosis) in corals of the *Gorgonias* genus, being associated with 90% of the mortality of these corals (Alker et al., 2001; Geiser et al., 1998; Hayashi et al., 2016; Soler-Hurtado et al., 2016). Additionally, it has also been related to various diseases in a wide range of organisms (Amin et al., 2019).

In the study performed by Vadlapudi et al. (2017), 807 secondary metabolites were listed from unique species of *Aspergillus* genus, in which 30 of these compounds have been associated with *A. sydowii* species. Secondary metabolites from *A. sydowii* have been identified with potential applications in biotechnology, medicine, and agriculture fields (Amin et al., 2019; Ganesh Kumar et al., 2021; Liu et al., 2019; Wang et al., 2018). These secondary metabolites exhibit outstanding

and diverse biological activities, such as antimicrobial, cytotoxic, antiviral, anti-Ab 42 aggregation, phytocidal, anti-diabetic, anti-inflammatory, mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (Mtb PtpA) inhibitory, and antioxidant activities (Amin et al., 2019; Chung et al., 2013; Liu et al., 2013; Liu et al., 2019; Kumar et al., 2021; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2008).

Microbial secondary metabolites (MSMs) are associated with the environmental conditions and their relationship with the hosts. These metabolites result from constant evolutionary processes involving complex enzymatic pathways. However, the discovery of new compounds with unprecedented structures and outstanding biological applications has diminished. It is related to the silencing of biosynthetic pathways caused by the use of conventional culture media and isolation procedures (Bode et al. 2002; Lima et al., 2018; Özkaya et al., 2018; Pan et al., 2019). Two decades after the study performed by Bode et al. (2002), one of the simplest and most effective approaches to promoting the acquisition of new MSMs from the reactivation of these silenced biosynthetic pathways is the OSMAC (One Strain Many Compounds) methodology (Silva Lima et al. 2018; Özkaya et al. 2018; Pan et al. 2019).

The emergence of new pathogens, as well as the increased number of resistance cases to treatments towards existing conventional antimicrobials, has generated the focus on recent decades on the need to develop new strategies for their control and treatment, aiming at the search for new compounds with bioactive properties from

microbial products (David et al., 2015; Kamat et al., 2023; Salvatore et al., 2018). Remarkably, filamentous fungi have established themselves in the pharmaceutical field as potential biosynthetic factories for a plethora of structurally diverse natural products with multiple biological activities (Salavatore et al., 2018; Orfali et al., 2021). Considering this, this work aims to evaluate the production of MSMs by the fungus *A. sydowii* FMPV 10 and determine their structures and biological activities.

2. Material and Methods

2.1 Strain and screening

The fungus *Aspergillus sydowii* FMPV 10 was isolated from *Haliclona chlorilla* sponge collected at Ponta Verde coral reef (9 ° 66 ' 32 " S 35 ° 69 ' 82 " W), Maceió city, Brazilian Northeast, during the fall season (April~May/2014). Molecular methods were utilized to potentially identify the taxonomy and these data have been previously published (Paulino; Félix; Landell, 2020).

2.2 Metabolites extraction for the OSMAC strategy

The OSMAC strategy was used to obtain FMPV 10 SMs (Bode et al., 2002), in which the cultivation conditions were varied by modifying the carbon source, and then two carbon sources were used (glucose and chitosan). The cultivation and obtaining of SMs was carried out as follows: *A. sydowii* FMPV 10 was reactivated on potato dextrose agar (PDA) (HiMedia™) and its purity was posteriorly confirmed.

Consecutive inoculations were performed to obtain the extracts. Initially, a solid medium containing PDA supplemented with yeast extract (1%) was inoculated and incubated at $27\text{ °C} \pm 0.2$ for nine days. At the end of the period, 1 cm^2 fragments were inoculated in Erlenmeyer flasks with 500 mL of liquid medium (AsGlu) containing (2% glucose, 0.45% NaCl, 0.45% KCl, and 0.1% yeast extract), and incubated at $27\text{ °C} \pm 0.2$ under static conditions for 14 days and in the absence of light (Senger et al., 2022; Wu et al., 2014; Vinale et al., 2013). For the medium with chitosan as a carbon source (AsChi) (chitosan 2%; NaCl 0.45%; KCl 0.45%; yeast extract 0.1%), the same conditions as previously described were used.

Subsequently, the mycelium was separated from the supernatant by vacuum filtration. A liquid-liquid extraction was performed using the supernatant and organic solvent ethyl acetate (EtOAc) in a 1.5:1.0 proportion (v/v), respectively. The EtOAc extract was then dried under reduced pressure using a rotary evaporator (Fisatom 803), stored in glass bottles, and dried at the same temperature as that used for obtaining the extract in a dry heat drying oven. Once the extracts were obtained, their masses were determined to carry out biological activity tests.

2.3 Analysis chemical of fungal extracts

The analyses of *A. sydowii* extracts using the OSMAC strategy were carried out using ESI-QTOF MS/MS in positive (H)⁺ and negative (H)⁻. Each extract was evaluated. The peak masses that were obtained from these extracts were then

compared with the data in the Human Metabolome Database (HMDB), and recorded compound annotation.

2.3.1 Liquid chromatography–mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS)

2.4 Antimicrobial activity assay

The antimicrobial potential of secondary metabolites (SMs) synthesized by *A. sydowii* FMPV 10 was evaluated using the broth microdilution (MIC) assay against some critical pathogens as categorized by the World Health Organization (WHO): *Candida albicans* ATCC® 90028 and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC® 208821.

For these tests, the pathogens were cultivated for 48 h at a temperature of 27 °C ± 0.2 in the YEPD medium (yeast extract 0.5%, peptone 1%, dextrose 2% and agar 2%). After the growth period, individual inoculums were prepared for the fungi as follows: isolated colonies were suspended in a saline solution (0.48% NaCl), and the optical density of the suspension was adjusted to a McFarland scale of 0.5, using a UV/Vis 1600 spectrometer (Pro-Tools) with values ranging from 0.11 to 0.15 at 530 nm. The inoculum were then diluted 1:50, followed by 1:20 in RPMI 1640 medium, aiming to obtain a final concentration from 5.0×10^2 to 2.5×10^3 UFC/mL.

Serial dilutions were performed in 96-well microplates by distributing 100 µL of RPMI 1640 medium (HiMedia™) containing the fungal inoculum in each well between columns 2-11. In column one, the volume was 196 µL, to which was added

4 μL of the extract obtained from FMPV 10 in ethyl acetate (EtOAc), previously diluted in pure DMSO and calculated to an initial extract concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final DMSO concentration of 2%). Serial dilutions were then carried out, homogenizing the volume of 200 μL from the first well and taking an aliquot of 100 μL transferred serially between the wells of columns 1-10, resulting in extract concentrations ranging from 400 to 0.781 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Columns 11 and 12 were used as positive and negative controls, containing inoculum with the tested pathogen and sterile medium without inoculum, respectively. For control, amphotericin B in concentration ranges of 16 -0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and fluconazole at ranges of 64 -0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used. The assay was carried out in triplicate, following the manual M27, 4th ed. (CLSI, 2017).

2.5. Determination of the minimum fungicide or fungistatic concentration

To determine the minimum fungicidal or fungistatic concentration, a subculture of the medium was performed. An aliquot of 10 μL from the contents of the wells of the microdilution plate, where the minimum inhibitory concentration was presented, was seeded onto plates containing Mueller Hinton agar medium and incubated at 35 °C for 24 - 48 hours. After incubation, the presence of growth was evaluated, in which the concentration without growth was considered the minimum fungicidal concentration. If growth was observed, it was considered fungistatic. This test was carried out in triplicate for each concentration (Kebede et al., 2022).

3. Results

3.1 Chemical and biological profiles of extracts of fungal *A. sydowii* FMPV 10

The masses obtained for the volume of 2.5 L of preformed medium with *A. sydowii* were 160 mg for AsGlu, while the yield for the carbon source AsChi was significantly lower at 64.5 mg. The influence of variations in carbon sources and fermentation of *A. sydowii* in two different media was analyzed by analysis of ESI-QTOF MS/MS (positive and negative ion mode). Variations in the biosynthesis of secondary metabolites were observed when glucose (AsGlu) and chitosan (AsChi) were used as carbon sources, as shown in Table 2.

Table 2. Compounds annotated from EtOAc-AsGlu extract of *A. sydowii* FMPV 10 from the electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS) at both positive and negative ion modes.

Peak Positive Ion Mode	m/z [M+H] ⁺	Compounds' names	Chemical formula
1a	101,0037	2,4-Pentanedione	C ₅ H ₈ O ₂
2a	141,0886	Methylimidazoleacetic acid	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂
3a	166,1223	<i>D</i> -Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂
4a	191,0703	3-Hydroxysuberic acid	C ₈ H ₁₄ O ₅
5a	232,1197	Suberylglycine	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅
6a	265,143	γ-CEHC	C ₁₅ H ₂₀ O ₄
7a	289,226	Dehydroepiandrosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
8a	305,1358	<i>N</i> -Acetylaspartylglutamic acid	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₈
9a	321,1104	18-Hydroxyarachidonic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₃
10a	349,0893	Inosinic acid	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P
11a	366,1118	Tryptophan 2-C-mannoside	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₇
12a	435,2939	3α,7α-Dihydroxycoprostanic acid	C ₂₇ H ₄₆ O ₄
13a	457,2764	Sulfolithocholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₆ S
14a	473,2496	Chenodeoxycholic acid 3-sulfate	C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S
15a	587,2799	Diacylglycerol (34:4)	C ₃₇ H ₆₄ O ₅

Peak Negative Ion Mode	m/z [M-H] ⁻		
16a	648,2549	Ceramida (D18:1/24:1(15Z))	C ₄₂ H ₈₁ NO ₃
1b	193,0509	Iduronic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇
2b	235,0272	2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadienone	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
3b	261,0785	Sorbitol-6-phosphate	C ₆ H ₁₅ O ₉ P
4b	281,1416	1-Methylinosine	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ O ₅
5b	563,2877	DG (14:0/18:2)	C ₃₅ H ₆₄ O ₅

When analyzing the compounds present in each of the extracts obtained from *A. sydowii*, it was evident that AsGlu contained a significant number of compounds with higher polarities. The AsGlu mass spectra showed these compounds (with a relative retention time, RRt, between 1 and 3 min in both positive and negative ion modes), as depicted in Figure 1 A-B.

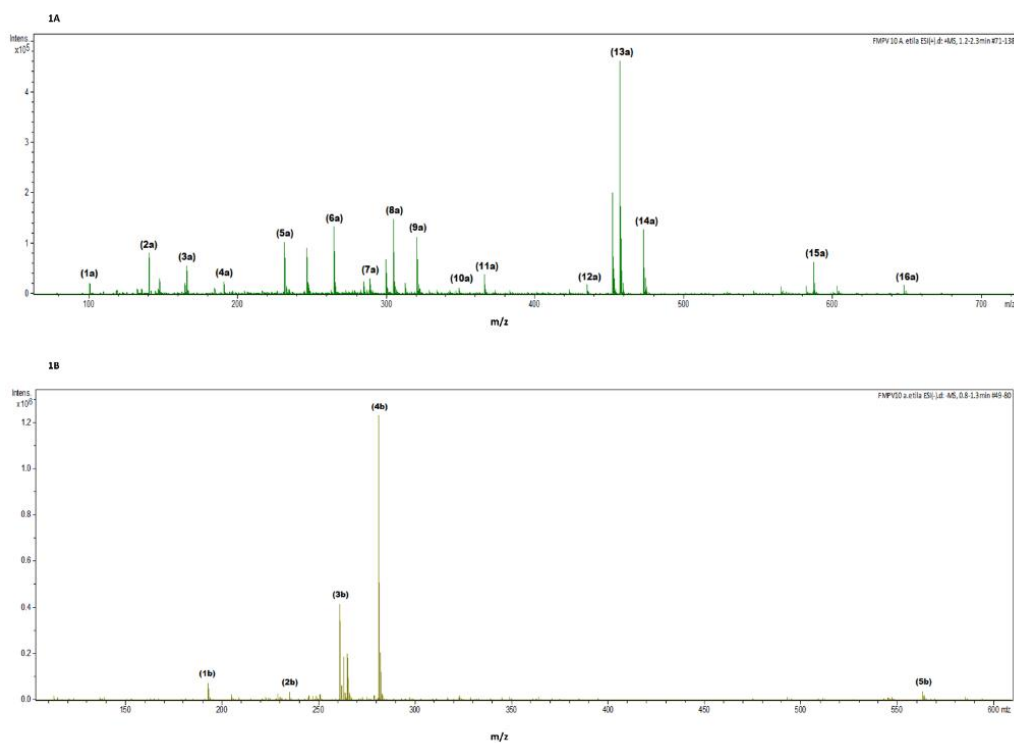


Figure 1. A. Spectrum for EtOAc extract (AsGlu) of *A. sydowii* FMPV 10 obtained by ESI-MS positive ion mode. The codes (1a – 16a). **B.** Spectrum for EtOAc extract of *A. sydowii* FMPV 10 obtained by ESI-MS negative ion mode. The codes (1b – 5b), correspond to the peaks presented in Table 1.

The spectra of the extract obtained from the AsChi medium (with a relative retention time, RRt, between 1 and 3 min positive and negative ion mode) is shown in figure supplementary 1 and table supplementary 1. The change in the carbon source to chitosan promoted the biosynthesis of less polar compounds, as observed in the ESI-MS spectra of the AsChi extract.

The nutritional changes experienced by *A. sydowii* FMPV 10 stimulated the expression of more diverse secondary metabolites (SMs) among the sources. For AsGlu, SMs annotated in positive ion mode, as sulfolithocholic acid (**13a**), and also in negative ion mode, as 1-Methylinosine (**4b**), were the most representative ones, while for AsChi SMs annotated in positive ion mode as Clevidipine butyrate and negative ion mode at Suberylglycine. It was observed that the compounds (2a), (5a) and (1b) synthesized by FMPV 10 in AsGlu were the only compounds present in the AsChi extract.

3.2 Antimicrobial activity assay

The implementation of the OSMAC strategy to assess the synthesis of SMs from *A. sydowii* FMPV 10 and their potential antimicrobial activity revealed that the medium (AsGlu) where glucose was the carbon source, showed inhibitory activity against the pathogenic fungi *C. albicans* and *Cr. neoformans*. (Table 3). In contrast,

the medium using chitosan (AsChi) as a carbon source did not exhibit activity against any of the tested pathogens.

Table 3. Evaluation of antifungal activity using the microdilution method of SMS synthesized by *A. sydowii* obtained from ethyl acetate extract (EtOAc), via the OSMAC strategy. It shows the fungicidal or fungistatic activity for each extract, the symbol (-) indicates no activity.

Evaluated extracts	The Minimum Inhibitory Concentration (MIC- µg/mL)			
	<i>C. albicans</i> ATCC® 90028		<i>Cr. neoformans</i> ® 208821	
	Fungistatic Activity	Fungicidal Activity	Fungistatic Activity	Fungicidal Activity
AsGlu	400	-	50	100
AsChi	-	-	-	-
Amphotericin B	3.125		1.562	
Fluconazole	1.56		0.781	

The MIC assay was also enabled to determine whether the extracts had fungicidal or fungistatic effects. In the AsGlu medium, the extract exhibited fungistatic action at the highest evaluated concentration against *C. albicans* (400 µg/mL) without showing any fungicidal activity. Regarding *Cr. neoformans*, it displayed fungistatic action up to a concentration of 50 µg/mL, and fungicidal action from 100 µg/mL, proving to be more promising against the pathogenic basidiomycetes fungus.

4. Discussion

The extract from AsGlu demonstrated activity against the tested pathogenic fungi. It contained 21 peaks, 16 in positive ion mode and another 5 in negative ion mode, as annotated from the Human Metabolome Data Base (HMDB). The annotated compounds were compared with literature reports of secondary metabolites produced by *A. sydowii*, using the reported masses as a reference. The compounds annotated in the HMDB did not match those previously noted for *A. sydowii*. It is important to note that out of the seven compounds annotated in positive and negative modes based on reports for *A. sydowii*, only one of them has shown biological activities, specifically antimicrobial properties.

4.1. Chemical and biological profiles of SMs annotated of *A. sydowii* FMPV 10

The most representative compounds annotated in the HMDB in positive and negative ion modes were sulfolithocholic acid (**13a**), not reported for fungi, and 1-methylinosine (**4b**), described as an intermediate in human metabolism. However, evaluations in the literature of fungal products show this compound is potentially associated with (7S)-(+)-Hydroxysydonic acid or aspergoterpenin C, this SM has been widely isolated from strains of *A. sydowii* of marine origin, mainly associated with hosts such as red algae (*Acanthophora spicifera* and *Symphyocladia latiuscula*), from niches associated with marine sediments in India, China, and Antarctica, in

which its antibacterial and anti-inflammatory activities have also been reported (Ibrahim et al., 2023).

The annotation of 21 secondary metabolites (SMs) in the AsGlu extract was based on the HMDB. However, no reports related to fungi or biological activity were found for these compounds. Some peaks in positive mode (**1a-4a** and **12a-16a**) are considered metabolic by products or intermediate compounds in synthesizing antimicrobial agents. For instance, 2,4-Pentanedione (**1a**) is a case in point (Ballantyne; Cawley, 2001). Methylimidazoleacetic acid (**2a**) constitutes the major waste (80%) in human histamine metabolism (Ballantyne; Cawley, 2001) and was also found in plants after treatment with growth-promoting endophytic bacteria (Mahmood; Kataoka, 2020).

D-Phenylalanine (**3a**) is present in the metabolism of several organisms, including *Escherichia coli* (K12, MG1655). In the plant *Nothapodytes nimmoniana*, it was one of the significantly more expressed SMs present in extracts with antagonistic activity against a cervical cancer cell line (HMDB0000325; Gayakwad et al., 2020). 3-Hydroxysuberic acid (**4a**) is an important amino acid used in the biosynthesis of several compounds with antimicrobial activity, such as gramicidin S, bacitracin, and polymyxin B1. This amino acid is uncommon in primary metabolism (Kurzątkowski; Kuczerowska, 2020). On the other hand, 3 α ,7 α -Dihydroxyco-prostanoic acid (**12a**), Sulfolithocholic acid (**13a**), Chenodeoxycholic acid 3-sulfate (**14a**), Diacylglycerol (34:4) (**15a**), and Ceramide (D18:1/24:1(15Z)) (**16a**) have been

reported as metabolic products or metabolic signals of humans or animals in the HMDB. However, there are no reports of their biological activities or possible fungal origin.

Additionally, some other secondary metabolites (SMs) annotated in positive ion mode (**5a-11a**) in the HMDB have been reported as SMs potentially associated with various inborn errors of metabolism in humans, such as Suberylglycine (**5a**). γ -CEHC (**6a**) is a water-soluble metabolite with antioxidant properties against γ -Tocopherol (Ju et al., 2023). Dehydroepiandrosterone (**7a**) is the most abundant hormone in humans and it can also be synthetically derived from imidazolium salts, exhibiting antifungal and antibacterial activity (Hryniewicka et al., 2021).

Moreover, *N*-acetylaspartylglutamic acid (**8a**), 18-hydroxyarachidonic acid (**9a**), and inosinic acid (**10a**) are considered intermediate metabolites or important nucleotides in metabolic pathways in humans. These pathways are associated with psychiatric disorders and the production of prostaglandins (Kuksis; Pruzanski, 2017). In plants, these compounds can affect the pathways of alanine, aspartate, and glutamate metabolism, promoting the adaptation of cotton seeds to saline and water stress factors (Liu et al., 2021). Still, inosinic acid (**10a**) exists in all living species, from bacteria to plants to humans. Some inosine derivatives have recently been approved for clinical trials against the SARS-CoV-2 virus (Novak et al., 2020).

Lastly, tryptophan 2-C-mannoside (**11a**) is one of the main metabolites positively associated with age (Sol et al., 2020). It was recently reported by Jurado

Mañogil et al. (2023) as a compound involved in the response to drought and brackish environments in tomatoes and halophytes. However, no reports were found regarding this compound's presence in fungi or its biological activities.

Mass data related to the peaks present in the spectrum of the EtOAc-AsGlu extract were compared with the literature, aiming to determine if any of these were related to compounds produced by *A. sydowii*. For the masses of some peaks in positive ion mode (**5a-10a**) and negative ion mode (**3b** and **4b**), we found correspondences to compounds produced by strains associated with *A. sydowii*.

Peak (**5a**) corresponded to acremolin, synthesized by *A. sydowii* isolated from deep-sea sediments in the South Atlantic Ocean, and exhibited antimicrobial activity against *Arthrobacter* (Niu et al., 2022). This compound was initially reported for the marine fungus *Acremonium strictum*, where it demonstrated cytotoxic activity (Julianti et al., 2021). Peak (**6a**) was annotated from the EtOAc extract in the marine fungus *A. sydowii* ZSDS1-F6 as (S)-(+)-Dehydrosidonic, showing antimicrobial activity against *Klebsiella pneumonia* and *Aeromonas hydrophila* (Wang et al., 2014). A compound associated with peak mass (**7a**) was annotated for *A. sydowii* as 4-Methoxycarbonyl diorcinol, in which no reported biological activity has been found (Wang et al., 2018). The phytopathogenic fungus of the *Colletotrichum* genus synthesized this same steroid compound (Kim; Shim et al., 2019).

Peak **(8a)** corresponds to aspergilol annotated from a strain of *A. sydowii* collected from seawater in Xiamen, China, and has been no reported its biological activity (Wang et al., 2028; Ibrahim et al., 2023). Peak **(9a)** corresponds to Dihydroxanthone (7*R*,8*R*)-AGI-B4. This compound was the only one to present antioxidant activity with values of 17 μ M and was obtained from *A. sydowii* (Ibrahim et al., 2023; Trisuwan et al., 2011). Peak **(10a)** was associated with 2-(Ethoxycarbonyl)-4'-carboxydiorcinal obtained from EtOAc extract of *A. sydowii* FNA026 in the China Sea, with no report of biological activity (Ibrahim et al., 2023).

Aspercuparene A **(3b)**, a rare sesquiterpenoid, obtained from the strain MCCC 3A00324 of *A. sydowii* isolated from deep-sea sediments in the South Atlantic Ocean was reported, but no biological activity was reported.

4.2 Metabolic comparison of AsGlu and AsChi extracts obtained through the OSMAC strategy for *A. sydowii*

Analysis using the OSMAC strategy to stimulate metabolic pathways silenced for *A. sydowii* FMPV 10 showed that only three of the compounds noted were synthesized from the two AsGLu-AsChi media, namely Methylimidazoleacetic acid, Suberylglycine, and Iduronic acid. The compounds not representative in the analyses were not involved in the antimicrobial activity against the pathogenic fungi tested.

A greater number of compounds were noted from the AsChi extract. Although they did not show antimicrobial activity, we do not rule out the possibility that they may present other biological activities. This strategy revealed that around 95% of the compounds noted were different in the two extracts, indicating that the strategy can stimulate metabolic routes that synthesize completely different products in the same strain.

Conclusions

OSMAC strategy is a valuable tool for synthesizing different compounds from a single lineage, showing how biosynthetic routes respond to different external factors such as carbon sources. We found that *A. sydowii* FMPV 10 showed a higher chemodiversity, as well as biological activity against *C. albicans* and *Cr. neoformans*, in which they demonstrated fungistatic action at concentrations of 50 µg/mL and above this fungicidal activity.

1-Methylinosine (4b) is present in AsGli - EtOAc extract of *A. sydowii* FMPV 10, and it was one of the most representative and noted as (7S)-(+)-Hydroxysidonic acid or aspergoterpenin C. Furthermore, it is annotated as potentially responsible for the antimicrobial activity against the fungal pathogens tested.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, number of grants 408718/2013-7,

465536/2014-0, 311553/2018-4 and 312889/2021-6) and Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES).

Reference

Abdel-Azeem, A. M., et al., "Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats." *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (2016): 3-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00001-4>

Alker, Alisa P., Garriet W. Smith, and Kiho Kim. "Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals." *Hydrobiologia* 460 (2001): 105-111. <https://doi.org/10.1023/A:1013145524136>

Amin, Muhammad, et al., "New pyrone and cyclopentenone derivatives from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305." *Natural product research* 35. 2 (2021): 318-326. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1629919>

Ballantyne, Bryan, and Timothy J. Cawley. "Toxicology update." *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical. Industrial and Environmental Applications* 19. 4 (1999)

Bode, Helge Björn et al., Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3. 7 (2002): 619-627. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9)

Cong, Bailin, et al., "Isolation, characterization and transcriptome analysis of a novel Antarctic *Aspergillus sydowii* strain MS-19 as a potential lignocellulosic enzyme source." *Bmc Microbiology* 17. 1 (2017): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1028-0>

da Silva Lima, Gesiane, et al., "Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors." *Phytochemistry Letters* 24 (2018): 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.007>

David, Bruno, Jean-Luc Wolfender, and Daniel A. Dias. "The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends." *Phytochemistry Reviews* 14 (2015): 299-315. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

Devi, Rubee, et al., "Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health." *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* 2020: 147-161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7>

Ganesh Kumar, A., et al., "Genome sequence analysis of deep-sea *Aspergillus sydowii* BOBA1 and effect of high pressure on biodegradation of spent engine oil." *Scientific Reports* 11. 1 (2021): 9347. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88525-9>

Gao, Tong, et al., "Secondary metabolites from the marine fungus *Aspergillus sydowii*." *Chemistry of Natural Compounds* 53 (2017): 1204-1207. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2241-7>

Gayakwad, Shivani, et al. "Proteomic and metabolomic analysis of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Graham) extracts' treatment on HeLa cells." *Journal of Proteins and Proteomics* 11 (2020): 27-62. <https://doi.org/10.1007/s42485-020-00031-0>

Geiser, David M., et al., "Cause of sea fan death in the West Indies." *Nature* 394. 6689 (1998): 137-138. <https://doi.org/10.1038/28079>

Gilbert III, H. F., and Marion H. O'Leary. "Modification of arginine and lysine in proteins with 2, 4-pentanedione." *Biochemistry* 14. 23 (1975): 5194-5199.

Hayashi, Aiko, et al., "*Aspergillus sydowii* marine fungal bloom in Australian coastal waters, its metabolites and potential impact on *Symbiodinium* dinoflagellates." *Marine Drugs* 14. 3 (2016): 59. <https://doi.org/10.3390/md14030059>

Hryniewicka, Agnieszka, et al. "Dehydroepiandrosterone derived imidazolium salts and their antimicrobial efficacy." *Bioorganic Chemistry* 108 (2021): 104550. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104550>

Ibrahim, Hassan, et al., "Marine Biomaterials: Resources, Categories, and Applications." *Marine Biomaterials: Therapeutic Potential*. Singapore: Springer Nature Singapore (2022): 1-39. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5374-2_1

Ibrahim, Sabrin RM, et al. "Secondary Metabolites, Biological Activities, and Industrial and Biotechnological Importance of *Aspergillus sydowii*." *Marine Drugs* 21. 8 (2023): 441. <https://doi.org/10.3390/md21080441>

Ju, Y., et al. "Passion fruit peel and its zymolyte enhance gut function in Sanhuang broilers by improving antioxidation and short-chain fatty acids and decreasing inflammatory cytokines." *Poultry Science* 102. 6 (2023): 102672. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102672>

Julianti, Elin, et al., "Acremolin, a new 1H-azirine metabolite from the marine-derived fungus *Acremonium strictum*." *Tetrahedron Letters* 53. 23 (2012): 2885-2886. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.03.133>

Jurado-Mañogil, Carmen, et al., "Comparative metabolomic analysis between tomato and halophyte plants under intercropping conditions." *Physiologia Plantarum* 175. 4 (2023): e13971. <https://doi.org/10.1111/ppl.13971>

Kamat, S., et al., Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. *Microbial Biomolecules* (2023): 181-209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00001-6>

Kim, Jung Wha, and Sang Hee Shim. "The fungus *Colletotrichum* as a source for bioactive secondary metabolites." *Archives of pharmacal research* 42 (2019): 735-753. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01142-z>

Kim, Sunghwan, et al. "PubChem 2023 update." *Nucleic acids research* 51. D1 (2023): D1373-D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>

Kuksis, Arnis, and Waldemar Pruzanski. "Epoxy Fatty Acids: Chemistry and Biological Effects." *Fatty Acids* (2017): 83-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809521-8.00003-9>

Kurzątkowski, Wiesław, and Joanna Kuczerowska. "Antibiotic biosynthesis and secondary metabolism in high-yielding strains of, and." *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology* 56. 4 (2020): 422-428. <https://doi.org/10.21307/PM-2017.56.4.422>

Liu, Bingbing, et al., "Spatially resolved metabolomics and lipidomics reveal salinity and drought-tolerant mechanisms of cottonseeds." *Journal of agricultural and food chemistry* 69. 28 (2021): 8028-8037. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01598>

Liu, Nianzhen, et al., "Structurally diverse sesquiterpenoids and polyketides from a sponge-associated fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO41301." *Fitoterapia* 135 (2019): 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.031>

Liu, Yu-Jing, et al., "Antimicrobial secondary metabolites from the seawater-derived fungus *Aspergillus sydowii* SW9." *Molecules* 24. 24 (2019): 4596. <https://doi.org/10.3390/molecules24244596>

Mahmood, Ahmad, and Ryota Kataoka. "Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria." *Microbiological research* 234 (2020): 126421. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126421>

Mohamed, Akram H., Bassem A. Balbool, and Ahmed M. Abdel-Azeem. "Aspergillus from different habitats and their industrial applications." Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: *Biodiversity and Ecological Perspectives*. Springer International Publishing (2021): 85-106. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_3

Niu, Siwen, et al., "Acremolin D, a new acremolin alkaloid from the deep-sea sediment derived *Aspergillus sydowii* fungus." *Natural Product Research* 36. 19 (2022): 4936-4942. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1913587>

Niu, Siwen, et al., "Phenolic bisabolane and cuparene sesquiterpenoids with anti-inflammatory activities from the deep-sea-derived *Aspergillus sydowii* MCCC 3A00324 fungus." *Bioorganic Chemistry* 105 (2020): 104420. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104420>

Novak, Jurica, et al., "Can natural products stop the SARS-CoV-2 virus? A docking and molecular dynamics study of a natural product database." *Future Medicinal Chemistry* 13. 04 (2021): 363-378. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0248>

Orfali, Raha, et al., "Recent updates on the bioactive compounds of the marine-derived genus *Aspergillus*." *RSC advances* 11 (2021): 17116-17150. <https://doi.org/10.1039/D1RA01359A>

Özkaya, Ferhat Can, et al., "Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach." *Fitoterapia* 131 (2018): 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.10.008>

Pan, Rui, et al., "Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review." *Frontiers in Microbiology* 10 (2019): 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00294>

Pennerman, K. K., et al., "Fungal volatile organic compounds (VOCs) and the genus *Aspergillus*." *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*(2016): 95-115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00007-5>

Rajabalaya, Rajan, and Sheba Rani David. "Antifungal and antibacterial agents from marine organisms." *Encyclopedia of Marine Biotechnology* 4 (2020): 2453-2469. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch111>

Salvatore, Maria Michela, et al., "GC–MS approaches for the screening of metabolites produced by marine-derived *Aspergillus*." *Marine Chemistry* 206 (2018): 19-33. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2018.08.003>

Smith, Garriet W., et al., Caribbean sea-fan mortalities. *Nature* 383, 487 (1996). <https://doi.org/10.1038/383487a0>

Soler-Hurtado, Mar, et al., "*Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in gorgonian octocorals of the Ecuadorian Pacific." *PLoS One* 11. 11 (2016): e0165992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165992>

Sun, Jianghao, et al., "Study on Human Urinary Metabolic Profiles after Consumption of Kale and Daikon Radish using a High-resolution Mass Spectrometry-Based Non-targeted and Targeted Metabolomic Approach." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68. 48 (2020): 14307-14318. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05184>

Tian, He, et al., "Precise metabolomics reveals a diversity of aging-associated metabolic features." *Small Methods* 6. 7 (2022): 2200130. <https://doi.org/10.1002/smt.202200130>

Vadlapudi, Varahalarao, et al., "*Aspergillus* secondary metabolite database, a resource to understand the secondary metabolome of *Aspergillus* genus." *Scientific Reports* 7. 1 (2017): 7325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07436-w>

Vinale, Francesco et al., Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters* 347. 2 (2013): 123-129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>

Wang, Jun-Feng, et al., "Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6." *The Journal of antibiotics* 67. 8 (2014): 581-583. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.39>

Wang, Weiyi, et al., "Secondary metabolites isolated from the deep sea-derived fungus *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7." *Natural product research* 33. 21 (2019): 3077-3082. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519561>

Wang, Ya-Nan, et al., "Diphenyl ethers from a marine-derived *Aspergillus sydowii*." *Marine Drugs* 16. 11 (2018): 451. <https://doi.org/10.3390/md16110451>

Wishart, David S., et al., "HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022." *Nucleic acids research* 50. D1 (2022): D622-D631. <https://hmdb.ca/>

Wu, Bin et al., Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. *Marine drugs*, 12. 3 (2014): 1208-1219. <https://doi.org/10.3390/md12031208>

Zhang, Min, et al., "Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*." *Journal of natural products* 71. 6 (2008): 985-989. <https://doi.org/10.1021/np700737g>

Supplementary Material

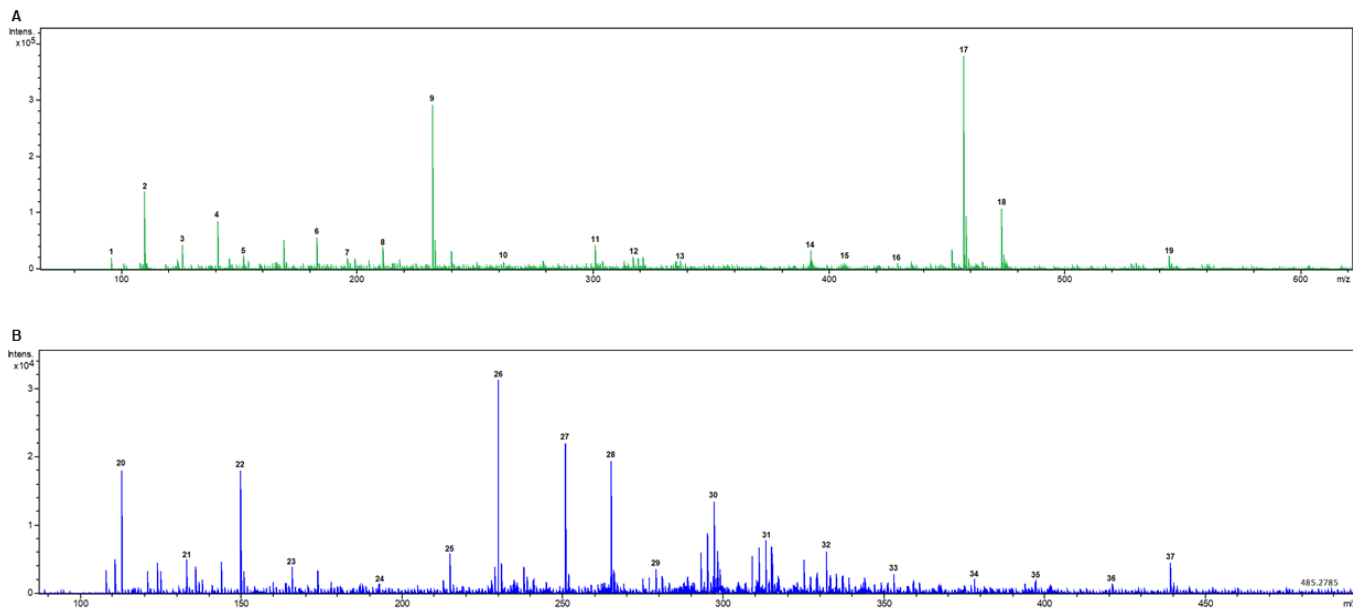


Figure supplementary 1. **A.** Spectrum for EtOAc extract (AsChi) of *A. sydowii* FMPV 10 obtained by ESI-MS positive ion mode. The codes (1 – 19). **B.** Spectrum for EtOAc extract of *A. sydowii* FMPV 10 obtained by ESI-MS negative ion mode. The codes (20 – 38), correspond to the peaks presented in Table supplementary 1.

Table supplementary 1. Compounds annotated from EtOAc-AsChi extract of *A. sydowii* FMPV 10 from the electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS) at both positive and negative ion modes.

Pake Positive Ion Mode	m/z [M+H] ⁺	Compounds' name	Chemical formula
1	96,0048	NA	

2	110,0613	2-Hydrazinopyridine	C ₅ H ₇ N ₃
3	126,0561	N-ethylmaleimide	C ₆ H ₇ NO ₂
4	141,0889	Methylimidazoleacetic acid	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂
5	152,0727	4-Aminobenzohydrazide	C ₇ H ₉ N ₃ O
6	183,0923	Dacarbazine	C ₆ H ₁₀ N ₆ O
7	196,0987	Metyrosine	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃
8	211,1407	Trimesic acid	C ₉ H ₆ O ₆
9	232,1194	Suberylglycine	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅
10	262,1083	Aspartyl-Glutamine	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₆
11	301,1406	NA	
12	317,118	Hydroxytyrosol 1-O-glucoside	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
13	337,223	Fentanyl	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O
14	392,2794	N-Stearoyltaurine	C ₂₀ H ₄₁ NO ₄ S
15	406,2911	N-(4-Methoxyphenyl)-all-trans-retinamide	C ₂₇ H ₃₅ NO ₂
16	429,305	Schidigeragenin B	C ₂₇ H ₄₀ O ₄
17	457,2773	Clevipidine butyrate	C ₂₁ H ₂₃ Cl ₂ NO ₆
18	473,2516	Chenodeoxycholic acid sulfate	C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S
19	544,3459	NA	
Pake Negative Ion Mode	m/z [M- H]-	Compounds annotated (HNDB)	Chemical formula
20	112,9856	NA	
21	133,0406	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅
22	150,0557	N-Phenylglycine	C ₈ H ₉ NO ₂
23	166,0514	Zapotidine	C ₇ H ₉ N ₃ S
24	193,0581	Iduronic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇
25	215,0833	7-Methoxydeoxyvasicinone	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂
26	230,1049	Suberylglycine	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅
27	251,0212	3,3'-Dichlorobenzidine	C ₁₂ H ₁₀ Cl ₂ N ₂
28	265,1472	Amiloride chloride	C ₆ H ₉ Cl ₂ N ₇ O
29	279,1610	Prehumulinic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₄
30	297,2430	Isotrifoliol	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
31	313,2374	1-Salicylate glucuronide	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
32	332,1440	Pentopril	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅
33	353,2047	2'-Phosphophloretin	C ₁₅ H ₁₅ O ₈ P
34	378,1488	2-(Arabinosylamino)-3-(glucosylamino)propanenitrile	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₉
35	397,2230	Malagashanine	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄

36	421,2259	1,4-Dioctyl sulfosuccinic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₇ S
37	439,1407	Propylene glycol alginate	C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃
38	485,2785	LysoPA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	C ₂₅ H ₄₃ O ₇ P

5. Discussão Geral

A diversidade química de MSs obtida de fungos filamentosos marinhos da região setentrional na Zona Econômica Exclusiva – Amazônia azul, mostrou que linhagens como *Epicoccum chloridis* (FMPV 05) e *Aspergillus sydowii* (FMPV 10), são fungos com um potencial na sínteses de PNs com potentes atividades antimicrobianas, principalmente contra patógenos emergentes fúngicos como *C. neoformans*, *C. albicans* e a bactéria gram-positiva *S. aureus*. A linhagem FMPV 05 se mostraram capaz de sintetizar MSs, anotados potencialmente como dicetopiperazinas (DKPs), as quais são hipotetizadas como as moléculas responsáveis pela atividade antimicrobiana contra patógenos avaliados. Também se mostraram eficientes no potencial controle de fatores de virulência específicos dos fungos patogênicos testados, como a produção do biofilme, inibição na produção de hifas e pseudohifas, e a capacidade de afetar a cápsula polissacarídica. Mostrando que fungos deste ambiente apresentam ferramentas que lhes permitem se perfilar como potenciais precursores de moléculas que contribuam com a demanda crescente de antimicrobianos que se tem na atualidade.

As DPKs ciclo Leu-Pro e seu isômero, a ciclo Phe-Val e ciclo Pro-Phe, presentes nos extratos produzidos por *E. chloridis* (FMPV 05) são reportados na literatura como sintetizados por alguns organismos terrestres, principalmente bactérias e escassos reportes para fungos filamentosos. Já no ambiente marinho, as moléculas anotadas como DKPs são produzidas por bactérias e possuem atividades contra patógenos fúngicos como *C. albicans* e *C. neoformans*. Muitas dessas atividades ocorrem de forma sinérgica pela combinação de dois ou mais DKPs, estas DKPs estão bem documentadas enquanto a sua atividade citotóxica

contra células cancerígenas (Hassani *et al.* 2022; Hawas; El-Kassem; 2019; Ortiz; Sansinenea, 2017; Song *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2009; Youssef *et al.*, 2019). As DPKs ciclo Leu-Pro, seu isômero, a ciclo Phe-Val e ciclo Pro-Phe, não contam com reportes na literatura sendo utilizadas para o controle de fatores de virulência, assim como para os potenciais mecanismos de ação nas células dos micro-organismos patogênicos testados.

Por outro lado, o fungo *A. sydowii* (FMPV 10) quando submetido a estratégia OSMAC, promovendo a ativação de rotas biossintéticas através de alterações nos parâmetros de cultivo, particularmente no uso de diferentes fontes de carbono (Glicose e Quitosana), foi constatado que a porcentagem de similaridade entre os compostos sintetizados entre as duas condições foi baixa, compartilhando só os compostos, ácido metilimidazolacético, Suberilglicina e ácido idurônico. Também, se determinou que o crescimento de FMPV 10 no meio contendo glicose gerou compostos com atividade antifúngica, acometendo principalmente a o patógeno *C. neoformans* e de forma mais fraca contra *C. albicans*. Já o meio contendo quitosana não mostrou atividade nos seus extratos, porém o número de compostos sintetizados e anotados foi maior, mostrando que a alteração nos parâmetros de fermentação influencia o tipo de compostos que são sintetizados e as diferentes rotas metabólicas.

A espécie *A. sydowii* submetida a ativação das rotas metabólicas usando a estratégia OSMAC (da Silva Lima *et al.*, 2018), onde a linhagem de origem terrestre *A. sydowii* (622), usando três meios de cultura variando suas fontes de carbono e nitrogênio, produziu inibidores da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima alvo de medicamentos em tratamentos de Alzheimer. Nesse mesmo estudo as diferentes fontes de nitrogênio mostraram padrões distintos quanto a produção de inibidores da AChE, evidenciando que estas alterações podem modular a sínteses de compostos. Porém, não se descarta que metabólitos produzidos presentes nos

extratos a partir dos meios que não mostraram atividade antimicrobiana possam apresentar outro tipo de atividades biológicas, fazendo necessários estudos complementares.

Espécies de fungos que fazem parte da microbiota de corais e esponjas, eventualmente sob condições de pressões ecológicas podem se manifestar como causadores de doenças, entre elas as espécies *A. sydowii* e *A. versicolor* consideradas causadoras de aspergilose em diferentes recifes de coral no mundo, no entanto também são espécies promissoras na obtenção de PNs, de aplicações na indústria e biotecnologia (Amin *et al.*, 2019; Ganesh Kumar *et al.*, 2021; Giddings e Newman, 2022; Pang *et al.*, 2021). A maquinaria sintética de *A. sydowii* mostra que pelo menos 30 PNs que são sintetizados pela espécie exibem atividades biológicas como as antimicrobianas, citotóxica, antiviral, antidiabética, anti-inflamatória, antioxidante entre outros. Estas atividades estão associadas a linhagens da espécie que foram isoladas de diferentes ambientes (Amin *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2013; Liu *et al.*,

Diferentes fungos filamentosos isolados da Zona Econômica Exclusiva (Amazônia azul), tem se mostrado como uma fonte de recursos biotecnológicos importante, sobretudo na procura e obtenção de produtos. Alguns exemplos destes fungos são os isolados *Penicillium citrinum* FMPV 15 e *Trichoderma longibrachiatum* FMPV 51 que foram promissores na produção de PNs com atividade antibacteriana, antifúngica e citotóxica capazes de controlar o parasito *Trichomonas vaginalis*. Com atividade antimicrobiana os fungos *Xylaria* sp. (BT05), *Penicillium waksmanii* e outros fungos isolados a partir da alga vermelha *Bostrychia tenela*. O fungo *Aspergillus* sp. (BRF 030), isolado de sedimento costeiro mostrou a produção de γ -lactâmicos, heteroespirocíclico, alcaloides nos extratos com atividade citotóxica, outras atividades como inibição do biofilme de patógenos emergentes por policetídeos produzidos pelos fungos do gênero *Penicillium* (Edres *et al.*, 2022; Felício *et al.*, 2015; Loges *et al.*, 2020; Saraiva *et al.*, 2015; Scopel *et al.*, 2017;

Wilke *et al.*, 2021). Todos estes trabalhos ressaltam a importância desta região na bioprospecção de produtos naturais de fungos de ambiente marinho.

A diversidade taxonômica de fungos em ambiente marinho é ainda pouco explorada, sendo conhecida apenas 1% desta, e um número ainda menor diretamente relacionadas com recifes. Além disso, ainda que ecossistemas de recifes sustentem boa parte da diversidade dos oceanos, as interações e processos que ocorrem nesse tipo de ambiente são pouco conhecidas (Calabon *et al.*, 2023; Jones *et al.*, 2019; Roik; Reverter; Pogoreutz, 2022; Silveira *et al.*, 2017). Os fungos marinhos no Brasil e no mundo são uma fonte de produtos naturais (PN), que contribuem com a crescente demanda por novos compostos, muitos destes com estruturas químicas inéditas sintetizados a partir de rotas metabólicas especializadas (Berlinck *et al.*, 2004; 2017; Braga *et al.*, 2018; da Costa Souza *et al.*, 2016; Durães *et al.*, 2021; Voser; Campbell; Carroll, 2022; Zou *et al.*, 2021). Considerando também, que fungos no ambiente marinho participam de diversas interações que os facultam de gerar uma gama de compostos que auxiliam seu estabelecimento nos diferentes nichos ecológicos (Bills; Gloer, 2016; Bode *et al.*, 2002). Não obstante ainda existe uma lacuna de conhecimento no que respeita ao papel dos fungos nestes ecossistemas, para o qual se levantam várias hipóteses. Fatos que são corroborados com o potencial apresentados pelos fungos *Epicoccum chloridis* (FMPV 05) e *Aspergillus sydowii* (FMPV 10), neste trabalho.

6. Conclusões Gerais

Este trabalho contribuiu com o conhecimento na produção de metabólitos secundários por fungos filamentosos marinhos associados a recifes de coral na região nordeste na ZEE – Amazônia azul. Também foi possível determinar que a produção de PNMMs apresentam potenciais biológicos interessantes como controladores de micro-organismos patogênicos emergentes considerados de alto risco pela OMS. Da mesma forma, corroboramos que fungos filamentosos marinhos

quando submetidos a condições de cultivo onde os parâmetros são modificados, apresentam um potencial ativação de rotas biossintéticas silenciadas quando estes estão sob condições laboratoriais e de cultura convencionais.

Os resultados obtidos sobre a produção de metabólitos secundários pelos fungos filamentosos *E. chloridis* (FMPV 05) e *A. sydowii* (FMPV 10), trazem evidência do potencial que estas espécies têm na síntese e obtenção de compostos com atividade biológicas, principalmente em relação ao controle de bactérias e fungos unicelulares patogênicos, destacando os promissores resultados no controle dos fatores de virulência do fungo *C. neoformans*. Por outro lado, uma possível hipótese a ser testada sobre o papel que as moléculas produzidas pelas linhagens (FMPV 05 e FMPV 10), podem chegar a apresentar em relação a ecologia em recifes de corais, é se estes compostos estão potencialmente relacionado em parte a defesa deles e dos seus hospedeiros contra outros micro-organismo causadores de doenças, ou se estes são usados na competição nestes nichos contra bactérias, fungos e outros organismos.

No entanto, os papéis funcionais que fungos filamentosos marinhos cumprem no ambiente de recifes de coral ainda precisa ser explorado, existe uma lacuna no conhecimento sobre as funções de fungos nestes ecossistemas, assim como no conhecimento sobre a diversidade destes micro-organismos. A espécie *E. chloridis* (FMPV 05), sendo o primeiro reporte para ambiente marinho e em particular para recifes de coral, contribui com o conhecimento da diversidade de fungos marinhos no ecossistema marinho e vislumbra os possíveis papéis que eles apresentam neste ambiente. A microbiota dos recifes de coral é importante na estabilidade destes ecossistemas favorecendo a saúde dos mesmo e controlando os potenciais disbiose que acometem o ambiente coralino de maneira local e global.

Referências

ABDEL-AZEEM, Ahmed M. *et al.* (Ed.). Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: **Biodiversity and Ecological Perspectives**. Springer International Publishing, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5>

ADAMS, Robert. P.; SPARKMAN, David. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal American Society Mass Spectrometry**. v. 18, n. 4 p. 803-806, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.001>

AFROZ TOMA, Maria *et al.* Fungal Pigments: Carotenoids, Riboflavin, and Polyketides with Diverse Applications. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 454, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9040454>

AHUMADA-RUDOLPH, Ramón; NOVOA, Vanessa; BECERRA, José. Morphological response to salinity, temperature, and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7166-5>

AINSWORTH, T. D.; FORDYCE, A. J.; CAMP, E. F. The other microeukaryotes of the coral reef microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 980-991, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.007>

ALBAUGH, David *et al.* Cell Wall Active Antifungal Compounds Produced by the Marine Fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256 III. Biological Properties of 15G256γ. **The Journal of antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 317-322, 1998. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.317>

ALLISON, David G.; LAMBERT, Peter A. Modes of action of antibacterial agents. In: **Molecular medical microbiology**. Academic Press, 2015. p. 583-598. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9>

AMEEN, Fuad; ALNADHARI, Saleh; AL-HOMAIDAN, Ali A. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 224-231, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>

ANDERSON, Rosaleen *et al.* **Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications**. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-0-470-97244-1 (cloth) – ISBN 978-0-470-97245-8 (pbk.)

ANISZEWSKI, Tadeusz. **Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications**. Elsevier, 2015. ISBN: 0444594337,9780444594334

AVALOS, Javier; LIMÓN, M. Carmen. Fungal secondary metabolism. **Encyclopedia**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2021. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>

AVESKAMP, M. M *et al.* Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v. 65, n. 1, p. 1-60, 2010. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>

BAHRAM, Mohammad; NETHERWAY, Tarquin. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 2, p. fuab058, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>

BAI, Hong *et al.* Zebrafish embryo toxicity microscale model for ichthyotoxicity evaluation of marine natural products. **Marine Biotechnology**, v. 18, p. 264-270, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9688-6>

BAJPAI, Vivek K. Antimicrobial secondary metabolites from marine fungi: A mini review. 2016.

BALDRIAN, Petr *et al.*, High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. **Fungal Diversity**, v. 114, n. 1, p. 539-547, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y>

BANHA, Thomás NS. *et al.*, The Great Amazon Reef System: A fact. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 1088956, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1088956>

BASSO, Rossana Patricia *et al.* COVID-19-associated histoplasmosis in an AIDS patient. **Mycopathologia**, v. 186, p. 109-112, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00505-1>

BAUER A., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, V. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.

BEHERA, Abhaya Dayini; DAS, Surajit. Ecological insights and potential application of marine filamentous fungi in environmental restoration. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 1-38, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11157-023-09655-2>

BELLWOOD, David R. *et al.*, The meaning of the term 'function' in ecology: A coral reef perspective. **Functional Ecology**, v. 33, n. 6, p. 948-961, 2019. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13265>

BENGTSON, Stefan *et al.*, Fungus-like mycelial fossils in 2.4-billion-year-old vesicular basalt. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 6, p. 0141, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0141>

BERLINCK, Roberto GS *et al.* Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004. <https://doi.org/10.1021/np0304316>

BERLINCK, Roberto GS *et al.* The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

Braga RM, Padilla G, Araújo WL (2018) The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. *Crit Rev Microbiol* 44:759-778 <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>

CALABON, Mark S. *et al.* Updates on the classification and numbers of marine fungi. **Botanica Marina**, v. 66, n. 4, p. 213-238, 2023. <https://doi.org/10.1515/bot-2023-0032>

DA COSTA SOUZA, P. Nirlane *et al.* Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. *Microbiology*, v. 162, n. 1, p. 12-22, 2016. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000168>

DA SILVA LIMA, Gesiane *et al.* Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 39-45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.007>

Durães F, Szemerédi N, Kumla D *et al.* Metabolites from Marine-Derived Fungi as Potential Antimicrobial Adjuvants. *Mar Drugs* 19:475, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19090475>

ENDRES, Carla Teresinha *et al.* Mass Spectrometry Metabolomics Approach Reveals Anti-Trichomonas vaginalis Scaffolds from Marine Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1014-1022, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10164-6>

FELÍCIO, Rafael de *et al.* Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 641-650, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.003>

GANESH KUMAR, A., *et al.* Genome sequence analysis of deep sea *Aspergillus sydowii* BOBA1 and effect of high pressure on biodegradation of spent engine oil. **Scientific Reports**, 2021, vol. 11, no 1, p. 9347. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88525-9>

GIDDINGS, Lesley-Ann; NEWMAN, David J. Bioactive compounds from extremophilic marine fungi. **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, p. 349-382, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_18

GIDDINGS, Lesley-Ann; NEWMAN, David J. Bioactive compounds from extremophiles: genomic studies, biosynthetic gene clusters, and new dereplication methods. **Springer**, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14836-6>

HASSANI M. Amine, Opong-Danquah Ernest, Feurtey Alice. *et al.* Differential Regulation and Production of Secondary Metabolites among Isolates of the Fungal Wheat Pathogen *Zyloseptoria tritici*. **Applied and Environmental Microbiology**, 22:e0229621, 2022. <https://doi.org/10.1128/aem.02296-21>

HAWAS, Usama W.; ABOU EL-KASSEM, Lamia T. Anticancer and antiviral diketopiperazine produced by the Red Sea endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*. **Letters in Organic Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 409-414, 2019. <https://doi.org/10.2174/1570178615666181009120422>

JONES, EB Gareth *et al.* An online resource for marine fungi. **Fungal Diversity**, v. 96, p. 347-433, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5>

KAMAT, Siya, *et al.* Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. **Microbial Biomolecules**. Academic Press, p. 181-209, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00001-6>

LIU, Nianzhen, *et al.* Structurally diverse sesquiterpenoids and polyketides from a sponge-associated fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO41301. **Fitoterapia**, vol. 135, p. 27-32, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.031>

LIU, Yu-Jing, *et al.* "Antimicrobial secondary metabolites from the seawater-derived fungus *Aspergillus sydowii* SW9." **Molecules** 24. 24:4596, 2019 <https://doi.org/10.3390/molecules24244596>

LOGES, Luciana A. *et al.* Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo. **Microbial pathogenesis**, v. 143, p. 104066, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104066>

MOHAMED, Akram H.; BALBOOL, Bassem A.; ABDEL-AZEEM, Ahmed M. *Aspergillus* from different habitats and their industrial applications. En Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: **Biodiversity and Ecological Perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 85-106.. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_3

MOHAMED, Amin R. *et al.*, The coral microbiome: towards an understanding of the molecular mechanisms of coral–microbiota interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 2, p. fuad005, 2023. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad005>

ORTIZ Aurelio and SANSINENEA Estibaliz. Cyclic Dipeptides: Secondary Metabolites Isolated from Different Microorganisms with Diverse Biological Activities. **Current Medicinal Chemistry**, 24: 2773-2780, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170623092818>

PANG, Ka-Lai *et al.* Pathogenic fungi of marine animals: A taxonomic perspective. **Fungal Biology Reviews**, v. 38, p. 92-106, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.008>

ROIK, Anna; REVERTER, Miriam; POGOREUTZ, Claudia. A roadmap to understanding diversity and function of coral reef-associated fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 6, p. fuac028, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac028>

SARAIVA, Natália N. *et al.* Cytotoxic compounds from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. recovered from the sediments of the Brazilian coast. **Natural Product Research**, v. 29, n. 16, p. 1545-1550, 2015. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.987772>

SCOPEL, Marina *et al.* Arvoredol—An unusual chlorinated and biofilm inhibiting polyketide from a marine *Penicillium* sp. of the Brazilian coast. **Phytochemistry letters**, v. 20, p. 73-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.010>

SILVEIRA, Cynthia B. *et al.* Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 4, p. 575-595, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux018>

SONG, Zhiqiang, *et al.* Structures and biological activities of diketopiperazines from marine organisms: A review. **Marine Drugs**, 2021, vol. 19, no 8, p. 403. <https://doi.org/10.3390/md19080403>

WANG, Jun-Feng, *et al.* Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. **The Journal of antibiotics**, vol. 67, no 8, p. 581-583, 2014. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.39>

WANG, Ya-Nan, *et al.* Diphenyl ethers from a marine-derived *Aspergillus sydowii*. **Marine Drugs**, vol. 16, no 11, p. 451, 2018. <https://doi.org/10.3390/md16110451>

WILKE, Diogo. V. *et al.* Anticancer potential of compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, v. 87, n. 01/02, p. 49–70, 2021. <https://doi.org/10.1055/a-1257-8402>

XU, Li-Li, *et al.* Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. **Phytomedicine**, 2009, vol. 16, no 6-7, p. 609-616. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.03.014>

YOUSSEF, Fadia S., *et al.* A comprehensive review of bioactive peptides from marine fungi and their biological significance. **Marine drugs**, 2019, vol. 17, no 10, p. 559. <https://doi.org/10.3390/md17100559>