



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Rafael Dorighello Cadamuro

Prospecção da atividade enzimática e biológica do secretoma e de metabólitos secundários do fungo *Neofusicoccum parvum* isolado da planta *Avicennia schaueriana* do Mangue do Itacorubi – Ilha de Santa Catarina

Florianópolis, Santa Catarina

2022

Rafael Dorighello Cadamuro

Prospecção da atividade enzimática e biológica do secretoma e de metabólitos secundários do fungo *Neofusicoccum parvum* isolado da planta *Avicennia schaueriana* do Mangue do Itacorubi – Ilha de Santa Catarina

Dissertação submetida ao Programa de Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Fongaro

Coorientadora: Profa. Dra. Helen Treichel

Florianópolis, Santa Catarina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cadamuro, Rafael Dorighello

Prospecção da atividade enzimática e biológica do secretoma e de metabólitos secundários do fungo *Neofusicoccum parvum* isolado da planta *Avicennia schaueriana* do Mangue do Itacorubi - Ilha de Santa Catarina / Rafael Dorighello Cadamuro ; orientadora, Prof^a Dr^a Gislaine Fongaro, coorientadora, Prof^a Dr^a Helen Treichel, 2022.

136 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fungos endofíticos . 3. Perfil químico e enzimático. 4. *Neofusicoccum parvum*. 5. Atividade virucida, antiviral e bacteriostático. I. Fongaro, Prof^a Dr^a Gislaine . II. Treichel, Prof^a Dr^a Helen . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Rafael Dorighello Cadamuro

Prospecção da atividade enzimática e biológica do secretoma e de metabólitos secundários do fungo *Neofusicoccum parvum* isolado da planta *Avicennia schaueriana* do Mangue do Itacorubi – Ilha de Santa Catarina

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. William Michelin

Instituição Universidade do Contestado

Profª. Dra. Izabella Thaís da Silva

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Altemir Jose Mossi

Instituição Universidade Federal da Fronteira Sul

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Programa de Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Orientadora

Profª. Dra Gislaine Fongaro

Florianópolis, Santa Catarina

2022

Esta dissertação dedico aos meus amados familiares e amigos de Florianópolis e de Três Lagoas.

AGRADECIMENTOS

O início deste caminho se deu em **2018**, onde decidi pesquisar e me aprofundar na área de Virologia Ambiental sob a orientação da Professora Doutora Gislaine Fongaro. Após a primeira reprovação em fevereiro de **2019** me foi dada a oportunidade/privilégio de fazer parte do Laboratório de Virologia Aplicada como aluno especial.

Ao longo de 2019 incontáveis oportunidades me foram fornecidas pelo LVA, acadêmicas, profissionais e sociais. Em **12 de dezembro de 2019** fui aprovado no processo seletivo do mestrado. Em **2020** a pandemia interrompeu atividades de quase todos os pesquisadores brasileiros e internacionais, podendo retornar às atividades apenas dezembro de 2020. Ao longo de **2021** iniciei um segundo desafio, ser corpo **docente** de uma instituição particular, uma **dádiva** somada em equilíbrio ao grande peso da **responsabilidade**, que muito me enriqueceu de conhecimentos e proveu maturidade.

Em **2022** venho a finalizar minhas atividades de mestrado, com demasiados agradecimentos a todas as instâncias de esferas que me tangenciaram por todos estes anos, sou fruto da soma dos últimos anos e oportunidades.

Professora Dra Gislaine Fongaro, muito obrigado por ter aberto portas, me recebido com paciência e carinho, obrigado pelas conversas, pelo apoio, pelas instruções, devo muito do meu conhecimento, crescimento e maturidade a ti! Ao longo de 2018, 2019, 2020, 2021 e 2022 me oportunizou inúmeras vezes, com seriedade, disciplina e cuidado, sou grato por tuas atitudes, possuo admiração pela sua liderança.

Nossas atitudes com os outros emanam nossas qualidades sinceras.

Aos meus pais **Jaime Luiz Cadamuro** e **Mariane Dorighello Cadamuro**, lhes agradeço muitíssimo. Me proveram o que há de melhor em diálogo, amor, apoio, carinho, humor e filosofia. Minhas queridas irmãs, **Pilar** e **Maíra**, obrigado pelas trocas de diálogo e experiências ao longo dos anos.

Minhas queridas tias, **Maria Helena**, **Regina** e **Leila**, obrigado pelo apoio e diálogos ao longo da caminhada até aqui,

Sou grato pelas amizades construídas em 2019, 2020 e 2021. **Paula Rogovski**, obrigado pela troca de carinho, diálogo, experiências e empatia, você foi essencial em minha trajetória, possuo amor por ti.

Raphael, meu companheiro de profissão, Professor de Ciências Biológicas, foi de grande importância sua parceria e companhia, agradeço por ter trabalhado ao teu lado

Estêvão, admiro sua inteligência meu caro, foi um prazer estar ao teu lado.

Isabella, obrigado pelas conversas, companhias e happy-hours!

Beatriz Savi, meu deus, como te admiro! Sinto fortes emoções ao lembrar que pude te acompanhar desde sua chegada ao Laboratório. A ciência, minha cara amiga pesquisadora, é feita de pessoas com paixão, um enorme privilégio ter você próxima por tantos anos (2019, 2020, 2021 e 2022).

Catielen Pavi, querida amiga, virologista de mão cheia, obrigado pelo bom humor compatível com os dias, ter você perto é tão especial, obrigado pelo apoio e me ajudar em diversos momentos desta difícil jornada (domingos). As trocas de experiências e diálogos foram saborosas pra mim, admiro sua sensatez. *I can't speak this language without thinking of you!*

Dóris, querida, sua companhia é ótima, foi um prazer ter você perto em diversos momentos, obrigado pelos diálogos e risadas.

Iara, Mariana Elois, Mariane Dahmer, Giulia P., Julia Penso e Julia K., obrigado por me ajudarem em diversos momentos, pelas risadas e companhia!

Rafaela, parceira de e-mail da FAPESC, obrigado por estar presente e pelos diálogos, ainda teremos nosso Podcast.

Professoras **Izabella e Ariadne** obrigado pelos diálogos e trocas profissionais.

Ao longo desta trajetória tive contato com outras equipes. Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), agradeço por me receberem. **Tizzi, Geovanna, Monalisa e Lucas**. Lhes agradeço o carinho, paciência e toda contribuição/troca emocional e acadêmica. **Geovanna**, *our attitudes echo through the ages*, com carinho me recordo de ti.

LAMIBI, **Professora Dra Helen, Aline Frumi, Gabriel, Silvana e Helena**, obrigado por me receber, pelas oportunidades, pelo carinho e apoio nos experimentos.

Thamarys, Charline e Frumi, foi um enorme prazer conhecer vocês, as carrego no meu coração.

Adam, Bea, Loran, Luiz e Yoha, obrigado pelos momentos de apoio e trocas sinceras.

Natália, obrigado por me receber com carinho e pela experiência da proximidade e troca comigo.

Professores da UFMS, **Alex, Sérgio e Karina**, minha formação como biólogo e ser humano crítico teve enorme influência de vocês, obrigado pelas aulas e diálogos, o sabor de ensinar e conduzir ao conhecimento que arde em vocês também arde em mim.

Sérgio Posso, *pons inter scientiam et philosophiam*, estes são os dizeres anotados em meu caderno de laboratório na 1º página.

Agradeço à FAPESC pela oportunidade de realizar meu mestrado e pelo Projeto Pronem N° 04/2019 pelo fomento e oportunidade de bolsa, assim como aos coordenadores Prof Dr. Mário Steindel e Profª Drª Gislaine Fongaro.

O universo não parece ser nem
benevolente nem *hostil*, apenas
indiferente. (Carl Sagan)

RESUMO

A grande demanda por novos ativos biológicos tem estimulado a bioprospecção de novos compostos a partir de diferentes fontes naturais, como os fungos endofíticos que apresentam diversidade genética e metabólica em função de sua coevolução com plantas e ecossistema em geral. O presente estudo buscou isolar e caracterizar fungos endofíticos do manguezal de Florianópolis, região do Itacorubi, selecionando amostras vegetais de três espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*. O isolamento de fungos foi feito da raiz, caule e folha das plantas. Dentre as culturas axênicas, a cultura do fungo *Neofusicoccum parvum* foi selecionado pelo seu crescimento micelar acelerado para ser realizada a fermentação em estado sólido usando o arroz orgânico como substrato durante 7, 14 e 21 dias, visando explorar enzimas e metabólitos secundários ali produzidos. Os fermentados foram macerados quimicamente com diclorometano e metanol, e produzido então o extrato bruto. A caracterização química em sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas (*Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* - UPLC-MS) permitiu a identificação dos compostos 2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona, pertencente aos grupos das quinonas, Radicamina A, Anselone B, Calanone, Suspendole e Pestalotiopinona B. A partir do substrato fermentado após 21 dias realizou-se a análise da presença das enzimas amilase, celulase, peroxidase, lacase e lipase utilizando-se tampão de fosfato de sódio (Na₃PO₄) na concentração de 100 mM ajustado em pH 6 para extração do secretoma total de enzimas. Os principais compostos identificados pela caracterização química foram relatados com atividades biológicas variadas, como cardioprotetoras, anti-isquêmicas, anti-inflamatória, analgésico, atividade bacteriostática, bactericida em bactérias Gram negativas e Gram positivas, inibição de formação de biofilme e atividade antiviral. O resultado da avaliação da presença de atividade enzimática apresentou-se promissor para produção de amilase e peroxidase, não apresentando lacase e lipase nestas condições de extração. Já o extrato obtido utilizando-se solventes orgânicos foi submetido à ensaios de citotoxicidade nas linhagens VERO (ATCC CCL-81™ - fibroblasto de rim de macaco verde da África), A549 (ATCC CCL-185™ - câncer de pulmão humano) e L929 (ATCC CCL-1™ - fibroblasto de rato). Não houve citotoxicidade significativa ou diferencial entre as linhagens testadas em até 500 µg/mL. Os ensaios de atividade virucida e antiviral realizados com modelos adenovírus humano e coronavírus murino (HAdV-2 e MHV-3, respectivamente) foram realizados na concentração de 500 µg/mL, não demonstrando inativação ou inibição viral. O ensaio bacteriostático conduzido frente à bactéria *Listeria monocytogenes* apresentou atividade principalmente nas primeiras horas, reduzindo até 60% a divisão bacteriana. O ensaio contra gram-negativas *E. coli* (ATCC® 11303™) não apresentou redução. Tais compostos e enzimas elencam este fungo como possível fonte de metabólitos secundários com ação para diversos fins, podendo ser explorado a obtenção de novas enzimas e metabólitos secundários em processos e condições otimizados quanto à fatores nutricionais e condições experimentais para fins biotecnológicos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos 1. Biocompostos 2. Perfil químico e enzimático 3. *Neofusicoccum parvum* 4. Atividade virucida, antiviral e bacteriostático 5.

ABSTRACT

The great demand for new biological assets has stimulated the bioprospecting of new biocompounds from different natural sources, such as endophytic fungi that present genetic and metabolic diversity due to its co-evolution with plants and ecosystems in general. The present study sought to isolate and characterize endophytic fungi from the Florianópolis mangrove, Itacorubi region, selecting plant samples of three species of plants *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa*, and *Rhizophora mangle*. The isolation of fungi was carried out from the root, stem, and leaves of the plants. Among the axenic cultures, the culture of the fungus *Neofusicoccum parvum* was selected for its accelerated micellar growth to be carried out in solid state fermentation using organic rice as a substrate for 7, 14, and 21 days in order to explore enzymes and secondary metabolites produced there. The fermented ones were chemically macerated with dichloromethane and methanol, and then the crude extract was produced. Chemical characterization in an Ultra Performance Liquid Chromatography system coupled to Mass Spectrometry (Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry - UPLC-MS) allowed the identification of the compounds 2,2'-Dimethyl-3,3'-bi-1, 4-naphthoquinon, belonging to the quinone groups, Radicamine A, Ansellone B, Calanone, Sependol, and Pestalothiopinon B. From the fermented substrate after 21 days, the analysis of the presence of amylase, cellulase, peroxidase, laccase and lipase enzymes were performed using Sodium phosphate buffer (Na₃PO₄) at a concentration of 100 mM is adjusted to pH 6 for extraction of the total secretome of enzymes. The main compounds identified by chemical characterization were reported to have varied biological activities, being the quinones with activity: cardioprotective, anti-ischemic, anti-inflammatory, analgesic, bacteriostatic, bactericidal in Gram-negative and Gram-positive bacteria, inhibition of biofilm formation and antiviral. The result of the evaluation of the presence of enzymatic activity was promising for the production of amylase, cellulase and peroxidase, not showing laccase and lipase under these receiving conditions. The extract obtained using organic solvents was submitted to cytotoxicity assays on VERO strains (ATCC CCL-81™ - African green monkey kidney fibroblast), A549 (ATCC CCL-185™ - human lung cancer) and L929 (ATCC CCL-1™ - mouse fibroblast). There was no significant or differential cytotoxicity between the strains tested up to 500 µg/mL. Assays of virucidal and antiviral activity performed with human adenovirus and murine coronavirus models (HAdV-2 and MHV-3, respectively) were performed at a concentration of 500 µg/mL, showing no viral inactivation or inhibition. The bacteriostatic assay conducted against the bacterium *Listeria monocytogenes* showed activity reducing bacterial division by 60% in the first hours of contact time. The assay against gram-negative *E. coli* (ATCC® 11303™) showed no reduction. Such compounds and enzymes list this fungus as a possible source of secondary metabolites with action for different purposes, and it can be explored to obtain new enzymes and secondary metabolites in optimized processes and conditions regarding nutritional factors and experimental conditions for biotechnological purposes.

Keywords: Endophytic fungi 1. Biocompounds 2. Chemical and enzymatic profile 3. *Neofusicoccum parvum* 4. Virucidal, antiviral, and bacteriostatic activity 5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de vírus não envelopados (HAdV) e vírus envelopados (SARS-CoV-2) e suas proteínas de reconhecimento celular (adaptado de Fields, Knipe & Howley, 2007)..	22
Figura 2: Resumo gráfico dos capítulos do presente estudo e respectivas atividades executadas.	37
Figura 3: a) Coleta e isolamento de amostras vegetais. b) Processo de descontaminação de amostras coletadas. c) Isolamento com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e caracterização morfológica. d) Cultivo em estado sólido, sendo feito em arroz orgânico por 2	62
Figura 4: Etapas realizadas no processo de desinfecção de amostras de vegetais com seus respectivos tempos e conteúdo.	63
Figura 5: Morfologia macroscópica do fungo <i>Neofusicoccum parvum</i> , verso e inverso da placa.	66
Figura 6: Etapas dos ensaios realizados, na ordem de citotoxicidade nas respectivas linhagens, ensaio virucida com os respectivos vírus e ensaio antiviral com os respectivos vírus.....	98
Figura 7: Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> ao longo de 12 horas na presença do extrato total.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: principais compostos identificados após fermentação em 14 dias pelo fungo <i>N. parvum</i>	73
Tabela 2: principais compostos identificados após fermentação em 21 dias pelo fungo <i>N. parvum</i>	74
Tabela 3: Resultado da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente no extrato obtido após fermentação em 21 dias.	76
Tabela 4: apresenta as linhagens celulares avaliadas e o valor de $CC50^{-1}$	103
Tabela 5: apresenta a concentração de extratos, os vírus respectivos utilizados no ensaio virucida assim como a redução em escala logarítmica.....	103
Tabela 6: apresenta a concentração de extrato em ensaio antiviral, os vírus respectivos e a redução em escala logarítmica.....	103
Tabela 7: redução bacteriana em porcentagem, as quantias em média e o desvio padrão obtido com o grupo tratado após o tratamento por 12 horas.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µL - Microlitro

A549 – Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano

ATCC - American Type Culture Collection

CC – Concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade celular

DMEM - Dulbecco's modified Eagle medium

DNA – Ácido desoxirribose nucleico

RNA - Ácido

DO – Densidade óptica

ECP – Efeito citopático

HAdV – Adenovírus humano

HAdV-2 – Adenovírus humano sorotipo 2

HIV - Human Immunodeficiency Virus

LB - Luria Bertani (meio de cultura)

MEM – Minimum essential medium Eagle

MHV 3 – Mouse hepatitis vírus

mL – Mililitro

N. parvum – Neofusicoccum parvum

PBS - Solução tampão fosfato-salina

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

SARS-CoV-2 – Respiratory syndrome acute coronavirus 2

SFB – Soro fetal bovino

UFP – Unidade Formadora de Placa

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL.....	18
1.2 OBTENÇÃO DE BIOCOMPOSTOS.....	18
1.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS E MANGUEZAIS	19
1.4 VÍRUS ENTÉRICOS NO AMBIENTE	21
Referências utilizadas na contextualização	26
APRESENTAÇÃO E ABORDAGEM DA PRESENTE DISSERTAÇÃO DE	
MESTRADO	36
2. OBJETIVO GERAL	39
3. HIPÓTESES	40
a) Objetivo específico	43
b) Metodologia.....	44
c) Resultados.....	44
d) Considerações finais do Capítulo I.....	51
Referências do Capítulo I:	52
a) Objetivos específicos	61
b) Metodologia.....	61
c) Resultados e discussão.....	73
Referências utilizadas no Capítulo II	83
a) Objetivo específico	98
b) Metodologia.....	98
c) Resultados e discussão.....	103
d) Considerações finais do Capítulo III	106
Referências do capítulo III	107
4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	109

5. ESTUDOS FUTUROS	110
6. APÊNDICE 1 – MATERIAIS COMPLEMENTARES.....	111
7. APÊNDICE 2 – MATERIAIS COMPLEMENTARES.....	136

1. CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

1.2 OBTENÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

A busca por compostos bioativos na natureza para fins medicinais em nossa sociedade tem sido feita desde antes de relatos de Cristo. O Papiro de Eber, como exemplo, é datado de 1550 a.C, e apresenta técnicas medicinais entre os egípcios, relatando por exemplo o uso de solo com propriedades medicinais (HAAS, 1999). O documento “*Bald’s Leechbook*” inclui diversos materiais e métodos de tratamento para várias infecções diferentes, sendo este datado no século 10, oriundo do período Anglo-Saxão (450-1066) da Grã-Bretanha, usando origens vegetais como cebola e alho contra patógenos como *Staphylococcus aureus* (HARRISON *et al.*, 2015).

Em 1913 foi publicado por Paul Ehrlich, no Congresso Internacional de Medicina e Patologia, avanços nas áreas de quimioterapia e bacteriologia, identificando compostos que curavam pacientes infectados pelo que ele chamou de espiroquetas, sendo esta *Treponema pallidum*, responsável pela sífilis (BATESON, 1913; GELPI; GILBERTSON; TUCKER, 2015). A compreensão sobre antagonismo na ecologia microbiana entre bactérias e fungos teve seu início antes da descoberta de Fleming em 1928. Em 1880 Pasteur já relatava ação antagonista de bactérias entre si (BRUNEL, 1951). Em 1923, Selman Waksman observou a ação inibitória de bactérias e protozoários em solo em função de bactérias do grupo *Actinomycete* no solo. Em 1937 produziu a primeira revisão sistemática histórica de microrganismos com produção de compostos com ação inibitória contra bactérias (WAKSMAN; SCHATZ; REYNOLDS, 2010; WAKSMAN; STARKEY, 1931).

A Era de Ouro da descoberta de antibióticos entre 1940 e 1960 foi marcada pós publicação da sistemática de Waksman, onde diversas classes de produtos naturais foram descobertas, sendo alguns destes descontinuados nas décadas seguintes pela emergência/seleção de genes de resistência. O isolamento de biocompostos da época foi em torno de 70-80% da espécie *Streptomyces* (BÉRDY, 2005). Após isto, ao longo dos anos 90 a ocorrência de novas moléculas reduziu, os desafios gerados pelo surgimento de bactérias multirresistentes, reaparecimento de micobactérias, infecções por vírus como HIV (Human Immuno Deficiency Virus) pelos diversos países estimularam a novas metodologias e buscas por compostos estimulou novas abordagens e buscas (DAVIES; DAVIES, 2010; SHARP;

HAHN, 2011). Desta maneira a busca por novas moléculas bioativas em ambientes diversos passou a ser realizada.

Dentre as diversas origens de compostos, uma revisão publicada por János Bérdy demonstrou que, além de 61% dos compostos bioativos isolados de microrganismos entre os anos de 2001 e 2010 pertencerem aos fungos, o nicho como um todo para obtenção de biocompostos se apresenta como pouco explorado (BÉRDY, 2012). Para além disto, Newman e colaboradores em 2019 contabilizaram a publicação de artigos relatando o uso farmacológico de compostos naturais e sintéticos ao longo de 1981-2019. Dentre estes, os compostos obtidos a partir de fontes biológicas e derivados de produtos naturais representaram juntos 41% de todos os fármacos aceitos por órgãos reguladores com atividades biológicas. Sendo relatado de origem biológica e derivado de produtos naturais, 48% das drogas aceitas contra bactérias, 12 % contra fungos e vírus e 45% contra parasitas protozoários como *Plasmodium* e *Trypanosoma* (sendo um patógeno alvo pouco explorado nos últimos anos) (NEWMAN; CRAGG, 2020).

1.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS E MANGUEZAIS

Os fungos são tidos como exemplos clássicos de microrganismos com ampla variabilidade genética e alta capacidade de produção metabólica (HELALY; THONGBAI; STADLER, 2018; XU *et al.*, 2021). O papel ecológico de fungos filamentosos no ambiente apoiado por evidências moleculares revela a imensa diversidade de metabólitos secundários, sendo estimados em torno de 15.600 moléculas bioativas identificadas ao longo dos últimos 60 anos (ABDEL-AZEEM *et al.*, 2016; BÉRDY, 2012; NOUH, 2019).

Especialmente aos fungos endofíticos, se atribui a capacidade de riquezas metabólicas, já que possuem interação simbióticas com tecidos de plantas, elencando sua riqueza metabólica a depender das características das plantas que interagem, como por exemplo plantas de manguezais. Plantas presente no mangue apresentam baixa diversidade taxonômica de famílias/espécies, as principais são: Rhizophoraceae, Acanthaceae, Lythraceae, Verbenaceae, Combretaceae e Arecaceae, sendo as mais comuns em nosso país *Avicennia schaueriana* (Verbenaceae), *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) e *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) (RODRIGUEZ *et al.*, 2009; RAFFERTY, 2011; FRANCISCO *et al.*, 2018). Estima-se uma relação de 70 espécies adaptadas para o ambiente extremo do mangue, adaptações correlatas a peculiaridades morfológicas, fisiológicas, otimização do complexo de

raízes e filtração de sais para sobreviver em ambientes com baixa presença de oxigênio (ANANDA; SRIDHAR, 2002).

Manguezal é um ecossistema definido pela transição entre regiões costeiras, baías, foz de rios, pequenas lagunas e/ou local de junção de água continental com o ambiente marinho. Presente em mais de 118 países, distribuído ao redor do planeta nas regiões intertropicais, delimitada pelas latitudes 30° N e 30° S, com duas exceções no norte de Bermuda, latitude 32° N, e no sul da região da Austrália no 38° S (SPALDING; LEAL, 2021). Tais ecossistemas oferecem diversos benefícios econômicos como alimento, madeira, entre outros proventos para moradores de tais regiões, assim como segurança e amenização de fortes ventos e ondas. É reconhecido que o Tsunami ocorrido em 2004 na Ásia foi atenuado pela perda de força na região costeira do mangue (UDDIN *et al.*, 2013; BARBIER, 2016). Manguezais possuem também relação com processo de estabilização de pequenas partículas e absorção de poluentes, como metais pesados dispostos em corpos d'água e até mitigação de mudanças climáticas por reduzir aumentos drásticos de níveis do mar pelo aquecimento global (DONATO *et al.*, 2011; ANALUDDIN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Ao longo do mundo há uma relação de 135,883 km² de área de mangue, sendo desta, 39.905 distribuída pelas Américas e Caribe. No Brasil a abrangência de área é de 13.989 km², destes Santa Catarina detêm 104,01 km² (SILVA; FONTGALLAND, 2021).

Fungos endofíticos tem por definição relações ecológicas com suas hospedeiras onde estes habitam tecidos vivos da planta, provendo metabólitos secundários que auxiliam no desenvolvimento, manutenção e proteção da planta contra patógenos, sem causar danos (DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2013).

O primeiro relato de isolamento de fungo endofítico isolado de planta do mangue e do solo foi feita por Cribb em 1955, dando início a uma nova era de pesquisas de bioprospecção de fungos endofíticos de ecossistemas marinhos ou em contato com o mar, como o mangue, sendo um de transição entre habitat terrestre e marinho. Fungos endofíticos compõe portanto o segundo maior grupo ecológico presente em habitat marinho (CRIBB, 1955; ZHOU *et al.*, 2018).

Características intrínsecas do mangue têm demonstrado correlação com otimização e variação de metabólitos secundários com atividades biológicas produzidos por fungos endofíticos deste ecossistema, considerando desafios presentes nesse ecossistema como a

salinidade, quantidade de oxigênio disponível, competição com outras espécies além de patógenos a serem inibidos (SHANG *et al.*, 2012; RAJAMANI *et al.*, 2018).

Diversas interações fisiológicas entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras são pouco esclarecidas, havendo relações evolutivas entre estes grupos, sendo possível notar coevolução e variação de papéis nas relações ecológicas entre parasitismo para mutualismo. Condições mutualísticas estas que possibilitaram a estes fungos trocas benéficas com sua hospedeira. Ao longo das últimas duas décadas associações entre fungos e bactérias presentes no mangue tem sido pesquisada, conquistando atenção do estudo da bioprospecção de compostos e abundância de novos metabólitos secundários (RAFFERTY, 2011; ANCHEEVA *et al.*, 2018;).

Os metabólitos secundários e enzimas produzidas por fungos podem ter diversas aplicações. Hidrolases e oxirredutases são classes de enzimas com alto potencial, podendo ser aplicadas para fins industriais, têxtil, quebra de celulose e em tratamento de efluentes (SHANKAR NAIK, 2019).

1.4 VÍRUS ENTÉRICOS NO AMBIENTE

Dentre os diversos patógenos presentes no ambiente podem-se destacar os vírus, sendo esses classificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral como envelopados e não envelopados. Os vírus envelopados, de menor interesse ambiental por sua fragilidade estrutural, possuem seu genoma recoberto pelo capsídeo viral e esse pelas glicoproteínas de superfície ancoradas ao envelope lipídico, oriundos da célula hospedeira em que se replicaram. Esse envelope é facilmente inativado por detergentes convencionais, temperatura, álcoois, ácidos e bases. Já os vírus não envelopados, possuem apenas capsídeo proteico recobrindo o genoma viral que contêm proteínas de interação/reconhecimento celular, sendo esses amplamente resistentes em função do cerne da estrutura do capsídeo, segue descrito na **Figura 1** (FIELDS, KNIPE, HOWLEY, 2007).

Figura 1- Estrutura viral de vírus envelopados e não envelopados

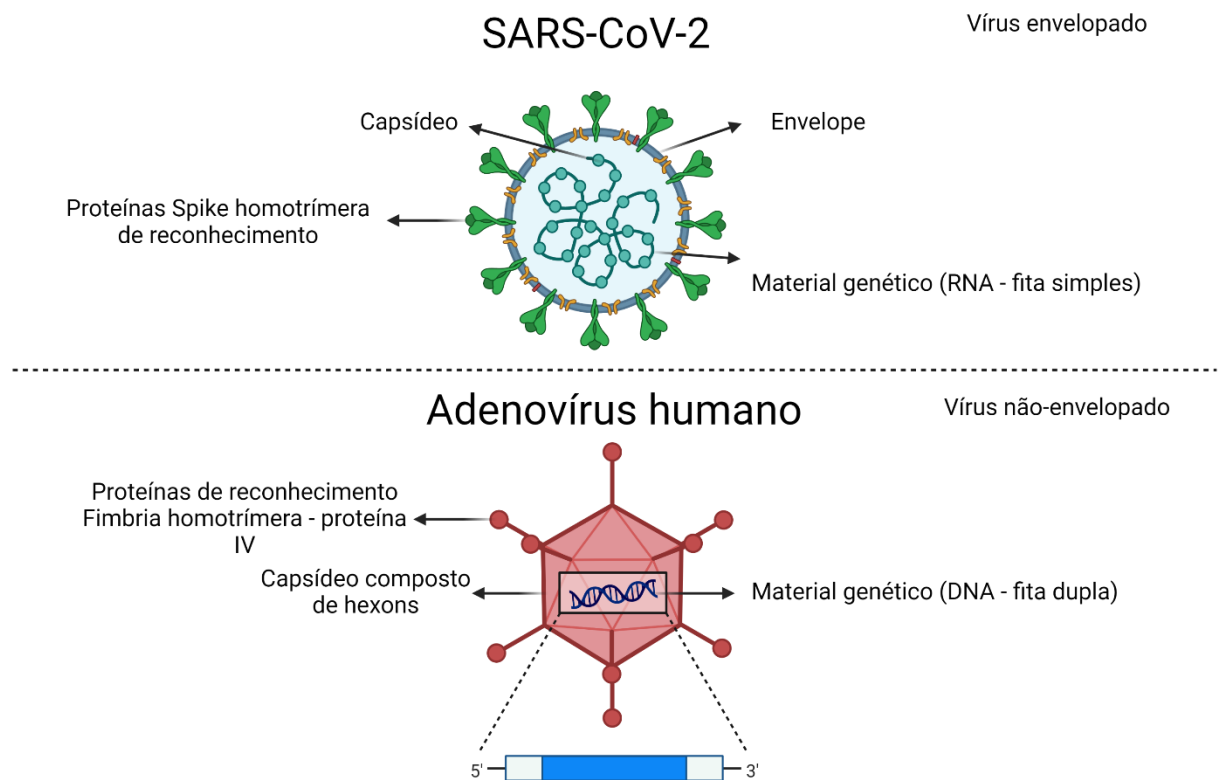


Figura 1: Estrutura básica de vírus não envelopados (HAdV) e vírus envelopados (SARS-CoV-2) e suas proteínas de reconhecimento celular (adaptado de Fields, Knipe & Howley, 2007). Fonte: Autor, 2022.

Os vírus não envelopados, como os entéricos, são modelos clássicos de patógenos relacionados à contaminação ambiental por vias hídricas e rota fecal-oral, sendo encontrados em esgoto humano e dejetos animais (BOSCH *et al.*, 2008). Vírus entéricos são definidos pela sua capacidade de se replicar em enterócitos, células responsáveis por diversas funções localizadas no epitélio do intestino de cordados, como absorção de água, digestão e absorção de polissacarídeos, peptídeos e nutrientes, além de funções relacionadas com o sistema imune, envolvendo secreção de compostos antibióticos e antivirais (PITMAN; BLUMBERG, 2000).

Sendo assim, os vírus entéricos são liberados em fezes, apresentando capacidade de contaminação ambiental por apresentar resistência frente a formas de eliminação, por possuir resistência a variações de pH e de temperatura (CARTER, 2005; FONG; LIPP, 2005). Tal excreção realizada em fezes e urina em altas concentrações podem ser introduzidas novamente ao ambiente por tratamentos ineficazes, ausência de tratamento de esgoto/dejetos ou despejo

inadequado de esgoto não tratado em corpos d'água alimentados por aquíferos, podendo contaminar outros corpos d'água, reintroduzindo estes vírus e oferecendo risco de infecções para a população ali presente (VICTORIA *et al.*, 2010; CADAMURO *et al.*, 2021).

Destacam-se entre os vírus entéricos os Adenovírus humano (HAdV) que possuem rota feco-oral e respiratória (tipo C). HAdV possui morfologia icosaédrica e dupla fita de DNA, pertencendo a família *Adenoviridae* e o gênero *Mastadenovirus*, sendo a espécie C, sorotipo 2 (dentre 41 conhecidas) responsável por infecções respiratórias e causador de gastroenterites (UHNOO *et al.*, 1984; GRAY *et al.*, 2007; UZUNER *et al.*, 2018). Apresenta 11 proteínas, denominadas polipeptídeos, enumerados como II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP, sendo que destas 11, 7 constituem o capsídeo (II, III, IV, IIIa, VIII e IX). Possui diâmetro de 70-90 nm, seu capsídeo é composto de 252 subunidades denominadas capsômeros contendo 8-10 nm de diâmetro, dos quais 240 são compostos pela proteína denominada *hexon* (pII). Os 12 capsômeros restantes são constituídos pelas proteínas *penton*-base (pIII) e fibras (pIV), formando a base para as fibras, estrutura essencial para o reconhecimento celular primário (GENUS, 2012).

Foi identificado em 1953, durante a manutenção de células primárias de tecido adenoide e tonsilas removidas cirurgicamente, onde notou-se a presença de um vírus causador de efeito citopático nas linhagens (ROWE *et al.*, 1953). Em 1954, os pesquisadores Hilleman e Werne analisaram recrutas americanos que apresentavam quadro de infecção respiratória, onde foi possível isolar um patógeno causador de efeito citopático em cultura de células humanas (HILLEMAN; WERNER, 1954). O nome do vírus foi dado em 1956, após a confirmação de replicação deste vírus em tecido adenoide, denominando-o adenovírus.

Trata-se de um clássico bioindicador de contaminação ambiental por esgotos humanos pela persistência no ambiente, resistência a processos de desinfecção de águas e também por processos de cloração, se tornando um modelo para ensaios de inativação viral (RIGOTTO *et al.*, 2011; GIRONES *et al.*, 2014; GALL; SHISLER; MARIÑAS, 2016).

Alguns vírus envelopados, apesar de sua fragilidade em ambientes relacionada com sua estrutura lipídica que forma seu envelope, podem ser excretados em fezes de pessoas contaminadas. Membros da família *Coronaviridae*, como os do gênero *Betacoronavírus*, possuem várias proteínas ancoradas em sua superfície, o que lhes proporciona possível estabilidade em esgotos e águas residuárias humanas, dificultando seu processo de inativação

no ambiente. À exemplo, o SARS-CoV-2, agente causador da pandemia de COVID-19, é um coronavírus humano, de transmissão aérea, este tem sido estudado observando sua excreção em urina e fezes humana, o que levantou a discussão sobre ocorrência de possível contaminação ambiental (NÚÑEZ-DELGADO, 2020).

SARS-CoV-2 foi identificado em corpos d'água, esgoto e solos que receberam partículas excretadas por indivíduos contaminados, demonstrando sua persistência de até 25 dias estáveis em águas, denotando a atenção para este vírus como possível contaminante do ambiente utilizando vias hídricas (AHMED *et al.*, 2020; FONGARO *et al.*, 2020; IHSANULLAH; BILAL; NAUSHAD, 2020; MEDEMA *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2020; PECCIA *et al.*, 2020; SHUTLER *et al.*, 2020).

Uma espécie dentro do gênero em questão que é utilizada como modelo para ensaios de inativação é o *Murine coronavirus* (MHV-3), isolado em 1949 (CHEEVER *et al.*, 1949). O MHV-3 assim como o SARS-CoV-2 apresenta simples fita de RNA como material genético e características morfológicas e semelhanças estruturais proteicas, assim como 59% de similaridade na proteína Spike, responsável pelo reconhecimento de receptores celulares, sendo no caso do SARS-CoV-2, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), presente em células de revestimento (epiteliais) e também em enterócitos, a semelhança baseado em aminoácidos da proteína Spike de SARS-CoV e SARS-CoV-2 é de 76%, tornando-o um modelo para ensaios de inativação viral (HARAPAN *et al.*, 2020; KÖRNER *et al.*, 2020; OU *et al.*, 2020; PELLET; MITRA; HOLLAND, 2020).

Grande parte dos vírus de interesse clínico possuem capacidade zoonótica, sendo transportados por vias hídricas, aéreas, alimentos/animais, podendo atingir por fim o ser humano (RZEZUTKA; COOK, 2004). Sinalizando a necessidade de sanitização e novos compostos aplicados em processos que possuam riscos de contaminações de vírus zoonóticos (BRENNIMAN, 2015), diversos trabalhos têm avaliado a presença de vírus no ambiente como corpos d'água, moluscos e áreas de produção animal (ANDREASI *et al.*, 2008; FONGARO *et al.*, 2012; VICTORIA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). A contaminação de tais ambientes interfere diretamente na saúde coletiva estando relacionado ao termo Saúde Única, tema discutido desde 2002 sobre interação de saúde ambiental, animal e humana (STUDIES, 2010).

Apesar da nitidez sobre a importância de vírus em ambientes e sua rota de infecções humanas e animais via ambiental, muitos estudos dedicam-se ao estudo antiviral para fins

terapêuticos e tratamento de doenças em humanos e animais, sendo raros os estudos que visam a inativação das partículas virais e o controle higiênico-sanitário de vírus em esgotos e águas residuárias (BRENNIMAN, 2015). Agentes biocidas convencionais, como hipoclorito, cloro ativo, álcool e detergentes possuem alta eficiência em desinfecção de superfície, mas baixa atividade em matrizes ricas em matéria orgânica, sendo facilmente neutralizados ou gerando subprodutos tóxicos, como os trihalometanos, ácidos haloacéticos, halopicrina, haloacetoneitrilas, halocetonas e cloro hidrato (ALVARENGA, 2010).

Alternativamente, a desinfecção pode ser alcançada utilizando radiação ultravioleta (UV), uma vez que esta é conhecida por sua eficiência na inativação de diversos microrganismos entéricos, sem formar subprodutos e provocar odor e sabor ao produto final. O tratamento com radiação UV não apresenta poder residual, tendo sua eficiência dependente da turbidez da matriz ambiental, não sendo apropriada para sistemas de tratamento de esgoto sanitário (BOSCH, GUIX, *et al.*, 2008).

Sendo assim, estudos visando avaliar bioativos com atividade virucida e antiviral tem se intensificado, buscando identificar mecanismos de ação com vírus, purificação e caracterização dos compostos com atividade evidenciada, tornando-se um nicho para prospecção de compostos (ANDREASI *et al.*, 2008; CHIN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017; MANGANYI *et al.*, 2018). Somado a isto, a valoração de excretas humanas e águas residuárias pode ser potencializada tendo em vista a aceleração da inativação de possíveis patógenos presentes, tornando relevante o processo de sanitização destes resíduos para diferentes aplicações na agricultura, processos industriais, aplicações de uso não potável como descargas de banheiros, limpeza de ruas e contra incêndios (CHEN; CHEN, 2011; DAVOUDI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2018; SUN; ASSES *et al.*, 2019; DE MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Referências utilizadas na contextualização

ABDEL-AZEEM, A. M.; ZAKI, S. M.; KHALIL, W. F.; MAKHLOUF, N. A.; FARGHALY, L. M. Anti-rheumatoid activity of secondary metabolites produced by endophytic *Chaetomium globosum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–11, 2016.

AHMED, W.; BERTSCH, P. M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; KITAJIMA, M. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 739, 15 out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>>. Acesso em: 8 out. 2020.

ALVARENGA, J. A. Avaliação da formação de subprodutos da cloração em água para consumo humano. p. 101, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/reeusp/v41n1/v41n1a17.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2020.

ANALUDDIN, K.; SHARMA, S.; JAMILI; SEPTIANA, A.; SAHIDIN, I.; RIANSE, U.; NADAOKA, K. Heavy metal bioaccumulation in mangrove ecosystem at the coral triangle ecoregion, Southeast Sulawesi, Indonesia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 125, n. 1–2, p. 472–480, 15 dez. 2017.

ANANDA, K.; SRIDHAR, K. R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 871–878, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w02-080>>. Acesso em: 14 set. 2020.

ANCHEEVA, E.; EL-NEKETI, M.; DALETOS, G.; EBRAHIM, W.; SONG, W.; LIN, W.; PROKSCH, P. Anti-infective Compounds from Marine Organisms. *In*: [s.l.] Springer, Cham, 2018. p. 97–155.

ANDREASI, M. S. A.; CARDOSO, D. D. D. P.; FERNANDES, S. M.; TOZETTI, I. A.; BORGES, A. M. T.; FIACCADORI, F. S.; SANTOS, R. A. T.; SOUZA, M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 741–744, 2008.

ASSES, N.; FARHAT, W.; HAMDI, M.; BOUALLAGUI, H. Large scale composting of poultry slaughterhouse processing waste: Microbial removal and agricultural biofertilizer application. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 124, p. 128–136, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.02.004>>. Acesso em: 9 out. 2020.

BARBIER, E. B. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 2, p. 676–681, 30 ago. 2016.

BATESON, W. Address ON HEREDITY: Delivered at the Seventeenth International Congress of Medicine. **BMJ**, v. 2, n. 2746, p. 359–362, 16 ago. 1913. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.2.2746.359>>.

BÉRDY, J. **Bioactive microbial metabolites: A personal view** *Journal of Antibiotics* Japan Antibiotics Research Association, 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ja20051>>. Acesso em: 7 jul. 2020.

BÉRDY, J. **Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading** *Journal of Antibiotics* 18 ago. 2012. Disponível em: <www.nature.com/ja>. Acesso em: 8 jul. 2022.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTÓ, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 295–301, 2008.

BRENNIMAN, G. R. Water-borne diseases. *In: Environmental Geology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2015. p. 682–685.

BRUNEL, J. Antibiosis from Pasteur to Fleming. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 6, n. 3, p. 287–301, 1951. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jhmas/article-lookup/doi/10.1093/jhmas/VI.Summer.287>>. Acesso em: 5 jul. 2022.

CADAMURO, R. D.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; FONSECA, T. G.; MASS, A. P.; KROHN, D. M. A.; PETER, N. R. W.; FONGARO, G. Enteric viruses in lentic and lotic freshwater habitats from Brazil's Midwest and South regions in the Guarani Aquifer area. **Environmental Science and Pollution Research** 2021 **28:24**, v. 28, n. 24, p. 31653–31658, 20 fev. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-13029-y>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

CARTER, M. J. Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and

significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1354–1380, 2005.

CHEEVER, F. S.; DANIELS, J. B.; PAPPENHEIMER, A. M.; BAILEY, O. T. A murine virus (jhm) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 90, n. 3, p. 195–212, 1949. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/90/3/195/1184192/195.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **Drug Addiction: From Basic Research to Therapy**, v. 8, n. 2, p. 17–39, 2008.

CRIBB, J. W. **WoRMS - World Register of Marine Species - *Lulworthia cylindrica* (Linder) Cribb & J.W. Cribb, 1955**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=438136>>. Acesso em: 22 dez. 2020.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 74, n. 3, p. 1092–2172, 2010.

DAVOUDI, M.; MOTTAGHI, H. R.; SAMIEIRAD, S.; HEIDARI, Y. Characteristics, treatments, and management for disposal of sanitary wastewater in south pars gas processing plants. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 19, p. 91–97, 1 jul. 2014.

DE MATOS NASCIMENTO, A.; DE PAULA, V. R.; DIAS, E. H. O.; DA COSTA CARNEIRO, J.; OTENIO, M. H. Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. **Science of the Total Environment**, v. 745, 25 nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140711>>. Acesso em: 9 out. 2020.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Mangrove derived fungal endophytes - A chemical and biological perception. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 1–27, 2013.

DONATO, D. C.; KAUFFMAN, J. B.; MURDIYARSO, D.; KURNIANTO, S.; STIDHAM, M.; KANNINEN, M. Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. **Nature Geoscience**, v. 4, n. 5, p. 293–297, maio 2011.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

FONG, T.-T.; LIPP, E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357–371, 1 jun. 2005.

FONGARO, G.; NASCIMENTO, M. A.; VIANCELLI, A.; TONETTA, D.; PETRUCIO, M. M.; BARARDI, C. R. M. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. **Water Science and Technology**, 2012.

FONGARO, G.; STOCO, P. H.; SOUZA, D. S. M.; GRISARD, E. C.; MAGRI, M. E.; ROGOVSKI, P.; SCHÖRNER, M. A.; BARAZZETTI, F. H.; CHRISTOFF, A. P.; OLIVEIRA, L. F. V. de; BAZZO, M. L.; WAGNER, G.; HERNÁNDEZ, M.; RODRIGUEZ-LÁZARO, D. SARS-CoV-2 in human sewage in Santa Catalina, Brazil, November 2019. **medRxiv**, p. 2020.06.26.20140731, 29 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.26.20140731v1>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

FRANCISCO, P. M.; TAMBARUSSI, E. V.; DE ALVES, F. M.; BAJAY, S.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; SOUZA, A. P. Genetic diversity and mating system of rhizophora mangle l. (rhizophoraceae) in Northern Brazil revealed by microsatellite analysis. **Cerne**, v. 24, n. 4, p. 295–302, 1 out. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-77602018000400295&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 14 set. 2020.

GALL, A. M.; SHISLER, J. L.; MARIÑAS, B. J. Inactivation Kinetics and Replication Cycle Inhibition of Adenovirus by Monochloramine. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 3, n. 4, p. 185–189, 12 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.estlett.6b00079>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

GELPI, A.; GILBERTSON, A.; TUCKER, J. D. **Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology** *Sexually Transmitted Infections* 21 fev. 2015. Disponível em: <<http://searchiv.web.unc.edu/>>. Acesso em: 5 jul. 2022.

GENUS, F. G. Coronaviridae. In: **Virus Taxonomy**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 806–828.

GIRONES, R.; CARRATALÀ, A.; CALGUA, B.; CALVO, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; EMERSON, S. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. **Journal of Water and Health**, v. 12, n. 3, p. 436–442, 1 set. 2014. Disponível em: <<http://iwaponline.com/jwh/article-pdf/12/3/436/395696/436.pdf>>. Acesso

em: 9 jul. 2022.

GRAY, G. C.; MCCARTHY, T.; LEBECK, M. G.; SCHNURR, D. P.; RUSSELL, K. L.; KAJON, A. E.; LANDRY, M. L.; LELAND, D. S.; STORCH, G. A.; GINOCCHIO, C. C.; ROBINSON, C. C.; DEMMLER, G. J.; SAUBOLLE, M. A.; KEHL, S. C.; SELVARANGAN, R.; MILLER, M. B.; CHAPPELL, J. D.; ZERR, D. M.; KISKA, D. L.; HALSTEAD, D. C.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; CHORAZY, M. L.; DAWSON, J. D.; ERDMAN, D. D. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 9, p. 1120–1131, 1 nov. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/522188>>. Acesso em: 4 out. 2020.

HAAS, L. F. Papyrus of Ebers and Smith. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 578–578, 1 nov. 1999. Disponível em: <<http://jnnp.bmj.com/>>. Acesso em: 5 jul. 2022.

HARAPAN, H.; ITOH, N.; YUFIKA, A.; WINARDI, W.; KEAM, S.; TE, H.; MEGAWATI, D.; HAYATI, Z.; WAGNER, A. L.; MUDATSIR, M. **Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review** **Journal of Infection and Public Health** Elsevier Ltd, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>>. Acesso em: 5 out. 2020.

HARRISON, F.; ROBERTS, A. E. L.; GABRILSKA, R.; RUMBAUGH, K. P.; LEE, C.; DIGGLE, S. P. A 1,000-Year-Old Antimicrobial Remedy with Antistaphylococcal Activity. **mBio**, v. 6, n. 4, p. e01129, 11 set. 2015. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01129-15>>.

HELALY, S. E.; THONGBAI, B.; STADLER, M. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 9, p. 992–1014, 19 set. 2018. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/np/c8np00010g>>. Acesso em: 2 out. 2022.

HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, n. 1, p. 183–188, 1 jan. 1954. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-85-20825>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

IHSANULLAH, I.; BILAL, M.; NAUSHAD, M. Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in

water environments: Current status, challenges and research opportunities. **Journal of Water Process Engineering**, v. 39, p. 2214–7144, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101735>>. Acesso em: 8 fev. 2021.

KÖRNER, R. W.; MAJJOUTI, M.; ALEJANDRE ALCAZAR, M. A.; MAHABIR, E. **Of mice and men: The coronavirus mhc and mouse models as a translational approach to understand sars-cov-2** *Viruses* 12 ago. 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/viruses>. Acesso em: 9 jul. 2022.

MANGANYI, M. C.; REGNIER, T.; KUMAR, A.; BEZUIDENHOUT, C. C.; ATEBA, C. N. Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 192–199, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.016>>.

MEDEMA, G.; HEIJNEN, L.; ELSINGA, G.; ITALIAANDER, R.; BROUWER, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 7, n. 7, p. 511–516, 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/67854?locale=en&mode=full>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019** *Journal of Natural Products* 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>>. Acesso em: 7 fev. 2021.

NOUH, F. A. Endophytic fungi for sustainable agriculture. **Microbial Biosystems**, v. 4, n. 1, p. 31–44, 2019.

NÚÑEZ-DELGADO, A. What do we know about the SARS-CoV-2 coronavirus in the environment? **Science of The Total Environment**, v. 727, p. 138647, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138647>>.

OU, X.; LIU, Y.; LEI, X.; LI, P.; MI, D.; REN, L.; GUO, L.; GUO, R.; CHEN, T.; HU, J.; XIANG, Z.; MU, Z.; CHEN, X.; CHEN, J.; HU, K.; JIN, Q.; WANG, J.; QIAN, Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, 27 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

PATEL, M.; CHAUBEY, A. K.; PITTMAN, C. U.; MLSNA, T.; MOHAN, D.

Coronavirus (SARS-CoV-2) in the Environment: Occurrence, Persistence, Analysis in Aquatic Systems and Possible Management. **Science of The Total Environment**, n. xxxx, p. 142698, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142698>>.

PECCIA, J.; ZULLI, A.; BRACKNEY, D.; GRUBAUGH, N.; KAPLAN, E.; CASANOVAS-MASSANA, A.; KO, A.; MALIK, A.; WANG, D.; WANG, M.; WARREN, J.; WEINBERGER, D.; OMER, S. SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

PELLET, P. E.; MITRA, S.; HOLLAND, T. C. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 123, n. January, p. 45–66, 2020.

PITMAN, R. S.; BLUMBERG, R. S. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. **Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 11, p. 805–814, 6 nov. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11085489/>>. Acesso em: 1 out. 2022.

RAFFERTY, J. P. **Lakes and Wetlands South America**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=StCGBdKR4qgC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 14 set. 2020.

RAJAMANI, T.; SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N. Distribution and diversity of foliar endophytic fungi in the mangroves of Andaman Islands, India. **Fungal Ecology**, v. 36, p. 109–116, 1 dez. 2018.

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; BARARDI, C. R. M.; YATES, M. V. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 9, p. 4145–4150, 2011.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; PARROTT, R. H.; WARD, T.

G. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. **Experimental Biology and Medicine**, v. 84, n. 3, p. 570–573, 1 dez. 1953. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-84-20714>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

RZEZUTKA, A.; COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 441–453, 2004.

SANTOS, I. F. S. dos; GONÇALVES, A. T. T.; BORGES, P. B.; BARROS, R. M.; DA SILVA LIMA, R. Combined use of biogas from sanitary landfill and wastewater treatment plants for distributed energy generation in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 136, p. 376–388, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.05.011>>. Acesso em: 9 out. 2020.

SHANG, Z.; LI, X. M.; LI, C. S.; WANG, B. G. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *nigrospora* sp. MA75 on various culture media. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1338–1348, jul. 2012.

SHANKAR NAIK, B. Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 19, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13596-018-0352-8>>. Acesso em: 8 jul. 2022.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006841–a006841, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.unaids.org/>>. Acesso em: 6 jul. 2022.

SHUTLER, J.; ZARASKA, K.; HOLDING, T. M.; MACHNIK, M.; UPPULURI, K.; ASHTON, I.; MIGDAL, L.; DAHIYA, R. Risk of SARS-CoV-2 infection from contaminated water systems. **medRxiv**, p. 2020.06.17.20133504, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.06.17.20133504>>. Acesso em: 8 out. 2020.

SILVA, E. J.; FONTGALLAND, I. L. Ações e políticas públicas nos manguezais para a preservação dos serviços ambientais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e585101523345, 29 nov. 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23345>>.

SOUZA, D. S. M.; RAMOS, A. P. D.; NUNES, F. F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; GUIGUET LEAL, D. A.; SASAKI, S. T.; BÍCEGO, M. C.; MONTONE, R. C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A. L.; PILOTTO, M. R.; DELFINO, N.; FRANCO, R. M. B.; DE MELO, C.

M. R.; BAINY, A. C. D.; BARARDI, C. R. M. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 153–161, 2012.

SPALDING, M. D.; LEAL, M. The state of the worlds' Mangroves 2021. **Global Mangrove Alliance**, p. 1–79, 2021. Disponível em: <https://ejournal.unisba.ac.id/index.php/kajian_akuntansi/article/view/2615%0Ahttp://scholar.unand.ac.id/60566/>.

STUDIES, C. **One Health for One World: A compendium of Case Studies**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.onehealthinitiative.com/publications/OHOW_Compndium_Case_Studies.pdf>.

SUN, F.; CHEN, M.; CHEN, J. Integrated Management of Source Water Quantity and Quality for Human Health in a Changing World. *In: Encyclopedia of Environmental Health*. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 254–265.

SUN, J. F.; LIN, X.; ZHOU, X. F.; WAN, J.; ZHANG, T.; YANG, B.; YANG, X. W.; TU, Z.; LIU, Y. Pestalols A-E, new alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 6, p. 451–457, 2 abr. 2014. Disponível em: <www.nature.com/ja>. Acesso em: 14 set. 2020.

UDDIN, M. S.; DE RUYTER VAN STEVENINCK, E.; STUIP, M.; SHAH, M. A. R. Economic valuation of provisioning and cultural services of a protected mangrove ecosystem: A case study on Sundarbans Reserve Forest, Bangladesh. **Ecosystem Services**, v. 5, p. 88–93, 1 set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212041613000491>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

UHNOO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; JOHANSSON, M. E. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 365–372, 1984.

UZUNER, H.; KARADENIZLI, A.; ER, D. K.; OSMANI, A. Investigation of the efficacy of alcohol-based solutions on adenovirus serotypes 8, 19 and 37, common causes of epidemic keratoconjunctivitis, after an adenovirus outbreak in hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. e30–e36, 2018.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.;

KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; BARARDI, C. R. M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 231–238, 2010.

WAKSMAN, S. A.; SCHATZ, A.; REYNOLDS, D. M. Production of antibiotic substances by actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 112–124, dez. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2010.05861.x>>. Acesso em: 5 jul. 2022.

WAKSMAN, S. A.; STARKEY, R. L. The Soil and the Microbe. **Agronomy Journal**, v. 23, n. 8, p. 674–675, 1 ago. 1931. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/agronj1931.00021962002300080009x>>. Acesso em: 2 ago. 2022.

WANG, J. F.; LIANG, R.; LIAO, S. R.; YANG, B.; TU, Z. C.; LIN, X. P.; WANG, B. G.; LIU, Y. Vaccinols J–S, ten new salicyloid derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. **Fitoterapia**, v. 120, p. 164–170, 1 jul. 2017.

XU, K.; LI, X. Q.; ZHAO, D. L.; ZHANG, P. Antifungal Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes: Chemical Diversity and Potential Use in the Development of Biopesticides. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1428, 21 jun. 2021.

ZHANG, J.; YU, J.; HONG, H.; LIU, J.; LU, H.; YAN, C. Identification of heavy metal pollutant tolerance-associated genes in *Avicennia marina* (Forsk.) by suppression subtractive hybridization. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 81–91, 15 jun. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X17302291>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

ZHOU, J.; DIAO, X.; WANG, T.; CHEN, G.; LIN, Q.; YANG, X.; XU, J. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0197359, 13 jun. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0197359>>. Acesso em: 14 set. 2020.

APRESENTAÇÃO E ABORDAGEM DA PRESENTE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Esta dissertação buscou explorar o nicho de biocompostos produzidos pelo fungo endofítico *Neofusicoccum parvum*, isolado do mangue da região do Itacorubi, de Florianópolis – Santa Catarina. Foi identificada sua morfologia macroscópica, microscópica, caracterizando quimicamente seus metabólitos secundários pós fermentação em estado sólido, assim como as enzimas hidrolases e oxirredutases presentes em seu secretoma. Também foram realizadas atividades biológicas em ensaios de inativação viral (virucida), antiviral e bacteriostático.

A **Figura 2** apresenta o delineamento experimental da execução da dissertação, organizada em três capítulos.

Figura 2: Resumo gráfico dos capítulos do presente estudo e respectivas atividades executadas.

Capítulo I:	Capítulo II:	Capítulo III:
Prospecção de potenciais biocompostos isolados de fungos endofíticos de manguezal com atividade biológica e caracterização química	Isolamento e caracterização do fungo endofítico <i>Neofusicoccum parvum</i> . Caracterização química de metabólitos secundários e de secretoma de enzimas hidrolíticas e oxirredutases	Extratos totais aplicados em ensaios biológicos: ensaio de citotoxicidade, virucida, antiviral e bacteriostático

O *Capítulo I* intitulado: “*Prospecção de potenciais biocompostos isolados de fungos endofíticos de manguezal com atividade biológica e caracterização química*” refere-se a revisão bibliográfica e publicada sobre compostos com atividade biológica oriundos de fungos endofíticos de manguezal.

O *Capítulo II* intitulado: “*Isolamento e caracterização do fungo endofítico *Neofusicoccum parvum*. Caracterização química de metabólitos secundários e de enzimas hidrolíticas e oxirredutases*” refere-se ao isolamento do fungo endofítico, caracterização, cultivo em estado sólido (arroz) para então ocorrer a caracterização química de metabólitos secundários produzidos pelo fungo assim como a caracterização de enzimas hidrolíticas e oxirredutases em seu secretoma.

O *Capítulo III* intitulado: “*Extratos totais aplicados em ensaios biológicos: ensaio de citotoxicidade, virucida, antiviral e bacteriostático*” refere-se aos ensaios biológicos para avaliar sua possível atividade em células saudáveis (VERO e L929) e tumoral (A549), linhagens virais respectivas (HAdV-2 e MHV-3) e decrescimento bacteriano em contato com extratos totais.

2. OBJETIVO GERAL

Prospectar potenciais biocompostos e enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Neofusicoccum parvum* isolado do manguezal de Florianópolis – Santa Catarina para fins de atividade biológica.

3. HIPÓTESES

Hipótese: O fungo *Neofusicoccum parvum* isolado de Florianópolis- Santa Catarina possui potencial para bioprospecção de biocompostos e enzimas com atividade biológica frente a células animais, bactérias e vírus.

- Capítulo I –

Prospecção de potenciais biocompostos isolados de fungos endofíticos de manguezal com atividade biológica e caracterização química

Artigo publicado

Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. *J Fungi* (Basel). 2021 Jun 7;7(6):455. doi: 10.3390/jof7060455. PMID: 34200444; PMCID: PMC8228968.

Cadamuro RD, da Silveira Bastos IMA, Silva IT, da Cruz ACC, Robl D, Sandjo LP, Alves S Jr, Lorenzo JM, Rodríguez-Lázaro D, Treichel H, Steindel M, Fongaro G.



Review

Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control

Rafael Dorighello Cadamuro¹, Isabela Maria Agustini da Silveira Bastos¹, Izabella Thais Silva^{1,2}, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz^{1,3}, Diogo Robl¹, Louis Pergaud Sandjo⁴, Sergio Alves, Jr.⁵, Jose M. Lorenzo^{6,7,*}, David Rodríguez-Lázaro⁸, Helen Treichel⁹, Mário Steindel¹ and Gislaine Fongaro^{1,*}

¹ Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; rafaelcada@hotmail.com (R.D.C.); isabelamaria646@gmail.com (I.M.A.d.S.B.); izabella.thais@ufsc.br (I.T.S.); ariadne.cruz@ufsc.br (A.C.C.d.C.); diogo.robl@ufsc.br (D.R.); msteindel@gmail.com (M.S.)

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

³ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

⁴ Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; p.lsandjo@ufsc.br

⁵ Laboratory of Biochemistry and Genetics, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89802-112, SC, Brazil; slalvesjr@gmail.com

⁶ Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Avd. Galicia nº 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Vithas, 32900 Ourense, Spain

⁷ Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain

⁸ Microbiology Division, Faculty of Sciences, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain; drlazaro@ubu.es

⁹ Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 99700-000, RS, Brazil; helentreichel@gmail.com

* Correspondence: jmlorenzo@ceteca.net (J.M.L.); gislainefongaro@gmail.com (G.F.); Tel.: +34-9885-48277 (J.M.L.); +55-49-9825-6993 (G.F.)



Citation: Cadamuro, R.D.; da Silveira Bastos, I.M.A.; Silva, I.T.; da Cruz, A.C.C.; Robl, D.; Sandjo, L.P.; Alves, S., Jr.; Lorenzo, J.M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Treichel, H.; et al. Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. *J Fungi* 2021, 7, 455. <https://doi.org/10.3390/jof7060455>

Academic Editor: Arianna Tavanti

Received: 14 May 2021

Accepted: 3 June 2021

Published: 7 June 2021

Abstract: Mangroves are ecosystems with unique characteristics due to the high salinity and amount of organic matter that house a rich biodiversity. Fungi have aroused much interest as they are an important natural source for the discovery of new bioactive compounds, with potential biotechnological and pharmacological interest. This review aims to highlight endophytic fungi isolated from mangrove plant species and the isolated bioactive compounds and their bioactivity against protozoa, bacteria and pathogenic viruses. Knowledge about this type of ecosystem is of great relevance for its preservation and as a source of new molecules for the control of pathogens that may be of importance for human, animal and environmental health.

a) Objetivo específico

Identificar na literatura científica relatos de bioprospecção de fungos endofíticos como produtores de biocompostos com atividades biológicas, assim como o histórico da utilização de

fungos endofíticos para obtenção de compostos. Avaliando especialmente a atividade biológica avaliada contra protozoários, bactérias e vírus.

b) Metodologia

Para composição do artigo, buscas nas plataformas *ScienceDirect*, *PubMed* e *Google Scholar* foram utilizadas para identificar artigos que pudessem prover informações acerca de relatos de compostos bioativos oriundos de fungos endofíticos do mangue entre 2000-2020 analisando e citando 153 estudos.

c) Resultados

c.1) Aplicações biotecnológicas

A composição do artigo ressaltou as diversas aplicações biológicas obtidas a partir de biocompostos obtidos a partir de fungos endofíticos. A busca por biomcompostos obtidos de produtos naturais apresenta vantagens como: representam novidades químicas, guiando para potenciais compostos candidatos para alvos complexos (STROHL, 2000 LI; VEDERAS, 2009). Constituintes moleculares naturais tendem a apresentar extraordinária diversidade química quando comparada com produtos sintéticos, por se considerar diferenças complexas em suas estruturas bidimensionais e tridimensionais, alta variação de alvos farmacológicos, nível de seletividade/permisividade, resistência/citotoxicidade e capacidade de ser absorvido e metabolizado pelo corpo (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

A busca por compostos bioativos decorre principalmente de três pontos essenciais: (a) descoberta de moléculas que possam controlar doenças/patógenos que nenhum composto sintético tenha sido capaz de inibir; (b) biocompostos que venham provocar cada vez menos efeitos sintéticos e melhor sucesso inibitório em organismos multirresistentes; (c) biocompostos que possam substituir fármacos sintéticos a fim de evitar impacto gerado pela possível contaminação de solos e corpos d'água pela presença/excreção destes (GUPTA *et al.*, 2020).

No Brasil estudo de isolamento de fungos endofíticos de manguezais foram realizados em Pernambuco, São Paulo e Bahia, tendo respectivamente gêneros *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Phomopsis* e *Phyllosticta*; *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria*; *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (RUBINI *et al.*, 2005 COSTA; MAIA; CAVALCANTI, 2012; DE SOUZA SEBASTIANES *et al.*, 2013).

Considerando a vasta extensão de região costal do Brasil e uma distância maior que 1.900 km pode-se avaliar que existem poucos estudos relacionando fungos endofíticos do mangue no Brasil.

O potencial apresentado por metabólitos secundários de fungos endofíticos foi avaliado em ensaios biológicos contra bactérias, protozoários e inativação de vírus (antiviral).

c.1.1) Protozoários

Malária é um exemplo clássico de doença de países tropicais causada pelo *Plasmodium* spp., causador de mais de 200 milhões de casos de doença e 435 mortes pelo mundo todo ano (HAYIBOR *et al.*, 2019). A seleção de variantes da malária resistentes a drogas clássicas sintéticas requer mais estudos de bioprospecção de novos compostos com eficiência (SAAD; GHAREEB; SAEED, 2019).

O composto oxilipina, ácido (9Z, 11E)-13-oxooctadeca-9,11-dienóico, produzido pelo fungo *Penicillium herquei* isolado da planta de mangue *Laguncularia racemosa*, demonstrou atividade antiparasitária mínima contra *Plasmodium falciparum* (apresentando concentração inibitória máxima $IC_{50} > 100 \mu M$), *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} > 100 \mu M$), *Leishmania donovani* ($IC_{50} > 100 \mu M$) e *Leishmania major* ($IC_{50} > 100 \mu M$) (CAMPOS *et al.*, 2015).

Outros potenciais biocompostos foram identificados com alvo no *Trypanosoma brucei* tem sido investigado, como Dihidroisocoumarins (trans e cis 4,8-dihidroxi-3-methylisochroman-1, 5-hidroximelleina e -melleina ou 8-hidroxi-3-methylisochromana-1) e naftoquinonas (anhidrofusarubina, javanicina, dihidrojavanicina e solaniol) produzidos pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium* sp. respectivamente isolados da região do mangue da Malaysian, da planta *Avicennia lanata*. Esses compostos apresentaram atividade contra *Trypanosoma brucei brucei* com IC_{50} entre 0,32-12,5 μM (MAZLAN *et al.*, 2019).

O efeito citotóxico de biocompostos deve ser avaliado para que não ocorram danos ao hospedeiro com o parasita protozoário (FERREIRA *et al.*, 2015). Dentre 34 isolados de fungos com atividade contra ameba *Naegleria fowleri* dois apresentaram alta citotoxicidade contra linhagens celulares de macrófagos J774 ($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$). Outros 562 extratos foram identificados contra *Leishmania donovani*, onde a citotoxicidade foi maior ainda ($10 \mu\text{g/mL}$).

Crítérios de citotoxicidade auxiliaram a delimitar um intervalo de IC_{50} entre 1-5 $\mu\text{g/mL}$ no máximo, restando 116 potenciais compostos. Tais ensaios de citotoxicidade por outro lado podem beneficiar estudos correlatos com possíveis tratamentos cancerígenos e tratamentos de tumores (ROSA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2020).

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* é responsável por 6-7 milhões de infecções, muitas destas subdiagnosticadas. Neste sentido a bios prospecção por compostos com atividade contra *T. cruzi* se mostra indubitável, até por ser uma doença tropical negligenciada, onde as companhias farmacêuticas não se interessam financeiramente por estarem atreladas a regiões/países pobres (MANSOLDO *et al.*, 2020).

Extratos fúngicos de *Diaporthe cf. mayteni* e *Endomelanconiopsis endophytica* apresentaram alta atividade inibitória em formas amastigotas do *T. cruzi*, apresentando inibição de 100% e 86,3% respectivamente, comparado com o controle Benznidazole ($IC_{50} 1 \mu\text{l/mL}$) (FERREIRA, *et al.*, 2015). O mesmo grupo em outro estudo isolou e caracterizou dois compostos bioativos, sendo estes ophiobolin K e 6-epi-ophiobolin K ($IC_{50} 13$ e $9,62 \mu\text{M/mL}$) do fungo *Aspergillus calidoustus* em comparação com a droga de controle benznidazole ($3.84 \mu\text{M}$) (CARVALHO, *et al.*, 2015).

Entretanto esta revisão demonstrou a necessidade de biosprospecção de compostos oriundos de fungos endofíticos para protozoários como *T. cruzi* considerando o número de artigos.

c.1.2) Bactérias

A relação durante o processo evolutivo dos seres humanos e animais se construiu ao longo de milhares de anos. Sendo essas relações de ferramentas de cultivo/trabalho, proteção e defesa e fonte de alimento. Tal proximidade facilitou o surgimento de patógenos e sua transmissão. Patógenos que conseguiram transpor animais-humanos e persistem no ambiente possuem vias de contaminação e infecção facilitada. Humanos e matrizes animais de forma

recíproca transferem patógenos emergentes e/ou reemergentes, utilizando vias diretas ou indiretas de contato como alimento/ração, água e compartilhamento de habitats, denominando-se doenças zoonóticas (BENGIS *et al.*, 2004; MAYER *et al.*, 2014).

A origem da palavra vem da palavra grega “Zoo”, que significa animal e “nosos” doença. Estima-se que 61% dos patógenos humanos sejam zoonóticos na natureza, dentre os últimos 30 patógenos detectados em nossa sociedade, em torno de 75% possuíam origem animal (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001; JONES *et al.*, 2008). Bactérias zoonóticas são a principal causa de morte e morbidade entre humanos, sendo reconhecida como ameaça internacional a saúde pública (HUANG *et al.*, 2014).

Em 2014 a Fair e colaborador publicaram um artigo salientando a resistência bacteriana na era pós-antibiótico. O uso incorreto de antibióticos em humanos e animais de produção animal facilitou o espalhamento de bactérias multirresistentes. Mesmo com novas descobertas de compostos potenciais antibióticos a seleção de resistência bacteriana seguiu com os já estabelecidos, sendo assim disseminada (FAIR; TOR, 2014).

A família taxonômica Enterobacteriaceae (Filo Proteobacteria) representa um grande grupo de seres, incluindo 33 gêneros e 134 espécies, que habitam o intestino de humanos e animais, alguns com capacidade de produzir endotoxinas. Representantes conhecidos são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (HENRIKSEN *et al.*, 2019; SINGH; ANAND, 2022). A bactéria *E. coli* por sua vez é conhecida pelo papel comensal interagindo com a microbiota de diversos mamíferos assim como nós, mas algumas cepas, por sua vez tem a capacidade patogênica, podendo ser cepas enteroagregativas, enteropatogênicas, enteroinvasivas, enterotoxigênicas e produtoras de toxina Shiga (CHATTOPADHYAY; SOKURENKO, 2013; SCHEUTZ; STROCKBINE, 2015).

Além de relatos de genes de resistência entre bactérias destes grupos outro desafio para a manutenção da saúde de animais ocorre devido a sua resistência a pH e variações de temperatura que facilita sua persistência no ambiente e dificulta seu controle (NEWELL *et al.*, 2010; SÄDE; MURROS; BJÖRKROTH, 2013; LI *et al.*, 2020).

A toxina aflatoxina B2b produzida pelo *Aspergillus flavus* associada com sua hospedeira no mangue da China *Hibiscus tiliaceus* apresentou resultados inibitórios contra bactérias *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter aerogenes*, com valores de IC₅₀ 22,5, 1,7 e 1,1 µM respectivamente (WANG *et al.*, 2012). Sendo que, 7 compostos categorizados como

sesquiterpenoides isolados de *Aspergillus* spp. endofíticos da planta *Xylocarpus moluccensis* apresentaram atividade moderada contra *Staphylococcus aureus*, com valores de IC₅₀ entre 31,5 a 41,9 µM (WANG *et al.*, 2018).

Outro potencial composto foi isolado de *Pestalotiopsis* sp., presentes em folhas de *Rhizophora mucronata* presentes no mangue de Dong Zhai Gang, Ilha de Hainan, China. Tal composto foi definido como híbrido sesquiterpeno-ciclo-paldico metabólito ácido com um esqueleto de carbono incomum, chamado pestalotiopisorina A. Sua atividade bactericida foi avaliada contra *Enterococcus faecalis* com valores mínimos de concentração inibitória (MIC) entre 125 e 250 µg/mL (HEMBERGER *et al.*, 2013).

Os compostos triterpenóides tetracíclicos 12-acetoxi-4,4-dimetil-24-metileno-5-colesta-8-momoeno-3, 11-diol, 12-acetoxi-4,4-dimetil-24-metileno-5-colesta-8,14-dieno-2,3,11-triol e meroterpenoids Guignardone B, Guignardone I, Guignardone A e Guignardone J isolados dos fungos *Guignardia* sp e *Phyllosticta capitalensis*. Estes foram avaliados contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (AI *et al.*, 2014; XU; XIONG; XU, 2019).

Uma nova molécula denominada pestalotiopisorin B, isolado do fungo *Pestalotiopsis* sp., foi efetiva contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* multiresistente, *Bacillus subtilis* e *E. coli*. Isolado da planta *Rhizophora stylosa*, encontrada no mangue da região da China. Atividade avaliada foi considerada moderada contra *P. aeruginosa* (12,5 µg/mL) e *E. coli* (50 µg/mL) (XU *et al.*, 2020). Diversos compostos foram isolados do fungo *Ascomycota* sp. endofítico de *Pluchea indica*, coletada na região do mangue de Shankou, reserva natural da província de Guangxi, China. Compostos obtidos apresentaram atividade bactericida contra *S. aureus* e *B. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter calcoaceticus*. Sendo identificados como: dicloroisocumarinas e dichlorodiaportinol. Atividade inibitória destes em ensaios de halo de inibição contra *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *A. calcoaceticus*, com valores de MIC entre 25-50 µg/mL (CHEN *et al.*, 2018).

Kandeia candel é uma planta da região da província de Guangdong, China, sendo esta a hospedeira de *Guignardia* sp. produtora de Guignardins B, Palmarumycine C₁ e Palmarumycin BG1. Guignardins B apresentou atividade contra bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 na concentração MIC 50 µg/mL, enquanto que Palmarumycin BG1 apresentou

inibição de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, patógeno presente na aquicultura, apresentando um MIC de 50 µg/mL (AI *et al.*, 2014).

Heritiera fomes é uma planta encontrada no mangue da região Sundarbans, Índia, de onde isolou-se o endófito *Pestalotia* spp. produtor do composto oxysporona, um composto contendo um 4H-furo(2,3-b)piran-2(3H)-ona, e xilitol, uma molécula com grupo álcool com glicídio de cinco-carbonos. Ambos demonstraram eficiência na inibição de *S. aureus* multiresistente cepas ATCC 25923, RN4220, EMRSA-15, EMRSA-16, SA-1199B e XU2, com valores de IC₅₀ entre 32 e 128 µg/mL (NURUNNABI *et al.*, 2018).

c.1.3) Vírus

Os vírus são entidades intracelulares, que necessitam de uma célula hospedeira para realizar seu processo de replicação sequestrando maquinária celular (TAYLOR, 2014). Vírus envelopados tendem a fundir sua membrana com a membrana da hospedeira para liberar seu genoma dentro do citoplasma utilizando endossomos. Tal fusão ocorre com sucesso com peptídeos que funcionam em pH baixos para facilitar endossomos citoplasmáticos, em contrapartida células respondem inibindo a diminuição do pH, inibindo a capacidade de fusão membranar do vírus.

Vírus não envelopados (e.g. enterovirus; adenovirus, rotavirus) se acumulam em endossomos com alta acidez (como lisossomos). A ligação viral depende dos receptores expostos em células e receptores específicos virais. Enterovirus usualmente identificam a $\alpha 2\beta 1$ integrina, receptor de colágeno celular expressa em diversos tipos celulares, enquanto que adenovirus e coxsackievirus usam um receptor que pertence a superfamília de imunoglobulina, chamado de coxsackievirus e adenovirus receptor (CAR), uma glicoproteína transmembranar, descoberta em 1997 (BERGELSON *et al.*, 1997; MARJOMÄKI; TURKKI; HUTTUNEN, 2015; LINNAKOSKI *et al.*, 2018).

Vírus que possuem material genético de RNA geralmente iniciam a translação da fita negativa de RNA para positiva e posterior tradução no citoplasma, evidenciando potenciais focos farmacológicos de inibição da replicação. Vírus que contem DNA necessitam penetrar pelo poro nuclear para que ocorra início ao processo de replicação, onde diversas enzimas e proteínas virais são recrutadas e sintetizadas, sendo possíveis pontos de inibição. O processo de

finalização do capsídeo se faz já no citoplasma celular, antes da liberação de partículas virais. O processo de replicação altera as funções de endossomos, como retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi (CHANG; BLOCK; GUO, 2013; MA *et al.*, 2018; DINESH *et al.*, 2019).

Vírus precisam operar estrategicamente a capacidade de apoptose (morte celular programada) para sucesso de sua replicação. Em estágios iniciais de replicação viral é necessário inibir processos apoptóticos celulares visando a sobrevivência da replicação e adiando tal estágio para colaborar na dispersão dos vírus com a morte celular. Sendo assim, biocompostos são utilizados para regular processos de apoptose celular, que incluem por exemplo reconhecimento da invasão viral por padrão de receptores de reconhecimento (PRRs) e a sinalização para as proteínas Bcl-2, proteínas essenciais ao processo de apoptose celular pela regulação sinais intracelulares pró-apoptóticas e antiapoptóticas. O processo inclui inicialmente o reconhecimento da invasão viral por receptores de reconhecimento e a sinalização para as proteínas Bcl-2, proteínas que membros da família de genes do linfoma de células B 2 (BCL-2) (EBERT *et al.*, 2015; ASHKENAZI *et al.*, 2017; SHIM *et al.*, 2017; IMRE, 2020).

A replicação do vírus da hepatite C depende do recrutamento de uma protease chamada NS3, que é uma serina com atividade no funcionamento da enzima helicase, na região carboxi-terminal, sendo este um exemplo de alvo farmacológico para inibição da hepatite C (AU; POCKROS, 2013).

Paclitaxel é um composto que foi inicialmente isolado em 1960, sintetizado pela planta *Taxus brevifolia* e teve seu uso aplicado para fármacos anticâncer (WHEELER *et al.*, 1992). Entretanto, a busca por outro organismo produtores deste composto se fez necessária pelo crescimento lento, baixa síntese do composto por gramas da planta e distribuição relativamente limitada por diversas regiões (CHANDRA, 2012). Fungos endofíticos foram identificados como produtores deste metabólito, sendo o *Alternaria* spp., entre outras 6 espécies de *Fusarium* spp. (ROOPA *et al.*, 2015).

Em 2012 Elavarasi e colaboradores identificaram um fungo endofítico produtor de Paclitaxel, *Fusarium oxysporum*, isolado das folhas da planta do mangue *Rhizophora annamalayana* na região estuária da Índia (ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012). Apesar de seu foco ter sido utilizado para fins antitumorais, este apresentou ação

inibitória da replicação do vírus HIV (*Human Immune Deficiency*) antes da entrada da partícula viral e após, na concentração de 20 µg/mL, gerando a inibição de 66% de partículas virais. A inibição afetou uma proteína denominada HIV-1 integrase, enzima esta necessária para a replicação e inserção do material genético do vírus no genoma de DNA celular (RYANG *et al.*, 2019).

O fungo *Neosartorya udagawae* HDN13-313, produtor dos metabólitos Neosartoryadins A e B foi isolado de raízes da planta do mangue *Aricennia marina*. Estes compostos caracterizados como alcáloides de fumiquinazolina apresentaram valores de inibição respectivamente em IC₅₀ 66 e 58 µM contra o vírus da influenza, H1N1, resultados melhores que comparados com controle positivo utilizado, sendo a ribavirina sintética (IC₅₀ 94 µM) (YU *et al.*, 2015).

Outro composto investigado contra H1N1 foi isodolinas de emerimidina A e B e pestalotiopsona F, pestalotiopsona B, 3,8-dihidroxi-6-metil-9-oxo-9H-xanteno-1-carboxilato. As isodolinas foram isolados do fungo *Emericella* sp., hospedando a planta de mangue *Aegiceras corniculatum*. Do fungo *Pestalotiopsis* spp., endofítico da planta *Rhizophora stylosa* isolou-se pestalotiopsona F, pestalotiopsona B, 3,8-dihidroxi-6-metil-9-oxo-9H-xanteno-1-carboxilato e policetídeos de 5-cloroisotiorina, apresentando IC₅₀ entre 2,56-39,97 µM em ensaios contra vírus H1N1 e H3N2. Emerimidina A e B apresentaram inibição relativa da replicação viral (abaixo de 50% de efeito citopático em ensaio de replicação viral), nas concentrações de IC₅₀ 42,07 µg/mL e 62,05 µg/mL (considerando ribavirina como controle positivo com IC₅₀ 24,60 µg/mL) (ZHANG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2018).

d) Considerações finais do Capítulo I

A literatura abordada para a revisão demonstra alto potencial de bioprospecção de biocompostos para inibição de atividade patogênica de protozoários, bactérias e vírus, relatando poucos estudos associados a protozoários e vírus, evidenciando um nicho pouco explorado pela pesquisa científica.

Referências do Capítulo I:

AI, W., WEI, X., LIN, X., *et al.* "Guignardins A-F, spirodioxynaphthalenes from the endophytic fungus *Guignardia* sp. KcF8 as a new class of PTP1B and SIRT1 inhibitors", **Tetrahedron**, v. 70, n. 35, p. 5806–5814, 2 set. 2014. DOI: 10.1016/j.tet.2014.06.041.

ASHKENAZI, A., FAIRBROTHER, W. J., LEVERSON, J. D., *et al.* **From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. Nature Reviews Drug Discovery.** [S.l.], Nature Publishing Group. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209992/>. Acesso em: 9 mar. 2021. , 1 abr. 2017

AU, J. S., POCKROS, P. J. "Novel Therapeutic Approaches for Hepatitis C", **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, n. 1, p. 78–88, 14 jan. 2013. DOI: 10.1038/clpt.2013.206. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.2013.206>. Acesso em: 7 jul. 2020.

BENGIS, R. G., LEIGHTON, F. A., FISCHER, J. R., *et al.* **The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. OIE Revue Scientifique et Technique.** [S.l: s.n.], 2004.

BERGELSON, J. M., CUNNINGHAM, J. A., DROGUETT, G., *et al.* "Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5", **Science**, v. 275, n. 5304, p. 1320–1323, 28 fev. 1997. DOI: 10.1126/SCIENCE.275.5304.1320.

CAMPOS, F. F., SALES JUNIOR, P. A., ROMANHA, A. J., *et al.* "Bioactive endophytic fungi isolated from *caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *fusarium* sp", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760140243. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000100065&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 22 dez. 2020.

CHANDRA, S. **Endophytic fungi: Novel sources of anticancer lead molecules. Applied Microbiology and Biotechnology.** [S.l: s.n.], 2012.

CHANG, J., BLOCK, T. M., GUO, J. T. **Antiviral therapies targeting host ER alpha-glucosidases: Current status and future directions. Antiviral Research.** [S.l.], Antiviral Res. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23816430/>. Acesso em: 22 dez. 2020. , set. 2013.

CHATTOPADHYAY, S., SOKURENKO, E. V. "Evolution of pathogenic *Escherichia coli*", **Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition**, p. 45–71, 5 ago. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-397048-0.00003-6.

CHEN, Y., LIU, Z., LIU, H., *et al.* "Dichloroisocoumarins with Potential Anti-Inflammatory Activity from the Mangrove Endophytic Fungus Ascomycota sp. CYSK-4", **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 54, 9 fev. 2018. DOI: 10.3390/md16020054. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/2/54>. Acesso em: 14 set. 2020.

COSTA, I. P. M. W., MAIA, L. C., CAVALCANTI, M. A. "Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of Northeast Brazil", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1165–1173, 2012. DOI: 10.1590/S1517-83822012000300044. .

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L., ROMÃO-DUMARESQ, A. S., LACAVA, P. T., *et al.* "Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests", **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153–166, 6 ago. 2013. DOI: 10.1007/s00294-013-0396-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-013-0396-8>. Acesso em: 14 set. 2020.

DIAS, D. A., URBAN, S., ROESSNER, U. "A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery", **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 16 abr. 2012. DOI: 10.3390/metabo2020303. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2218-1989/2/2/303>. Acesso em: 14 set. 2020.

DINESH, D. C., TAMILARASAN, S., RAJARAM, K., *et al.* "Antiviral Drug Targets of Single-Stranded RNA Viruses Causing Chronic Human Diseases", **Current Drug Targets**, v. 21, n. 2, p. 105–124, 20 set. 2019. DOI: 10.2174/1389450119666190920153247. .

EBERT, G., PRESTON, S., ALLISON, C., *et al.* "Cellular inhibitor of apoptosis proteins prevent clearance of hepatitis B virus", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5797–5802, 5 maio 2015. DOI: 10.1073/pnas.1502390112. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/112/18/5797>. Acesso em: 22 dez. 2020.

ELAVARASI, A., RATHNA, G. S., KALAISELVAM, M. "Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*", **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S1081–S1085, 1 fev. 2012. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60365-7.

FAIR, R. J., TOR, Y. "Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century",

Perspectives in Medicinal Chemistry, v. 6, n. 6, p. 25, 24 jun. 2014. DOI: 10.4137/PMC.S14459. Disponível em: /pmc/articles/PMC4159373/. Acesso em: 19 jul. 2022.

FERREIRA, M. C., VIEIRA, M. de L. A., ZANI, C. L., *et al.* "Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae)", **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36–44, 1 abr. 2015. DOI: 10.1016/J.BSE.2014.12.017. .

GUPTA, S., CHATURVEDI, P., KULKARNI, M. G., *et al.* **A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. Biotechnology Advances.** [S.l.], Elsevier Inc. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975019301624>. Acesso em: 7 fev. 2021. , 1 mar. 2020

HAYIBOR, K., KWAIN, S., OSEI, E., *et al.* "Ghanaian mangrove wetland endophytic fungus, *Penicillium herquei* strain BRS2A-AR produces (9Z, 11E)-13-oxooctadeca-9,11-dienoic acid with activity against *Trichomonas mobilensis*", **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 1918, 2019. DOI: 10.4314/ijbcs.v13i4.2.

HEMBERGER, Y., XU, J., WRAY, V., *et al.* "Pestalotiopens A and B: Stereochemically Challenging Flexible Sesquiterpene-Cyclopaldic Acid Hybrids from *Pestalotiopsis* sp.", **Chemistry - A European Journal**, v. 19, n. 46, p. 15556–15564, 11 nov. 2013. DOI: 10.1002/chem.201302204. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201302204>. Acesso em: 22 dez. 2020.

HENRIKSEN, T. H., ABEBE, W., AMOGNE, W., *et al.* "Association between antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae and burden of environmental bacteria in hospital acquired infections: analysis of clinical studies and national reports", **Heliyon**, v. 5, n. 7, 1 jul. 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02054.

HUANG, E., GURZAU, A. E., HANSON, B. M., *et al.* "Detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among swine workers in Romania", **Journal of infection and public health**, v. 7, n. 4, p. 323–332, 2014. DOI: 10.1016/J.JIPH.2014.03.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24821273/>. Acesso em: 11 jul. 2022.

IMRE, G. "Cell death signalling in virus infection", **Cellular Signalling**, v. 76, p. 109772, 1 dez. 2020. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109772. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656820302497>.

JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., *et al.* "Global trends in emerging infectious diseases", **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, fev. 2008. DOI: 10.1038/nature06536. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature06536>. Acesso em: 11 jul. 2022.

LI, H.-Y., ZHU, G.-J., ZHANG, Y.-Z., *et al.* "A qualitative study of zoonotic risk factors among rural communities in southern China", **International Health**, v. 12, n. 2, p. 77–85, 12 mar. 2020. DOI: 10.1093/INTHEALTH/IHAA001. Disponível em: <https://academic.oup.com/inthealth/article/12/2/77/5732900>. Acesso em: 25 jul. 2021.

LI, J. W. H., VEDERAS, J. C. **Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier?** **Science**. [S.l: s.n.], 10 jul. 2009.

LINNAKOSKI, R., RESHAMWALA, D., VETELI, P., *et al.* "Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications", **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 2325, 2 out. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02325. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 7 jul. 2020.

LUO, X., YANG, J., CHEN, F., *et al.* "Structurally Diverse Polyketides From the Mangrove-Derived Fungus *Diaporthe* sp. SCSIO 41011 With Their Anti-influenza A Virus Activities", **Frontiers in Chemistry**, v. 0, n. JUL, p. 282, 2018. DOI: 10.3389/FCHEM.2018.00282.

MA, J., ZHANG, X., SOLOVEVA, V., *et al.* "Enhancing the antiviral potency of ER α -glucosidase inhibitor IHVR-19029 against hemorrhagic fever viruses in vitro and in vivo", **Antiviral Research**, v. 150, p. 112–122, 1 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29253498/>. Acesso em: 22 dez. 2020.

MANSOLDO, F. R. P., CARTA, F., ANGELI, A., *et al.* "Chagas Disease: Perspectives on the Past and Present and Challenges in Drug Discovery", **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **5483**, v. 25, n. 22, p. 5483, 23 nov. 2020. DOI: 10.3390/MOLECULES25225483. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/22/5483/htm>. Acesso em: 25 jul. 2021.

MARJOMÄKI, V., TURKKI, P., HUTTUNEN, M. "Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species", **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6387–6399, 7 dez. 2015. DOI: 10.3390/v7122945. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/12/2945>. Acesso em: 7 jul. 2020.

MAYER, M., VOGL, C. R., AMORENA, M., *et al.* "Treatment of Organic Livestock with Medicinal Plants: A Systematic Review of European Ethnoveterinary Research", **Forsch Komplementmed**, v. 21, p. 375–386, 2014. DOI: 10.1159/000370216. Disponível em: www.karger.com/fok. Acesso em: 11 jul. 2022.

MAZLAN, N. W., TATE, R., YUSOFF, Y. M., *et al.* "Metabolomics-Guided Isolation of Anti-Trypanosomal Compounds from Endophytic Fungi of the Mangrove plant *Avicennia Lanata*", **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1815–1835, 23 abr. 2019. DOI: 10.2174/0929867326666190704130105. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/173238/article>. Acesso em: 22 dez. 2020.

NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., *et al.* "Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge", **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S3–S15, 30 maio 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021.

NURUNNABI, T. R., NAHAR, L., AL-MAJMAIE, S., *et al.* "Anti-MRSA activity of oxysporone and xylitol from the endophytic fungus *Pestalotia* sp. growing on the Sundarbans mangrove plant *Heritiera fomes*", **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 2, p. 348–354, 1 fev. 2018. DOI: 10.1002/ptr.5983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29193363/>. Acesso em: 22 dez. 2020.

ROOPA, G., MADHUSUDHAN, M. C., SUNIL, K. C. R., *et al.* "Identification of Taxol-producing endophytic fungi isolated from *Salacia oblonga* through genomic mining approach", **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 119–127, 1 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.jgeb.2015.09.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.09.002>. Acesso em: 30 out. 2020.

ROSA, L. H., GONÇALVES, V. N., CALIGIORNE, R. B., *et al.* "Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 420–430, 2010. DOI: 10.1590/S1517-83822010000200024. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjm/a/p4Mrynht9qvPGWsRz9VtZTG/?lang=en>. Acesso em: 25 jul. 2021.

RUBINI, M. R., SILVA-RIBEIRO, R. T., POMELLA, A. W. V., *et al.* "Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of

Crinipellis pernicioso, causal agent of Witches' Broom Disease", **Int. J. Biol. Sci.**, v. 1, p. 24–33, 2005. Disponível em: www.biolsci.org. Acesso em: 7 jul. 2020.

RYANG, J., YAN, Y., SONG, Y., *et al.* "Anti-HIV, antitumor and immunomodulatory activities of paclitaxel from fermentation broth using molecular imprinting technique", **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0915-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0915-1>. Acesso em: 22 dez. 2020.

SAAD, M. M. G., GHAREEB, R. Y., SAEED, A. A. "The potential of endophytic fungi as bio-control agents against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae)", **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, p. 7, 14 dez. 2019. DOI: 10.1186/s41938-019-0108-x. Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-019-0108-x>. Acesso em: 14 set. 2020.

SÄDE, E., MURROS, A., BJÖRKROTH, J. "Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry", **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 252–258, 1 jun. 2013. DOI: 10.1016/J.FM.2012.10.007. .

SCHEUTZ, F., STROCKBINE, N. A., "Escherichia". **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, [S.l.], Wiley, 2015. p. 1–49. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01147. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01147>. Acesso em: 11 jul. 2022.

SHIM, J., KIM, J., TENSON, T., *et al.* "Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis", **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 223, 12 ago. 2017. DOI: 10.3390/v9080223. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805681/>. Acesso em: 22 dez. 2020.

SINGH, N., ANAND, S., "Enterobacteriaceae". **Encyclopedia of Dairy Sciences**, [S.l.], Elsevier, 2022. p. 482–489. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22978-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965229788>. Acesso em: 26 mar. 2020.

STROHL, W. R. **The role of natural products in a modern drug discovery program. Drug Discovery Today**. [S.l.], Elsevier Current Trends. , 1 fev. 2000

TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M., WOOLHOUSE, M. E. J. "Risk factors for human disease emergence", **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**,

v. 356, n. 1411, p. 983–989, 2001. DOI: 10.1098/rstb.2001.0888.

TAYLOR, M. W., "What Is a Virus?". **Viruses and Man: A History of Interactions**, Cham, Springer International Publishing, 2014. p. 23–40. DOI: 10.1007/978-3-319-07758-1_2. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07758-1_2.

WANG, A., YIN, R., ZHOU, Z., *et al.* "Eremophilane-Type Sesquiterpenoids From the Endophytic Fungus *Rhizopycnis vagum* and Their Antibacterial, Cytotoxic, and Phytotoxic Activities", **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 596889, 26 out. 2020. DOI: 10.3389/fchem.2020.596889. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.596889/full>. Acesso em: 22 dez. 2020.

WANG, H., LU, Z., QU, H. J., *et al.* "Antimicrobial aflatoxins from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* 092008", **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 8, p. 1387–1392, ago. 2012. DOI: 10.1007/s12272-012-0808-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22941481/>. Acesso em: 22 dez. 2020.

WANG, P., YU, J. H., ZHU, K., *et al.* "Phenolic bisabolane sesquiterpenoids from a Thai mangrove endophytic fungus, *Aspergillus* sp. xy02", **Fitoterapia**, v. 127, p. 322–327, 1 jun. 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.02.031.

WHEELER, N. C., JECH, K., MASTERS, S., *et al.* "Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *taxus brevifolia* and related species", **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 4, p. 432–440, 1 abr. 1992. DOI: 10.1021/np50082a005. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 22 dez. 2020.

XU, Z., WU, X., LI, G., *et al.* "Pestalotiopsis B, a new isocoumarin derivative from the mangrove endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. HHL101", **Natural Product Research**, v. 34, n. 7, p. 1002–1007, 2 abr. 2020. DOI: 10.1080/14786419.2018.1539980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30623682/>. Acesso em: 7 fev. 2021.

XU, Z., XIONG, B., XU, J. "Chemical Investigation Of Secondary Metabolites Produced By Mangrove Endophytic Fungus *Phyllosticta Capitalensis*", **Natural Product Research**, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1656624. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2019.1656624>. Acesso em: 22 dez. 2020.

YU, G., ZHOU, G., ZHU, M., *et al.* "Neosartoryadins A and B, Fumiquinazoline

Alkaloids from a Mangrove-Derived Fungus *Neosartorya udagawae* HDN13-313", 2015. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02964. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 22 dez. 2020.

ZHANG, G., SUN, S., ZHU, T., *et al.* "Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*", **Phytochemistry**, v. 72, n. 11–12, p. 1436–1442, 1 ago. 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.04.014.

- Capítulo II -

***Isolamento e caracterização do fungo endofítico *Neofusicoccum parvum*:
Caracterização química de metabólitos secundários e de enzimas hidrolíticas e
oxirredutases***

a) Objetivos específicos

- Bioprospectar um fungo endofítico, isolando e caracterizando-o quanto às suas características morfológicas.
- Realizar a caracterização química de metabólitos secundários e de enzimas hidrolíticas e oxirredutases pós fermentação em estado sólido.

b) Metodologia

b.1) Isolamento do fungo endofíticos do manguezal da região do Itacorubi, Florianópolis - Santa Catarina

b.1.1) Coleta e isolamento de amostras

O desenho experimental geral do Capítulo II está representado pela **Figura 3**. O isolamento foi realizado na região do mangue do Itacorubi, nas coordenadas – Itacorubi - 27°35'16.1”S e 48°30'31.2”W, como demonstrado na **Figura 3**.

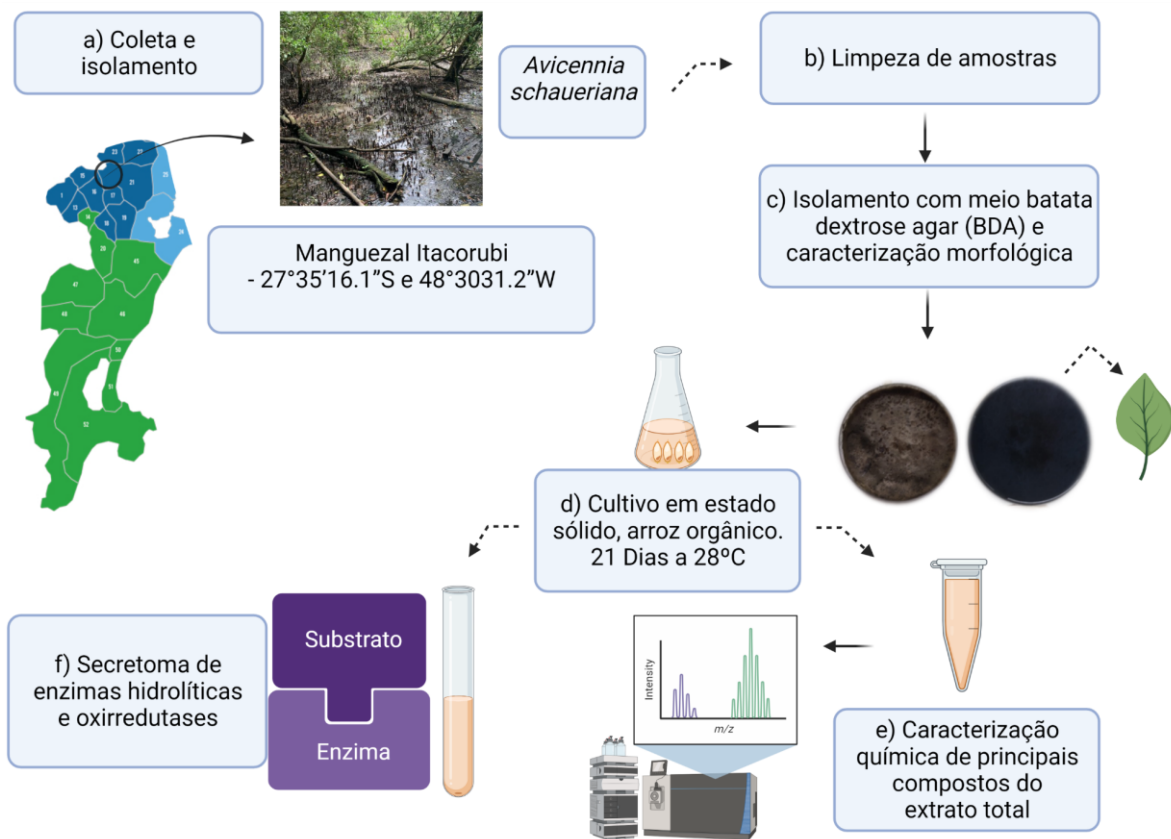


Figura 3: etapas de coleta e isolamento de amostras vegetais, b) Processo de descontaminação de amostras coletadas, c) Isolamento com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e caracterização morfológica, d) cultivo em estado sólido, sendo feito em arroz orgânico para obtenção de extrato total. Fonte: Autor, 2022.

Para o processo de coleta de amostras e isolamento, sacos plásticos foram utilizados para armazenar as amostras junto de alicates para realizar o corte de amostras vegetais, sendo coletadas raízes, caule e folhas das plantas: *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*. As coletas foram autorizadas e registradas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, registradas sob o número 73719-2. Exsiccatas foram preparadas com papelão e desidratadas em estufa (37°C) por 14 dias para confirmação das espécies obtidas e conservação de amostras, sendo os exemplares identificados pelo Professor Doutor Paulo Horta do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

b.1.2) Descontaminação do material

Para o processo de descontaminação das amostras todas foram lavadas em água corrente para remoção de debris do solo, separadas por grupos de folhas, caules e raízes e as folhas após lavagem foram seladas pelo pedúnculo com parafina de vela, a fim de evitar entrada de líquidos externos durante processo de limpeza, conforme segue na **Figura 4**.

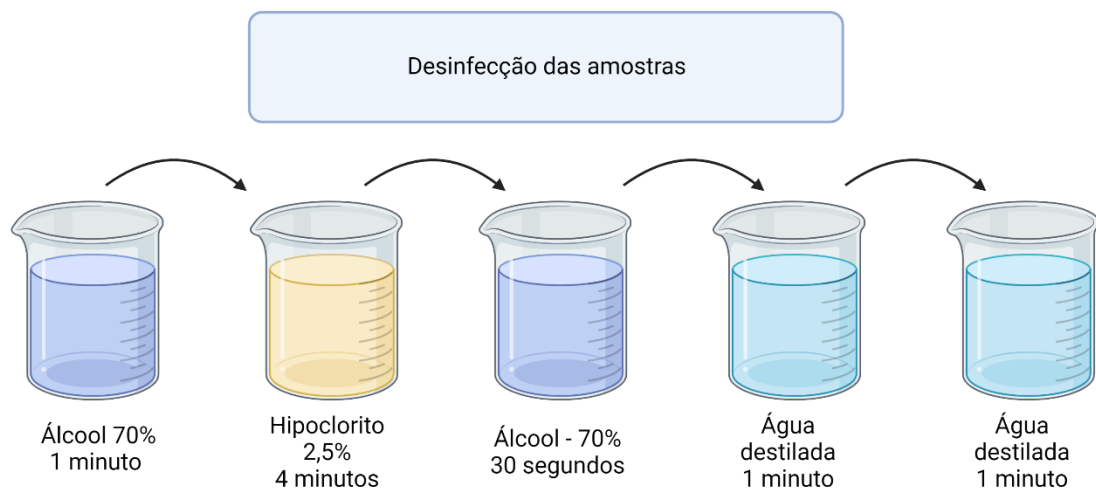


Figura 4: Etapas realizadas no processo de desinfecção de amostras de vegetais com seus respectivos tempos e conteúdo. Fonte: Autor, 2022.

Para o processo de limpeza de amostras recipientes contendo 500 mL de álcool 70%, hipoclorito 2,5% e água destilada autoclavada previamente foram dispostos. O procedimento foi realizado em fluxo laminar propiciando condições assépticas a fim de evitar contaminação do material antes da etapa de isolamento. As raízes, caules e folhas após a lavagem em água corrente foram submetidas a álcool 70% por 1 minuto, depois ao recipiente de hipoclorito com solução a 2,5% por 4 minutos, álcool 70% por 30 segundos e duas sequências de água destilada autoclavadas, seguindo protocolos estabelecidos (AZEVEDO, JOÃO LÚCIO DE ; SOARES DE MELO, 1998).

Foi realizado o plaqueamento do último recipiente contendo água destilada (200 µL em placas de batata dextrose ágar- BDA em estufa 28°C por 7 dias) para confirmação da assepsia do processo de limpeza.

b.2) Isolamento, caracterização morfológica e molecular

O isolamento de fungos endofíticos se deu pelo processo de plaqueamento de raízes, caules e folhas cortados em fragmentos, cada um medindo 5 mm² utilizando bisturi com lâminas descartáveis e macerados, no caso de caules e raízes de plantas. As folhas foram cortadas ou fragmentadas em forma circular com diâmetro relativo ao instrumento utilizado. Cinco fragmentos de cada peça vegetal foram dispostos equidistantes em placas de Petri de 90 mm. O plaqueamento foi realizado contendo meio nutritivo autoclavado BDA utilizando fluxo laminar para evitar contaminações. As placas foram devidamente identificadas e mantidas em estufa a 28°C por 14-30 dias para crescimento de culturas e cinco réplicas de cada amostra biológica foi realizada. Culturas axênicas foram utilizadas para determinar a morfologia macroscópica, microscópica e reprodutiva (ZHOU *et al.*, 2018).

A caracterização da macromorfologia foi realizada utilizando culturas axênicas em meio BDA, avaliando a forma do micélio, cor e textura da superfície de ambos os lados (verso e reverso), assim como a taxa de crescimento.

A avaliação das características micromorfológicas se deu com a realização da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950; SU; QI; CAI, 2012). Sendo assim, dois fragmentos com as dimensões de 1,5x1,5 cm de meio BDA foram dispostos e utilizados em lâminas de microscopia, sendo armazenadas em placas de Petri com disco de filtro de 90 mm ao fundo e um suporte de 3 mm para manter a lâmina. Com o auxílio de palitos de madeira estéreis os quatro quadrantes do bloco de ágar receberam o inóculo fúngico e foram cobertos com uma lamínula de 24x24mm estéril. Após, 1 mL de água destilada estéril foi adicionada para manter a umidade, a placa então foi fechada com parafilme e incubada pelo período de 7 a 14 dias em estufa a 25°C. Então, cada lamínula foi removida e fixada com lactofenol com azul de algodão (hialinos) ou sem uso de corante (fungos demáceos) e foi realizado a observação em microscópio óptico em 400X para análise de características da micromorfologia de hifas, conídios e leveduras.

A identificação molecular foi realizada por empresa contratada, usando um marcador molecular da região ITS 1 (*Internal Transcribed Spacer*) localizada as subunidades dos genes 18S e 28S do DNA ribossomal, contendo 269 pares de bases. Esta região é conservada intraespecificamente e variável as diversas espécies, permitindo assim a identificação de gêneros e espécie, podendo se utilizar *primers* específicos ancorados para essas regiões (WHITE *et al.*, 1990).

Para tal, o DNA do fungo foi extraído por meio do micélio cultivado em meio de cultura (DOYLE, J.J., DOYLE, 1897), neste método, a amostra de DNA foi submetida à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar a região do espaçador transcrito interno do rDNA (ITS), os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'). A reação PCR totalizou de 50 µL e ocorreu com uma mistura de 1 µl de DNA, 1 µl de cada iniciador a 10 µM, 10 µl de tampão de 5X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 0,2 µl de GoTaq DNA polimerase 5 U/µL (Promega) e 35,8 µL de água ultrapura esterilizada. A amplificação consistiu na desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 s, anelamento a 54 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45 s e uma extensão final a 72 °C por 4 min. Os produtos do processo de amplificação foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio e purificados por precipitação com polietilenoglicol. Os fragmentos foram sequenciados por meio da análise de terminação em cadeia com o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) em sequenciador capilar automático 3.500 XL (Applied Biosystems). Após, as sequências obtidas para os fungos isolados foram comparadas com o banco de dados GenBank por meio da ferramenta BLAST (sigla em inglês: Basic Local Alignment Search Tool) (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

Após o sequenciamento ter sido realizado o fungo isolado com 99% de acurácia para *Neofusicoccum parvum* foi depositado no Ministério do Meio Ambiente, ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, se tornando então patrimônio da Federação vinculado a Universidade Federal de Santa Catarina pelo N° de cadastro: AD1FC66.

b.2.1) *Neofusicoccum parvum*

O fungo *Neofusicoccum parvum* (Filo Ascomycota) pertence à família Botryosphaeriaceae, possuindo interações como patógeno, sapróbio (se desenvolve em matéria em decomposição), necrotrófico (se alimenta de células de seu hospedeiro), ou endofítico, relatado em especial em plantas lenhosas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Após processo de isolamento, este apresentou alta taxa de crescimento micelar, características de micélios aéreos inicialmente brancos, onde há produção de pigmentação (melanina), tornando-o cinza a preto ao longo do tempo. O reverso das colônias em tom branco, que também se tornaram acinzentado a preto com o envelhecimento, possuindo forma circular como apresentado na **Figura 5**.

Sua micromorfologia apresenta hifas demáceas, septadas, sem presença de clamidiósporo. A pigmentação observada na coloração pode ocorrer desde o período inicial da germinação, nos conídios. Tais pigmentos são gerados pela presença de melanina, característica presente em outros fungos (YU *et al.*, 2015).

Apresenta distribuição mundial, associado em muitos casos com sua capacidade patogênica, em regiões do caule especificamente, mas também sendo identificado como endofítico (como no caso da *Avicennia schaueriana*) (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).



Figura 5: Morfologia macroscópica do fungo *Neofusicoccum parvum*, verso e inverso da placa.

b.2.2) Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é comumente utilizada para prospecção de metabólitos secundários (TSUCHIYA *et al.*, 1994). Dentre os motivos destaca-se: a presença

de baixa umidade e a alta concentração produzida de metabólitos. Além disto, o substrato tende a absorver a água que seria demandada pelo microrganismo e tem a vantagem da transferência de oxigênio durante o processo, viabilizando o desenvolvimento e otimizando a produção de metabólitos (MARUYAMA *et al.*, 2000; ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001). Diversos resíduos da agricultura têm sido explorados como substrato para a fermentação em estado sólido (BARRIOS-GONZÁLEZ; CASTILLO; MEJÍA, 1993). A fermentação em estado sólido pode ser dividida em dois tipos: (1) que utiliza materiais inertes apenas para suporte e (2) que utiliza materiais não inertes, sendo estes biomassa, que servirá de suporte e também fonte de nutrientes e carbono para o microrganismo (CARBOUÉ *et al.*, 2018).

O arroz é um grão que apresenta uma relação de 49,5% de carboidratos totais, 14% de proteínas e 22% de lipídios, a quantia de carboidratos em forma de amido e celulose o tornam candidato para obtenção de enzimas como amilase e celulase, além da presença de lipídios, estimulando a produção de lipases. Possui antioxidantes (e.g., polifenóis, tocotrienols e vitamina E), alta taxa de íons de ferro, magnésio e fósforo, além de fibras. Ácidos palmítico (21-26%), linoleico (31-33%) e ácido oleico (37-42%) são produzidos e armazenados, podendo ser utilizado em biotransformação durante a fermentação em estado sólido (JANG; YANG, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; GUL *et al.*, 2015; ALAUDDINA *et al.*, 2017).

A fermentação em estado sólido para caracterização química de metabólitos foi realizada utilizando 90 g de arroz orgânico comercial autoclavado com 90 mL de água destilada em Erlenmeyer de 500 mL de vidro autoclavados previamente. Após isto, placas com total crescimento micelar do fungo *N. parvum* receberam solução autoclavada de Tween 80 na concentração 0,8% e foram raspadas dentro de um tubo plástico autoclavado de 50 mL para contagem de esporos e preparo do material fúngico para inóculo. A contagem dos esporos foi realizada utilizando um microscópio óptico de luz (Olympus, Japão), seguido de diluições seriadas na base 10 e aplicação de 10 µL em lâminas, coradas com corante azul de lactofenol-azul, como preconiza a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013). Foram inoculados 10^6 esporos contabilizados em microscópio óptico de luz diluídos em 7 mL da solução Tween 80%. O fungo *N. parvum* foi escolhido para fermentação sólida devida a sua taxa de crescimento acelerada em meio líquido e sólido.

b.3) Caracterização química de metabólitos secundários

b.3.1) Maceração e produção de extrato bruto

Para a caracterização química o fungo cultivado em estado sólido foi cultivado por 14 e 21 dias buscando assim períodos de maior produção de metabólitos secundários. A caracterização química foi realizada em parceria com o Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN). Cada fermentado foi então submetido a maceração química, adicionando a quantidade de 50 mL de diclorometano CH_2Cl_2 – PA (90%) e metanol CH_3OH - PA (90%) em concentração 1:1 (v/v). Diclorometano é um solvente orgânico halogenado, pela presença do grupo Cl, contém massa molar $84.00 \text{ (g/mol}^{-1}\text{)}$, ponto de ebulição $39 \text{ (}^\circ\text{C)}$, fusão $-95.00 \text{ (}^\circ\text{C)}$, sendo utilizado no processo de extração de compostos orgânicos pela sua afinidade com compostos apolares. O metanol foi utilizado pela sua capacidade de romper membranas celulares, assim como as fúngicas, permitindo maior obtenção de compostos metabólitos secundários produzidos internamente, é um solvente orgânico não halogenado, com alta afinidade por moléculas polares devido a suas semelhanças estruturais com a molécula da água, como momento dipolo. Apresenta características de massa molar $32,04 \text{ g/mol}$, ponto de ebulição $64,7 \text{ (}^\circ\text{C)}$ e fusão $-97,6 \text{ (}^\circ\text{C)}$.

O processo de maceração química foi realizado por 4 dias com ambos os solventes orgânicos, em temperatura ambiente. Após a maceração química foi realizada uma filtração simples para remoção de debris celulares e rotaevaporação (Bünchi – Rotavapor R-3) em balão volumétrico, utilizando-se bomba pneumática na pressão máxima (Bünchi - Vacuum Pump V-700) para acelerar a evaporação de resíduos de solventes orgânicos, em banho maria com temperatura variando entre $30\text{-}55 \text{ (}^\circ\text{C)}$, resultando em um extrato total com compostos com características polares e apolares, que posteriormente foi submetido ao processo de liofilização por 24h.

b.3.2) Caracterização de perfil químico por UPLC-MS (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas/ *Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

Para a caracterização do perfil químico do extrato bruto obtido no equipamento UPLC-MS, uma quantia de 1,6 mg de extrato total foi diluído em 2 mL de acetonitrila (GRAU LC-MS – Sigma-Aldrich) uma filtração prévia foi realizada usando uma seringa de vidro e membrana hidrofóbica (FILTRILO) de celulose com porosidade de 0,22 µm para evitar passagem de impurezas em recipiente de vidro (Supelco – Vial).

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema Acquity H-Class UPLC-PDA (Waters Co., EUA). Uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm i.d., 1,7 µm) foi usada para a análise, ajustada a 40 °C. A análise de MS foi realizada em um espectrômetro de massa quadrupolo de aceleração ortogonal de tempo de voo (QTOF), Xevo GS-2 QToF, com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), operando nos modos positivo e negativo, com a faixa de massa entre 100- 1200 Da e um tempo de varredura de 0,3 s.

O sistema de fase móvel consistia em um gradiente de ácido fórmico aquoso a 0,1% (pH 3,0) (A) e ACN (B) a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min. O gradiente foi composto por: 0-7 min 90% (A) e 10% (B); 7-12 min 10% (A) e 90% (B), 12-14 min 90% (B); 14-15 min 10% de (A) e 15-20 min: retorno às condições iniciais. O volume de injeção foi de 2 µL. A análise de MS foi realizada no Xevo GS-2 QToF equipado com um espectrômetro de massa quadrupolo de aceleração ortogonal de tempo de voo (QTOF) e uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). Esta fonte de ionização operou nos modos positivo e negativo, com faixa de massa entre 100-1500 Da e tempo de varredura de 0,3 s. As configurações do instrumento no modo positivo foram: tensão capilar de 3,0 kV; tensão do cone de amostragem de 40 V; tensão de compensação da fonte de 80 V; temperatura de dessolvatação de 200 °C; temperatura da fonte de 80 °C; vazão de gás de cone de 50 L/h e vazão de gás de dessolvatação de 500 L/h. Os parâmetros em modo negativo foram: tensão capilar de 3 kV; tensão do cone de amostragem de 40 V; tensão de compensação da fonte de 80 V; temperatura de dessolvatação de 300 °C; temperatura da fonte de 90 °C; vazão de gás de cone de 50 L/h e vazão de gás de dessolvatação de 600 L/h. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e o argônio como gás de colisão. Os modos MS e MSE (em duas funções de varredura) foram adquiridos no modo centroide e monitorados com

um tempo de varredura de 1 s. A energia de colisão foi de 6 eV na função 1 e aumentou de 25 para 35 eV na função 2. Para garantir valores de massa precisos, os dados foram corrigidos durante a aquisição por uma referência externa (LockSpray™) denominada solução de leucina-encefalina (1 ng/mL) em uma vazão de 20 µL/min. O controle do sistema e o processamento dos dados foram realizados com o software MassLynx 4.1 (Waters Co., EUA). Todas as amostras foram preparadas pela dissolução de cada extrato em água:acetoneitrila (9:1, v/v) para atingir uma concentração de 800 µg/mL.

b.4) Quantificação de enzimas hidrolíticas e oxirredutases

b.4.1) Preparo de extrato para quantificação de enzimas

O preparo de extrato para quantificação de enzimas foi realizado em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – campus Erechim, Rio Grande do Sul.

Para o processo de extração de enzimas foi utilizado tampão de fosfato de sódio (Na₃PO₄) na concentração de 100 mM pH 6 para extração do secretoma total de enzimas. Um total de 10 g do cultivo em estado sólido foi adicionada à 100 mL do tampão, mantido em agitação orbital pelo período de 1 hora a 200 rpm (rotação por minuto) a 28°C. Os extratos foram filtrados por prensagem manual em tecido sintético, o resíduo retido foi esterilizado e descartado, o extrato obtido líquido foi então centrifugado (NT 815 - NovaTecnica, Brasil) a 2000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi utilizado para as etapas de análise de enzimas, seguindo protocolo adaptado (TREICHEL *et al.*, 2015).

b.4.2) Quantificação enzimática

Para o processo de quantificação enzimática do secretoma fúngico foram selecionadas as seguintes enzimas: amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, na possibilidade de prospecção de potenciais enzimáticos em tais fungos.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e sempre contendo um controle reacional, sem a presença dos extratos enzimáticos.

b.4.2.1) Amilase

A atividade da enzima hidrolítica de amilase foi quantificada baseado no secretoma utilizando como substrato amido solúvel diluído na proporção de 1:100 (m/v) em tampão acetato na concentração de 100 mM e pH 5,0. Após isto, 1 mL dessa solução foi transferida para tubos de ensaio em que se adicionou mais 1 mL do secretoma fúngico. As amostras foram mantidas em banho termostático pelo período de 10 minutos a 38 °C (FUWA, 1954; PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, 1987). Após o tempo de reação ter ocorrido, a atividade enzimática foi avaliada pela liberação de açúcares redutores (glicose liberada após a ação da enzima amilase) totais pelo método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade da atividade de amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima com capacidade de hidrolisar e liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de reação.

b.4.2.2) Celulase

Para quantificação da enzima hidrolítica celulase foram utilizados 50 mg de papel filtro Whatman número 1 como fonte de celulose para a reação enzimática, os resultados foram expressos como atividade de celulase do papel filtro (FPase). Tubos de ensaio contendo 50 mg de papel filtro receberam 2 mL de tampão acetato 0,2 M e pH 5,5 e 1 mL dos extratos fermentados. A reação ocorreu a 50 °C pelo período de 1 hora. Após o período de reação, a atividade enzimática foi avaliada por meio da liberação de açúcares redutores (glicose liberada após ação da celulase) totais pelo método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade da atividade de FPase (U) foi então definida como a quantidade de enzima com capacidade de hidrolisar e liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de reação.

b.4.2.3) Lacase

Para a determinação da atividade da enzima lacase, foi utilizado 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolozin-6-sulfônico (ABTS) como o substrato para a reação enzimática. A mistura da reação foi composta de 0,4 mL de ABTS 10 mM, 3,4 mL de tampão acetato de sódio

($C_2H_3NaO_2$) 50 mM, pH 4,8 e 0,2 mL do extrato fermentado. A reação ocorreu em banho termostático a 40 °C por um período total de 4 minutos (HOU *et al.*, 2004). A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando-se o comprimento de onda de 420 nm para a realização das leituras. Uma unidade da atividade de lacase (U) foi definida como a quantidade de enzima com capacidade de formar ao final de sua reação 1 μmol de $ABTS^+$ por minuto nas condições de reação determinadas.

b.4.2.4) Lipase

Para a quantificação da enzima lipase (responsável por realizar a quebra de ácidos graxos) foi preparado uma emulsão de azeite de oliva comercial a 10 % (m/v) e 5 % (m/v) de goma arábica diluídos em 90 % (v/v) de solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.

A emulsão foi homogeneizada utilizando um mixer. Cada amostra foi composta por 9 mL de emulsão e 1 mL do extrato fermentado. Após esta etapa, foram então submetidas a agitação orbital de 165 rpm por 32 minutos a temperatura de 35 °C. E então em cada amostra foram adicionados 10 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v) com intuito de interromper a reação enzimática. As amostras foram submetidas ao processo titulométrico utilizando NaOH na concentração de 0,05 M como titulante até atingir o pH 11 (TREICHEL, *et al.*, 2015). Como controle negativo a adição de acetona/etanol se deu previamente da adição do extrato fermentado para garantir que a reação não ocorresse. Para a determinação da atividade da enzima lipase foi utilizada a Equação 1.

$$At = \left(\frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_c} \right) * 1000 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que:

V_a = o volume médio de NaOH utilizado na titulação das amostras (mL);

V_b = o volume de NaOH utilizado na titulação do branco reacional (mL);

M = a molaridade do NaOH;

t = o tempo de reação (min);

V_c = o volume de extrato enzimático bruto utilizado na reação (mL).

Uma unidade de atividade lipásica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar (realizar a quebra na presença de uma molécula de água) 1 μmol de substrato por minuto nas condições determinadas na reação.

b.4.2.4) Peroxidase

Para a atividade da enzima oxirredutase peroxidase, o meio para que ocorresse a reação foi composto de 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM e pH 5,0, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol éter monometílico de catecol 1 % (v/v), 1 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,08 % (v/v) e 1 mL do extrato fermentado. Os tubos de ensaio contendo o meio específico para a reação foram submetidos ao banho termostático pelo período de 10 minutos e sob temperatura de 35 °C. A absorbância das amostras foi quantificada então em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 470 nm para leitura. Uma unidade da atividade de peroxidase (U) foi definida então como a quantidade de enzima com capacidade de causar aumento da unidade de absorbância em 0,001 por minuto nas condições de reação determinadas.

c) Resultados e discussão

c.1) Perfil químico

Cromatogramas com maiores riquezas de compostos foram analisados para identificação de perfil químico aos períodos de 14 e 21 dias, sendo estes identificados como: 2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona, derivado de Radicamina A, Securinol A, Ansellone B, Suspendole e Pestalotiopina B, além de resíduos de ácidos graxos e sacarose.

A **Tabela 1**: Principais compostos identificados no período de fermentação em estado sólido após 14 dias do fungo *N. parvum*.

Tabela 1: principais compostos identificados após fermentação em 14 dias pelo fungo *N. parvum*.

Forma molecular	Identidade
C ₂₂ H ₁₄ O ₄ -HCO ₂	2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona
C ₁₂ H ₁₇ NO ₅ +H	Derivado de Radicamina A
C ₁₃ H ₁₇ NO ₄ +H	Securinol A
C ₂₇ H ₄₀ O ₅ +Na	Anselone B
C ₂₇ H ₂₀ O ₅ +H	Calanone
C ₃₃ H ₄₅ NO ₄ +H	Suspendole
C ₃₂ H ₄₉ NO ₆ +H	Pestalotiopina B

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 2: principais compostos identificados após fermentação em 21 dias pelo fungo *N. parvum*.

Forma molecular	Identidade
$C_{12}H_{22}O_{11}+Na$	Sacarose
$C_{19}H_{36}O_3+H$	Éster de ácidos graxos
$C_{30}H_{24}O_{12}+H$	Policetídeo

Fonte: Autor, 2022.

As leituras realizadas em 14 e 21 dias representam *pool* de leituras, evidenciando a reprodutibilidade nas amostras. A riqueza de compostos em 14 dias e ausência em 21 dias pode indicar degradação do material anteriormente a leitura, considerando que foram submetidas as mesmas condições de fermentação, incluindo temperatura e quantidade de substrato, assim como mesmo processo de maceração química para obtenção de extratos e caracterização de compostos por UPCL-MS.

O composto 2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona pertence ao grupo das quinonas, sendo definido como moléculas pequenas, sendo produzido por plantas, fungos, bactérias, vírus líquens, algas, insetos e animais. Dentre o grupo das quinonas existem as classificações geradas de acordo com o esqueleto do carbono aromático, sendo as mais comuns: benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenanterequinonas (THOMSON, 1971). A naftoquinona obtida da fermentação -2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona não é relatada na literatura de origens naturais fúngica, havendo outras naftoquinonas descritas na literatura obtidas de diversas origens com atividades variadas. A literatura relata atividade cardioprotetoras e anti-isquêmicas interceptando radicais livres e auxiliando no carreamento de Fe^{2+} , gerando atividade antioxidante (LEBEDEV; IVANOVA; LEVITSKY, 2005, 2009), potencial anti-inflamatório e analgésico, pela inibição de liberação de histamina e inibição da ciclooxigenase 2 e produção de fator de necrose tumoral- α (STANIFORTH, WANG, *et al.*, 2004, ZHANG, YUAN YUAN, CHEN, *et al.*, 2006).

Relatos de atividade contra formação de novas células bacterianas assim como manutenção e viabilidade de biofilmes em contato, sendo avaliada bactérias Gram-negativa e Gram positivas pela literatura além dos citados no Capítulo I (MOREIRA *et al.*, 2017; NOVAIS *et al.*, 2018). A ação antiviral na literatura pode estar correlata com a geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pela bio-redução do grupo quinona catalisada por enzimas,

atingindo partículas virais, além de diversos outros relatos presentes no Capítulo I (SILVA *et al.*, 2019).

Radicamina A é um composto apresentado pela literatura com alvo na inibição da enzima α -glucosidase, responsável pela quebra de carboidratos, diminuindo assim picos de glicose no sangue pós-digestão, facilitando o controle de glucose no sangue para diabéticos, sem relatos com atividade contra patógenos (SHIBANO *et al.*, 2001; WAKANA; KAWAHARA; GODA, 2013; LI *et al.*, 2016).

Anselone B, um composto da classe terpenóides, foi isolado de esponjas do mar, sendo avaliado apenas como inibidor de produção de óxido nítrico (neurotransmissor relacionado com vasodilatação em processos inflamatórios) em linhagem RAW 264.7 com IC₅₀ de 4,5 μ M, não sendo avaliado contra quaisquer patógenos (WANG *et al.*, 2012; DAOUST *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017).

Calanone, um composto da classe das cumarinas, foi isolado inicialmente da planta *Calophyllum teysmannii*, este composto foi avaliado quanto ao efeito citotóxico em linhagens HeLA e L1210, apresentando resultados respectivos de IC₅₀ 22,8 μ g/mL e 59,09 μ g/mL além do ensaio in vivo em camundongos avaliando diminuição de tumor de mama, demonstrando diminuição do tumor com dose de 4 mg/mL (CAO *et al.*, 1998; WIBISONO *et al.*, 2002; EKOWATI; ASTUTI; MUSTOFA, 2010).

Sespendole, um composto sesquiterpeno, foi isolado inicialmente do fungo *Pseudobotrytis terrestris*, apresentando baixa atividade contra bactérias *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis* (7 mm e 9,5 mm na concentração de 10 μ g/6mm por disco) e avaliado como inibidor de sínteses de placas lipídicas em macrófagos, diminuindo risco de arteriosclerose (avaliado na concentração de 4 μ M) (UCHIDA *et al.*, 2006; SUGINO *et al.*, 2011; KUDO *et al.*, 2018).

Pestalotiopinona B, um composto policetídeo, foi isolado de outro fungo endofítico sendo isolado do fungo *Pestalotiopsis*, também em fermentação de estado sólido sendo o arroz o substrato, mas sendo produzido pelo *N. parvum*, demonstrando nenhuma atividade biológica contra *Enterococcus faecalis* (multirresistente), *Pseudomonas adaceae* e o fungo patogênico *Monilia albican* (na concentração de 20 μ g/mL) (ZHOU; ZHENG; XU, 2022).

c.2) Quantificação enzimática

Os resultados da quantificação enzimática resultaram em: 131 U/g de amilases, 27 U/g e 31 U/g de peroxidase, após fermentação em 21 dias. A quantificação está representada na

Tabela 3.

Tabela 3: Resultado da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente no extrato obtido após fermentação em 21 dias.

Quantificação da Atividade Enzimática (U/g)					
Fungo	Amilase	Celulase (FPase)	Lacase	Lipase	Peroxidase
<i>Neofusicoccum parvum</i>	131 ± 0,2	27 ± 0,1	nd	nd	31 ± 0,9

Fonte: Autor, 2022.

Após o processo de obtenção de enzimas ressaltou-se a presença em maior quantidade de forma ativa da enzima amilase, correlacionado ao fato de haver grande quantidade de amido disponível no substrato onde a fermentação foi realizada. O arroz como citado apresenta em torno de 49,5% de sua massa total em forma de amido, sendo este degradado pela fermentação realizada ao longo de 21 dias pelo fungo *Neofusicoccum parvum*.

A literatura demonstra que a modulação da produção enzimática pode ser obtida a depender da oferta de nutrientes como carbono no meio. O sistema responsável por esta detecção e ativação de vias enzimáticas denomina-se Repressão Catabólica do Carbono, responsável por identificar as fontes de carbono a serem utilizadas baseadas na riqueza do substrato (BROWN; RIES; GOLDMAN, 2014; FASOYIN *et al.*, 2018; ADNAN *et al.*, 2019).

O manguezal por sua vez é relatado como um ambiente que apresenta alta presença de lignocelulose, estimulando a produção de enzimas dos fungos visando obtenção de energia a partir da quebra de celulose e amido (BEHERA *et al.*, 2017; MARTINHO *et al.*, 2019).

c.2.1) Amilase

As amilases são enzimas com alto valor econômico, ocupando em torno de 25% da demanda de enzimas em nossa sociedade, dado o aumento da demanda no mercado global. A área alimentícia as utiliza para fins de obtenção de glucose, produção de xaropes entre outros

(VAN DER MAAREL *et al.*, 2002; ARIF *et al.*, 2019), na produção têxtil (KOZŁOWSKI; RÓŻAŃSKA, 2020; PARÉS VIADER *et al.*, 2021), na produção de papéis, detergentes, gesso para construções, biocombustível e aplicados até mesmo na desagregação de biofilme (SANGHVI; KOYANI; RAJPUT, 2011; SINGH *et al.*, 2018; ARTIFON *et al.*, 2018; REMPEL *et al.*, 2019; AL-DHABI *et al.*, 2020; KHELIL *et al.*, 2022; ZANIVAN *et al.*, 2022).

As amilases são enzimas que realizam quebra do amido, principal reserva energética dos vegetais, classificadas de acordo com a especificidade para suas quebras em três tipos: (1) Endoamilases, α -Amilase (EC 3.2.1.1) catalisam a hidrólise de ligações internas α -1,4-O-glicosídica, as quebras liberam ramificações variáveis de glucose, maior parte destas exige íons de cálcio (Ca^{2+}) para ativação, integridade da estrutura e estabilidade (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006). (2) Exoamilases, responsáveis por liberar produtos de baixo peso molecular (e.g., glucose e maltose) de ramificações longas ou curtas, compreendendo as β -Amilase (EC 3.2.1.2), α -glucosidase (EC 3.2.1.20) e glucoamilase (EC 3.2.1.3). (3) Amilases de desramificação, como isoamilase (EC 3.2.1.68) e pullulanase (EC 3.2.1.41), estas agem exclusivamente nas ligações α -1,6 de amilopectina, pululan e glicogênio (NOROUZIAN *et al.*, 2006; CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2011).

Outros estudos demonstraram a produção de amilase por diversos integrantes do grupo Botryosphaerales, sendo esta essencial para a biodisponibilidade de amido em glucose. Esteves e colaboradores demonstraram a presença da enzima em extratos obtidos a partir do fungo *N. parvum* (ESTEVES *et al.*, 2014). Teles e colaboradores demonstraram a produção enzimática de amilase após cultivo submerso usando extrato de levedura por 72 horas a 28°C em agitador orbital, apresentando valores de 2,10 U/mL, valores totais menores que os obtidos na fermentação em estado sólido, considerando também o período inicial de cultivo (sendo de 3 dias comparados com 21 dias) (TELES; MOSSI, 2020).

A presença de lipases fora observada em estudos realizados por Esteves (2014) a partir da fermentação do fungo *N. parvum*, apresentando uma quantia média de 114 U/mL, enquanto que Teles observou 0,85 U/mL, em contraste a não presença em nosso cultivo, havendo diferenças sobre os substratos utilizados e períodos (três dias e fermentação submersa suplementada).

c.2.2) Celulase

Celulases são enzimas que são classificadas quanto a sua ação catalítica e propriedades estruturais, havendo três principais grupos de atividades enzimáticas: (1) Endoglucanases ou da β -1,4-D-glucano-4-glucanohidrolases (E.C 3.2.1.4) com capacidade romper ligações glicosídicas internas; (2) Exoglucanases que incluem β -1,4-D-glucano glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) e β -1,4-D-glucano celobiohidrolases, que agem de forma progressiva realizando quebras sucessivas ao longo da molécula, liberando glucose e celobiose como principais produtos e (3) β -D-Glucosidases ou β -D-glucoside glucohidrolases (EC 3.2.1.21) agem em moléculas de celobiose e celodextrinas, liberando D-glucose (HENRISSAT *et al.*, 1988).

A celulose é um glicídio presente em paredes celulares vegetais, de difícil degradação por sua insolubilidade em água e por apresentar regiões da cadeia muito próximas dificultando acesso de possíveis enzimas, sendo estimado sua produção em torno de 10^{12} toneladas por ano (WILSON, 2009). Estima-se que em torno de 50% do CO₂ fixado pelos vegetais seja armazenado em forma de celulose. É a terceira enzima buscada pelo mercado global (15%), apenas atrás da amilase (25%) e proteases (18%). Celulases podem ser utilizadas para degradar celulose presente em biomassa de origem vegetal, gerando açúcares e matéria bruta para produção e valoração de diversos produtos de interesse comercial, como bioetanol, ácidos orgânicos, antibióticos e produção de ração animal (QU *et al.*, 2006; SHEN; XIA, 2006; ZHANG; JIN; KELLY, 2007; ŁUBEK-NGUYEN; ZIEMICHÓD; OLECH, 2022).

A quebra enzimática de celulose é preterida em detrimento a hidrólise ácida ou alcalina, pois, as enzimas podem ser recuperadas desde que não haja substrato de degradação além de serem específicas e exigirem menor quantidade de energia de ativação e não liberar resíduos tóxicos. A indústria de papéis utiliza celulases para remoção de tinta de papéis reciclados. Sendo possível realizar a mistura de celulose e hemicelulose para aumento da qualidade e brilho do papel reciclado. Além disto, as celulases tem sido aplicadas para produção de materiais biodegradáveis, como papéis higiênicos, cartolinas e papéis tecido (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; KIM *et al.*, 2019).

Celulases são utilizadas para promover macies e melhora da aparência de produtos têxteis baseados em celulose, além de ser utilizada no biopolimento de peças de algodão e jeans. Durante este processo, as pequenas saliências de fibras da superfície são hidrolisadas, liberando da superfície fragmentos de corante, resultando na aparência opaca do tecido, reduzindo danos à fibra por outros processos e diminuindo necessidade de atividade manual humana (UDDIN,

2015)(UDDIN, 2015). São utilizadas também celulases para remoção de corantes das fibras, removendo excessos e criando gradiente de cores (AGRAWAL, 2017).

Tais enzimas possuem sua aplicação em alimentos, sendo parte do processo de maceração enzimática para extração e clarificação de sucos de fruta e vegetais, óleos e néctares (DE CARVALHO; DA SILVA, 2010; ADEDEJI OM, 2014). Aplicações em combinação com outras enzimas podem ser usadas para aumentar o sabor e aroma de frutas cítricas (família Rutaceae) por reduzir a presença do amargo (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011). Além de favorecer a liberação de açúcares simples, podendo ser aplicadas em bebidas alcoólicas como cerveja e vinho. A aplicação de enzimas que degradam a parede celular vegetal durante a fermentação demonstrou a otimização da quantidade de liquor, aroma e estabilidade (ANOOP KUMAR *et al.*, 2019). Além de tais aplicações, a hidrólise de celulose por enzimas celulases torna biodisponível glicídios como glucose, que podem ser usados como substrato fermentativo para obtenção de bioetanol, tendo em vista a necessidade de troca de combustíveis renováveis (ARTIFON *et al.*, 2018; ZANIVAN *et al.*, 2022).

Esteves e colaboradores identificaram a presença de enzimas ativas de celulase em quantias baixas (1,05 U/mL) produzidas pelo *N. parvum*. Teles (2020) identificou a presença de 1,05 U/mL de enzimas ativas em comparação com a produção obtida de 27 U/g. A presença da celulase é essencial e justificada considerando o substrato de arroz, que é composto por 39% de celulose. Estudos indicam que a produção de celulases por fungos filamentosos se dá principalmente nos primeiros dias de cultivo, indicando queda na produção de enzimas após primeiros sete dias, indicando potencial de produção em menor tempo do que 21 dias de cultivo (GORI; MALANA, 2010; SAKTHIVEL *et al.*, 2011; KANWAL MALIK *et al.*, 2010; NAHER *et al.*, 2021). As razões incluem a exaustão de nutrientes e diminuição de metabolismo/reprodução além da produção de possíveis produtos tóxicos para a população fúngica no substrato ao longo dos 21 dias de cultivo.

Enzimas com capacidade de romper ligações do tipo beta 1,4 em celulose são relatadas na literatura inibindo formação de biofilme por bactérias patogênicas, considerando a composição de exopolissacarídeos do biofilme. A literatura demonstra tanto a inibição inicial da formação, como a inibição durante o processo de síntese de biofilme, sendo este um potencial de aplicação para área clínica coadjuvante com outros fatores de inibição (BANAR *et al.*, 2019; KAMALI *et al.*, 2021; NAGRAJ; GOKHALE, 2018).

Estudos demonstraram a ação em conjunto de enzimas celulasas e amilases na degradação de biofilme, indicando uma maior dispersão de células, o que facilita por sua vez a ação de compostos/fatores antibióticos (CRAIGEN; DASHIFF; KADOURI, 2011; KALPANA; AARTHY; PANDIAN, 2012; FLEMING; WATTERS *et al.*, 2016; CHAHIN; RUMBAUGH, 2017).

c.2.3) Peroxidase

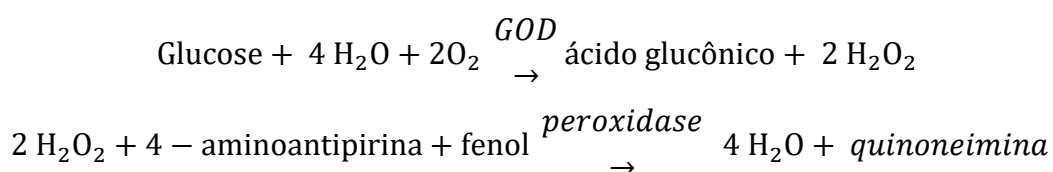
Dentre as enzimas da classe oxirredutoras, temos as peroxidases. As peroxidases (EC 1.11.1.X) decompõe peróxidos (ROOH), oxidando substratos orgânicos e inorgânicos. Peroxidases podem ser classificadas em presença ou ausência de grupo heme (KOUA *et al.*, 2008). Estas são caracterizadas por sua versatilidade catalítica, capacidade de oxidação de diversos compostos, como fenóis, aminas aromáticas entre diversas outras aplicações biotecnológicas a serem citadas (DE OLIVEIRA; SANTOS; BUFFON, 2021; FERNANDES *et al.*, 2020).

Peróxidos tem sido utilizado comercialmente na degradação de corantes e tratamento de efluentes, visando a descontaminação de efluentes com substâncias tóxicas como fenóis, fenóis clorados, pesticidas, surfactantes e metais pesados assim como a remoção de coloração de efluentes. Teles (2020) utilizando a mesma linhagem de fungos obteve a presença de 299 U/mL de peroxidases ativas, valores maiores que os obtidos na fermentação realizada em estado sólido por 21 dias. A obtenção de peroxidases é influenciada pelo pH e temperatura do tampão de extração, sendo as condições ótimas definidas como pH entre 5 e 6 além de temperatura com um espectro maior, entre 15°C e 70°C (MIZOBUTSI *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2012).

A presença de peroxidase indica potencial para aplicação em efluentes, como indicado em publicações anteriores, possibilidade de reduzir turbidez (36%), diminuir produção de lodo (40%), de pigmentação em efluentes (43,9%), diminuição da letalidade (78%) usando como modelo o peixe zebra (*Danio reio*) e aumento da condutividade, pela ação de quebra de ligações em substratos de corantes (KLANOVICZ *et al.*, 2020; MARMITT; PIROTTA; STÜLP, 2010; MARQUES *et al.*, 2017). Sendo, portanto, um grupo de enzimas com potencial aplicação para efluentes, podendo ser obtido de fontes alternativas, como por exemplo de processo fermentativo em estado sólido usando arroz como substrato.

Na área alimentar algumas toxinas produzidas por fungos (micotoxinas) podem oferecer risco à saúde, havendo capacidade carcinogênica. Peroxidases têm sido utilizadas para avaliar a degradação destas toxinas em variados substratos, mimetizando uma contaminação alimentar. A aflatoxina é um exemplo de toxina produzida pelo *Aspergillus flavus* entre outros grupos, com capacidade de interferir no desenvolvimento e atividade fisiológica de humanos e animais (CARVAJAL-MORENO, 2016; KUMAR *et al.*, 2021). Estima-se que mais de 4.5 bilhões de pessoas em países desenvolvidos possuam risco de contato (HAMID *et al.*, 2013). Em 2010, 21,575 casos foram relatados relacionados com contaminação à exposição a toxina, além de 19,455 mortes pelo mundo (JAYASENA *et al.*, 2015). Wang e colaboradores demonstraram que além da degradação da aflatoxina, o resíduo gerado (AFB1-8,9-dihidrodiol) apresenta menor toxicidade no substrato (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011; WANG *et al.*, 2011; LYAGIN; EFREMENKO, 2019).

Por apresentar estabilidade em altas temperaturas as peroxidases tem sido utilizadas como marcadores de processos de aquecimento em alimentos, como no leite por exemplo, onde após os processos de pasteurização a ausência de atividade de peroxidases indica inativação por temperatura, sendo uma forma de controle (MARTINS *et al.*, 2008). Além disso, a peroxidase pode ser utilizada para quantificação de glucose em diferentes matrizes. Esta é feita baseada na reação de oxidação da glucose pela enzima glucose oxidase (GOD) em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, resultando na formação de um complexo vermelho chamado quinoneimina, de acordo com a seguinte equação (2):



A intensidade da cor está relacionada proporcionalmente a quantidade de glucose livre, sendo possível realizar a leitura por absorvância (PEREIRA *et al.*, 2008). Dentre as variadas matrizes se encontra o plasma sanguíneo, havendo relatos de ensaios utilizando peroxidase para detecção e quantificação rápida de glucose em plasma de pacientes com diabetes (LIU *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2022). Tal metodologia pode ser aplicada para quantificação de ácido úrico

e colesterol no plasma, servindo como kit de identificação rápido e específico por ser enzimático (LI *et al.*, 2019).

Outra aplicação biotecnológica demonstrada é a remoção de odores utilizando peroxidases em resíduos de suínos. Dentre estes, três ácidos graxos voláteis (ácido isobutírico, ácido isocapróico e ácido isovalérico), dois compostos fenólicos (fenol e p-cresol) e dois compostos indólicos (indol e skatole). Destes, houve 100% de redução do p-cresol e 54-84% na intensidade do odor (utilizando olfatômetro), 32%-54% de redução de compostos indol e 28-41% da redução de ácidos graxos (YE; ZHU; LI, 2009). Demonstrando diversas formas de aplicações biotecnológicas em áreas diferentes para enzimas do grupo peroxidase.

A enzima lacase e lipase não foram identificadas como ativas na fermentação realizada.

Referências utilizadas no Capítulo II

ADEDEJI OM, A. A. Modification of Cell Wall Degrading Enzymes from Soursop (*Annona muricata*) Fruit Deterioration for Improved Commercial Development of Clarified Soursop Juice (A Review). **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 04, n. 01, p. 178, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000178>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

ADNAN, M.; ISLAM, W.; SHABBIR, A.; KHAN, K. A.; GHRAMH, H. A.; HUANG, Z.; CHEN, H. Y. H.; LU, G. dong. **Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus** *Microbial Pathogenesis* Academic Press, 1 abr. 2019.

AGRAWAL, B. J. Curr Trends Biomedical Eng & Biosci Bio-Stoning of Denim-An Environmental-Friendly Approach. v. 3, 2017. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/abiramprince/effect-of-physical->>. Acesso em: 7 ago. 2022.

AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; GHILAN, A. K. M.; ARASU, M. V.; DURAI PANDIYAN, V.; PONMURUGAN, K. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1226–1232, 1 jan. 2020.

ALAUDDINA, M.; ISLAMA, J.; SHIRAKAWAA, H.; KOSEKIB, T.; ARDIANSYAH; KOMAIA, M. Rice Bran as a Functional Food: An Overview of the Conversion of Rice Bran into a Superfood/Functional Food. **Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization**, 1 mar. 2017. Disponível em: <undefined/state.item.id>. Acesso em: 20 jul. 2022.

ANOOP KUMAR, V.; SURESH CHANDRA KURUP, R.; SNISHAMOL, C.; NAGENDRA PRABHU, G. Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries. *In: Energy, Environment, and Sustainability*. [s.l.] Springer Nature, 2019. p. 323–343.

ARIF, A. B.; SASMITALOKA, K. S.; WINARTI, C.; WAHYUDIONO. Effect of liquefaction time and enzyme addition on liquid sugar production from sweet sorghum starch by enzymatic hydrolysis. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 250, n. 1, p. 012042, 5 abr. 2019. Disponível em: <

1315/250/1/012042>. Acesso em: 8 ago. 2022.

ARTIFON, W.; BONATTO, C.; BORDIN, E. R.; BAZOTI, S. F.; DERVANOSKI, A.; ALVES, S. L.; TREICHEL, H. Bioethanol Production From Hydrolyzed Lignocellulosic After Detoxification Via Adsorption With Activated Carbon and Dried Air Stripping. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 107, 31 jul. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

AZEVEDO, JOÃO LÚCIO DE ; SOARES DE MELO, I. **Ecologia Microbiana**. [s.l: s.n.]488 p.

BANAR, M.; EMANEINI, M.; BEIGVERDI, R.; FANAEI PIRLAR, R.; NODE FARAHANI, N.; VAN LEEUWEN, W. B.; JABALAMELI, F. The efficacy of lyticase and β -glucosidase enzymes on biofilm degradation of *Pseudomonas aeruginosa* strains with different gene profiles. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1662-9>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; CASTILLO, T. E.; MEJÍA, A. Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 3, p. 525–537, 1 jan. 1993.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>>. Acesso em: 25 set. 2022.

BRASIL. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada á Assistência á Saúde. **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, v. 9, p. 1–150, 2013. Disponível em: <https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BROWN, N. A.; RIES, L. N. A.; GOLDMAN, G. H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 48–63, nov. 2014. Disponível em: <<https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.012>>. Acesso em: 25 set. 2022.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and

characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, maio 2012.

CAO, S. G.; CHONG, K. L.; VITTAL, J. J.; SIM, K. Y.; GOH, S. H. Isocalanone, a new pyranocoumarin from *Calophyllum teysmannii* (guttiferae). **Natural Product Letters**, v. 11, n. 3, p. 233–236, 1998.

CARBOUÉ, Q.; CLAEYS-BRUNO, M.; BOMBARDA, I.; SERGENT, M.; JOLAIN, J.; ROUSSOS, S. Experimental design and solid state fermentation: A holistic approach to improve cultural medium for the production of fungal secondary metabolites. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 176, p. 101–107, 15 maio 2018.

CARVAJAL-MORENO, M. Aflatoxins, frequent mutagen and carcinogen of human and animal foods. **Toxicology Letters**, v. 259, p. S139, 10 out. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427416327205>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, n. 4, p. 245–255, 2011.

CRAIGEN, B.; DASHIFF, A.; KADOURI, D. E. The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 21–31, 2011.

DAOUST, J.; CHEN, M.; WANG, M.; WILLIAMS, D. E.; CHAVEZ, M. A. G.; WANG, Y. A.; MERCHANT, C. E.; FONTANA, A.; KIEFFER, T. J.; ANDERSEN, R. J. Sesterterpenoids isolated from a northeastern pacific phorbas sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 17, p. 8267–8273, 6 set. 2013.

DE CARVALHO, L. M. J.; DA SILVA, C. A. B. Clarification of pineapple juice by microfiltration. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 828–832, 2010.

DE OLIVEIRA, F. K.; SANTOS, L. O.; BUFFON, J. G. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. **Food Research International**, v. 143, p. 110266, 1 maio 2021.

DOYLE, J.J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1897.

EKOWATI, H.; ASTUTI, I.; MUSTOFA, M. ANTICANCER ACTIVITY OF CALANONE ON HeLa CELL LINE. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 240–

244, 2010.

ESTEVEES, A. C.; SARAIVA, M.; CORREIA, A.; ALVES, A. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 332–342, 2014.

FASOYIN, O. E.; WANG, B.; QIU, M.; HAN, X.; CHUNG, K. R.; WANG, S. Carbon catabolite repression gene *creA* regulates morphology, aflatoxin biosynthesis and virulence in *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 115, p. 41–51, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184518300677>>. Acesso em: 25 set. 2022.

FERNANDES, M.; SOUZA, D. H.; HENRIQUES, R. O.; ALVES, M. V.; SKORONSKI, E.; JUNIOR, A. F. Obtaining soybean peroxidase from soybean hulls and its application for detoxification of 2,4-dichlorophenol contaminated water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, 1 jun. 2020.

FLEMING, D.; CHAHIN, L.; RUMBAUGH, K. Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AAC.01998-16>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1 set. 1954. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jb/article/753745/A>>. Acesso em: 9 out. 2020.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Degradação de deoxinivalenol (DON) e a atividade da enzima peroxidase durante fermentação submersa. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 198–203, 2011.

GORI, M. I.; MALANA, M. A. Production of Carboxymethyl Cellulase from Local Isolate of *Aspergillus* Species. **Pak. j. life soc. Sci**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2010.

GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 1 jul. 2015.

HAMID, A. S.; TESFAMARIAM, S. G.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z. G. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). **Oncology Letters**, v. 5, n. 4, p. 1087–1092,

2013.

HENRISSAT, B.; VIGNY, B.; BULEON, A.; PEREZ, S. Possible adsorption sites of cellulases on crystalline cellulose. **FEBS Letters**, v. 231, n. 1, p. 177–182, 11 abr. 1988.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

JANG, H. Der; YANG, S. S. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6181–6189, set. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18230414/>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

JAYASENA, D. D.; KIM, H. J.; YONG, H. I.; PARK, S.; KIM, K.; CHOE, W.; JO, C. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. **Food microbiology**, v. 46, p. 51–57, abr. 2015. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 7 ago. 2022.

KALPANA, B. J.; AARTHY, S.; PANDIAN, S. K. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1778–1794, 2012.

KAMALI, E.; JAMALI, A.; IZANLOO, A.; ARDEBILI, A. Emergence of a mupirocin-resistant, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clone associated with skin and soft tissue infections in Greece. **BMC Microbiology**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02411-y>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

KANWAL MALIK, S.; MUKHTAR, H.; FAROOQI, A. A.; AND, I.-U.-H. OPTIMIZATION OF PROCESS PARAMETERS FOR THE BIOSYNTHESIS OF CELLULASES BY *TRICHODERMA VIRIDE*. **Pak. J. Bot.**, v. 42, n. 6, p. 4243–4251, 2010.

KHELIL, O.; CHOUBANE, S.; MAREDJ, K.; MAHIDDINE, F. Z.; HAMOUTA, A. UV mutagenesis for the overproduction of thermoalkali-stable α -amylase from *Bacillus subtilis* TLO3 by fermentation of stale bread: Potential application as detergent additive. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 43, p. 102403, 1 ago. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881812200130X>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

KIM, J. K.; YANG, J.; PARK, S. Y.; YU, J.-H.; KIM, K. H. Cellulase recycling in high-solids enzymatic hydrolysis of pretreated empty fruit bunches. **Biotechnol Biofuels**, v. 12, p. 138, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1476-x>>. Acesso em: 7 ago.

2022.

KLANOVICZ, N.; CAMARGO, A. F.; FÁBIO, ·; STEFANSKI, S.; ZANIVAN, J.; SCAPINI, T.; POLLON, R.; WARKEN, A.; LETÍCIA PALIGA, ·; KARINA, ·; PRECZESKI, P.; ANDERSON, ·; GENRO, A.; RIBEIRO, A.; GARDA-BUFFON, J.; FONGARO, · Gislaine; TREICHEL, H. Advanced oxidation processes applied for color removal of textile effluent using a home-made peroxidase from rice bran. v. 43, p. 261–272, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02222-6>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

KOUA, D.; CERUTTI, L.; FALQUET, L.; SIGRIST, C. J. A.; GORY THEILER, G.; HULO, N.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 261–266, 2008. Disponível em: <<http://peroxibase.isb-sib.ch/peroxiscan.php>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

KOZŁOWSKI, R. M.; RÓŻAŃSKA, W. Enzymatic treatment of natural fibres. *In: Handbook of Natural Fibres*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 227–244.

KUDO, K.; LIU, C.; MATSUMOTO, T.; MINAMI, A.; OZAKI, T.; TOSHIMA, H.; GOMI, K.; OIKAWA, H. Heterologous biosynthesis of fungal indole sesquiterpene sespendole. **ChemBioChem**, v. 19, n. 14, p. 1492–1497, 16 jul. 2018.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. **Microbial cellulases and their industrial applications** *Enzyme Research* 2011.

KUMAR, A.; PATHAK, H.; BHADAURIA, S.; SUDAN, J. Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 17, 15 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

LEBEDEV, A. V.; IVANOVA, M. V.; LEVITSKY, D. O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems. **Life Sciences**, v. 76, n. 8, p. 863–875, 7 jan. 2005.

LEBEDEV, A. V.; IVANOVA, M. V.; LEVITSKY, D. O. Iron Chelators and Free Radical Scavengers in Naturally Occurring Polyhydroxylated 1,4-Naphthoquinones. <https://doi.org/10.1080/03630260701700017>, v. 32, n. 1–2, p. 165–179, jan. 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03630260701700017>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

LI, L. H.; DUTKIEWICZ, E. P.; HUANG, Y. C.; ZHOU, H. B.; HSU, C. C.

Analytical methods for cholesterol quantification *Journal of Food and Drug Analysis* No longer published by Elsevier, 1 abr. 2019.

LI, Y. X.; IWAKI, R.; KATO, A.; JIA, Y. M.; FLEET, G. W. J.; ZHAO, X.; XIAO, M.; YU, C. Y. Fluorinated Radicamine A and B: Synthesis and Glycosidase Inhibition. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2016, n. 7, p. 1429–1438, 1 mar. 2016.

LIU, W.; TIAN, J.; MAO, C.; WANG, Z.; LIU, J.; DAHLGREN, R. A.; ZHANG, L.; WANG, X. Sulfur vacancy promoted peroxidase-like activity of magnetic greigite (Fe₃S₄) for colorimetric detection of serum glucose. *Analytica Chimica Acta*, v. 1127, p. 246–255, 29 ago. 2020.

ŁUBEK-NGUYEN, A.; ZIEMICHÓD, W.; OLECH, M. Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications. *Applied Sciences* **2022**, Vol. 12, Page 3232, v. 12, n. 7, p. 3232, 22 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3232/htm>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

LYAGIN, I.; EFREMENKO, E. **Enzymes for detoxification of various mycotoxins: Origins and mechanisms of catalytic action** *Molecules* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 26 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/13/2362/htm>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STÜLP, S. Photolysis and UV/H₂O₂ treatment of a synthetic effluent containing food dyes. *Quimica Nova*, v. 33, n. 2, p. 384–388, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/qn/a/hjrnFxfjWHdnBZxgMtg7DYTM/?lang=pt>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

MARQUES, C. T.; GOLUNSKI, S. M.; VENTURIN, B.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; BALDISSARELLI, D.; MODKOVSKI, T. A.; PRECZESKI, K. P.; ROSA, C. D.; VARGAS, G. D. L. P.; BUFFON, J. G.; ROSIN, C. K.; ARENZON, A.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Removal of a red dye using noncommercial peroxidase extracted from rice bran. *Environmental Quality Management*, v. 27, n. 2, p. 25–31, 1 dez. 2017.

MARTINHO, V.; DOS SANTOS LIMA, L. M.; BARROS, C. A.; FERRARI, V. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SANTOS, L. A.; DE SOUZA SEBASTIANES, F. L.; LACAVAL, P. T.; DE VASCONCELLOS, S. P. Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. *AMB Express*, v. 9, n. 1, p. 130, 19 dez.

2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0850-1>>. Acesso em: 25 set. 2022.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 295–298, 2008.

MARUYAMA, J. I.; OHNUMA, H.; YOSHIKAWA, A.; KADOKURA, H.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Production and product quality assessment of human hepatitis B virus pre-S2 antigen in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 118–120, 1 jan. 2000.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

MIZOBUTSI, G. P.; FINGER, F. L.; RIBEIRO, R. A.; PUSCHMANN, R.; NEVES, L. L. de M.; DA MOTA, W. F. Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 2, p. 213–217, 2010.

MOREIRA, C. S.; SILVA, A. C. J. A.; NOVAIS, J. S.; SÁ FIGUEIREDO, A. M.; FERREIRA, V. F.; DA ROCHA, D. R.; CASTRO, H. C. Searching for a potential antibacterial lead structure against bacterial biofilms among new naphthoquinone compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 651–662, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13369>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

NAGRAJ, A. K.; GOKHALE, D. Bacterial Biofilm Degradation Using Extracellular Enzymes Produced by *Penicillium janthinellum* EU2D-21 under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 8, p. 687–698, 2018. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/aim>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

NAHER, L.; FATIN, S. N.; SHEIKH, A. H.; AZEEZ, L. A.; SIDDIQUEE, S.; ZAIN, N.; MOHAMMAD, S.; KARIM, R. Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. p. 1–11, 2021.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; MOO YOUNG, M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 80–85, 1 jan. 2006.

NOVAIS, J. S.; MOREIRA, C. S.; SILVA, A. C. J. A.; LOUREIRO, R. S.; SÁ

FIGUEIREDO, A. M.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, H. C.; DA ROCHA, D. R. Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 105–114, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401018300317>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

OLIVEIRA, M. dos S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; DE SOUZA-SOARES, L. A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8335–8338, 1 set. 2011.

PARÉS VIADER, R.; YDE, M. S. H.; HARTVIG, J. W.; PAGENSTECHER, M.; CARLSEN, J. B.; CHRISTENSEN, T. B.; ANDERSEN, M. L. Optimization of Beer Brewing by Monitoring α -Amylase and β -Amylase Activities during Mashing. **Beverages**, v. 7, n. 1, p. 13, 2 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5710/7/1/13/htm>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

PEREIRA, E. I. P.; EMANUELLI, T.; BISOGNIN, D. A.; DE FREITAS, S. T. Otimização e validação de um método enzimático para a determinação de glicose em tubérculos de batata. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 5, p. 1227–1232, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/Gk9LYjJnXtYWYWfFwyFQJSv/?lang=pt>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, set. 2013. Disponível em: <www.studiesinmycology.org>. Acesso em: 13 jul. 2022.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987.

QU, Y.; ZHU, M.; LIU, K.; BAO, X.; LIN, J. Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 11, p. 1235–1240, nov. 2006.

REMPEL, A.; DE SOUZA SOSSELLA, F.; MARGARITES, A. C.; ASTOLFI, A. L.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach.

Bioresource Technology, v. 288, 1 set. 2019.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265–270, 13 mar. 1950. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1950.12017830>>. Acesso em: 14 set. 2020.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284–289, 1 abr. 2001. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000565>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SAKTHIVEL, M.; KARTHIKEYAN, N.; SAKTHIVEL, M.; PALANI, P. Screening, Identifying of Penicillium K-P Strain and Its Cellulase Producing Conditions Antibacterial serine protease from Wrightia tinctoria: Purification and characterization View project Screening, Identifying of Penicillium K-P Strain and Its Cellulase Producing Conditions. **Article in Journal of Ecobiotechnology**, v. 2, p. 2077– 0464, 2011. Disponível em: <<http://journal-ecobiotechnology.com/>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

SANGHVI, G. V.; KOYANI, R. D.; RAJPUT, K. S. Isolation, optimization, and partial purification of amylase from chryso sporium asperatum by submerged fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 470–476, maio 2011.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311–313, jul. 2006.

SHEN, X.; XIA, L. Lactic Acid Production 251 Lactic Acid Production From Cellulosic Material by Synergetic Hydrolysis and Fermentation. **Shen and Xia Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, 2006.

SHIBANO, M.; TSUKAMOTO, D.; MASUDA, A.; TANAKA, Y.; KUSANO, G. Two New Pyrrolidine Alkaloids, Radicamines A and B, as Inhibitors of α -Glucosidase from Lobelia chinensis LOUR. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 10, p. 1362–1365, 2001.

SILVA, T. L.; DA SILVA, J. C. S.; LIMA, D. J. P.; FERREIRA, F. R.; DE VASCONCELOS, C. C.; SANTOS, D. C.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R.; GOULART, M. O. F. Medicinal electrochemistry of halogenated and nitrated pterocarpanquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2438–2451, 2019. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190161>*>. Acesso em: 17 jul. 2022.

SINGH, A.; SHARMA, A.; BANSAL, S.; SHARMA, P. Comparative interaction study of amylase and surfactants for potential detergent formulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 397–401, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732217357379>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

SINGH, G.; GHOSH, A.; PANDEY, P.; KUSHWAHA, A.; KUMAR GAUR, U.; SHARMA, M. Persistent peroxidase-mimic of Ce-MoSe₂ nanosheets: A colorimetric approach for glucose detection in serum samples. **Materials Letters**, v. 317, p. 132084, 15 jun. 2022.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. α -Amylases from microbial sources - An overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. **Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact** *Fungal Biology Reviews* 2007. Disponível em: <www.indexfungorum.org>. Acesso em: 13 jul. 2022.

SU, Y. Y.; QI, Y. L.; CAI, L. **Induction of sporulation in plant pathogenic fungi** *Mycology* set. 2012.

SUGINO, K.; NAKAZAKI, A.; ISOBE, M.; NISHIKAWA, T. Synthetic study on sesquiterpene, an indole sesquiterpene alkaloid: Stereo-controlled synthesis of the sesquiterpene segment bearing all requisite stereogenic centers. **Synlett**, v. 2011, n. 5, p. 647–650, 2011. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0030-1259551>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

TELES, O.; MOSSI, A. J. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PRÉ-GERMINAÇÃO COM ISALODOS FÚNGICOS. p. 2–5, 2020.

THOMSON, R. H. Naphthaquinones. *In: Naturally Occurring Quinones*. [s.l.] Elsevier, 1971. p. 198–366.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; AGNOL, A. D.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; BALDONI, D. B.; BEVILACQUA, C. B.; SEMINOTI JACQUES, R. J.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J. Lipase Production from a Newly Isolated *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Using Canola Cake as Substrate. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 4, 30 nov. 2015.

TSUCHIYA, K.; TAMURA, G.; NAGASHIMA, T.; YAMAMOTO, Y.; GOMI, K.;

KITAMOTO, K.; KUMAGAI, C. High Level Secretion of Calf Chymosin Using a Glucoamylase-prochymosin Fusion Gene in *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 895–899, 1994.

UCHIDA, R.; KIM, Y.-P.; NAMATAME, I.; TOMODA, H.; ŌMURA, S. Suspendole, a New Inhibitor of Lipid Droplet Synthesis in Macrophages, Produced by *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 2, p. 93–97, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ja200613>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

UDDIN, M. G. Effects of biopolishing on the quality of cotton fabrics using acid and neutral cellulases. **Textiles and Clothing Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 9, 20 dez. 2015. Disponível em: <<https://textclothsustain.springeropen.com/articles/10.1186/s40689-015-0009-7>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

VAN DER MAAREL, M. J. E. .; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137–155, 28 mar. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11796168/>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

WAKANA, D.; KAWAHARA, N.; GODA, Y. Two new pyrrolidine alkaloids, codonopsinol C and codonopiloside A, isolated from *codonopsis pilosula*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 12, p. 1315–1317, dez. 2013.

WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 2, p. 164–169, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/314/2/164/578963>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

WANG, W.; LEE, Y.; LEE, T. G.; MUN, B.; GIRI, A. G.; LEE, J.; KIM, H.; HAHN, D.; YANG, I.; CHIN, J.; CHOI, H.; NAM, S. J.; KANG, H. Phorone A and isophorbasone A, sesterterpenoids isolated from the marine sponge *Phorbas* sp. **Organic Letters**, v. 14, n. 17, p. 4486–4489, 7 set. 2012.

WATTERS, C. M.; BURTON, T.; KIRUI, D. K.; MILLENBAUGH, N. J. Infection and Drug Resistance Dovepress enzymatic degradation of in vitro *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S103101>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT

SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. *In: PCR Protocols*. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 315–322.

WIBISONO, L. K.; KIMIA, B.; KEDOKTERAN, F.; INDONESIA, U.; SALEMBA, J.; NO, R. PENGARUH DERIVAT KUMARIN DARI KULIT BATANG *Calophyllum biflorum* TERHADAP PERTUMBUHAN IN VIVO TUMOR KELENJAR SUSU MENCIT C3H. v. 6, n. 1, p. 12–16, 2002.

WILSON, D. B. Cellulases. *In: Encyclopedia of Microbiology*. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 252–258.

YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 148–153, 15 ago. 2009.

YU, X.; HUO, L.; LIU, H.; CHEN, L.; WANG, Y.; ZHU, X. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Microbiological Research**, v. 179, p. 1–11, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501315001123>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

ZANIVAN, J.; BONATTO, C.; SCAPINI, T.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S. F.; JÚNIOR, S. L. A.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Evaluation of Bioethanol Production from a Mixed Fruit Waste by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 1, p. 175–182, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-021-10273-5>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

ZHANG, W.; YAO, H.; YU, J.; ZHANG, Z.; TONG, R. Total Syntheses of Sesterterpenoid Ansellones A and B, and Phorbadiene. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 17, p. 4787–4791, 18 abr. 2017.

ZHANG, Z. Y.; JIN, B.; KELLY, J. M. Mini review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 35, p. 251–263, 1 ago. 2007. Disponível em: <<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-5cc48e76-2fa8-338e-8051-39b5071bba25>>. Acesso em: 7 ago. 2022.

ZHOU, J.; DIAO, X.; WANG, T.; CHEN, G.; LIN, Q.; YANG, X.; XU, J. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0197359, 13 jun. 2018. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0197359>>. Acesso em: 14 set. 2020.

ZHOU, J.; ZHENG, D.-Y.; XU, J. Two new polyketides from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. HQD-6 isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020.2021.1877674>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

- Capítulo III -

Extrato total aplicado em ensaios biológicos: citotoxicidade, virucida, antiviral e bacteriostático

a) Objetivo específico

Avaliar a citotoxicidade, atividade virucida, antiviral e bacteriostática de extratos totais do fungo *N. parvum*.

b) Metodologia

O desenho experimental deste capítulo se apresenta na **Figura 6**.

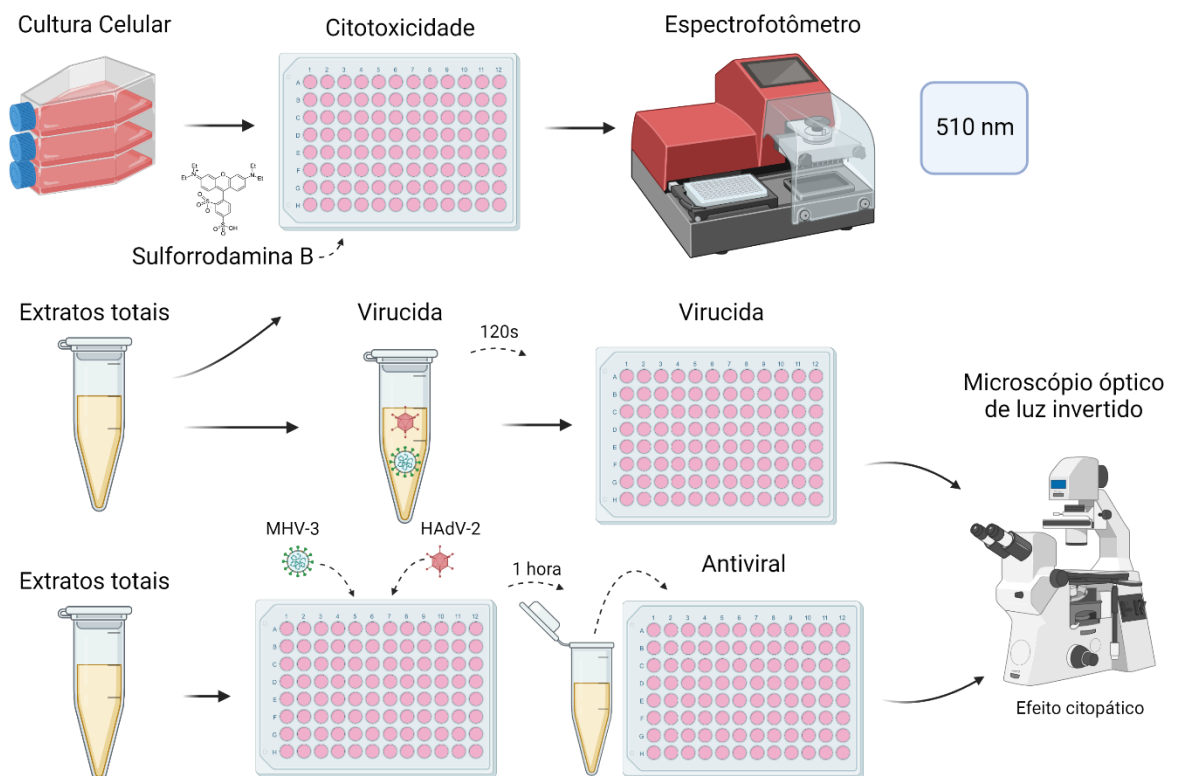


Figura 6: Etapas dos ensaios realizados, na ordem de citotoxicidade nas respectivas linhagens, ensaio virucida com os respectivos vírus e ensaio antiviral com os respectivos vírus. Fonte: Autor, 2022.

b.1) Preparo de extratos totais

O extrato, preparado como descrito no Capítulo II, liofilizado foi solubilizado de forma asséptica em cabine de segurança biológica em dimetilsulfóxido (DMSO) para ensaios

biológicos e preservação da amostra, na concentração de 500 mg/mL e armazenado em -20°C até seu uso.

b.2.1) Culturas celulares

Foram utilizadas as células VERO (ATCC CCL-81™ - fibroblasto de rim de macaco verde da África) sendo utilizada como modelo de linhagem saudável, A549 (ATCC CCL-185™ - câncer de pulmão humano), sendo utilizada como linhagem tumoral e L929 (ATCC CCL-1™ - fibroblasto de rato) sendo utilizada como linhagem saudável. Todas cultivadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. A linhagem VERO foi escolhida baseado em seu modelo em ensaios de citotoxicidade para aferir a toxicidade em células, sendo uma linhagem saudável. A linhagem A549 e L929 foram escolhidas como modelos tumorais e também por serem permissivas ao HAdV-2 e MHV-3 respectivamente (LAMONTAGNE; DUPUY, 1984; SMITH *et al.*, 1986).

b.2.2) Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (Minimal Essential Medium – Eagle) para as linhagens VERO e L929, para A549 utilizou-se DMEM (Dubelco Minimal Essential Medium). Todos suplementados com 10% para manutenção com Soro Fetal Bovino (SFB) para promover o crescimento celular. Para subculturas e experimentos a manutenção das células se deu por uso de agente dissociante, sendo a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução EDTA 1:250, Sigma), com ação proteolítica, realizando quebras em cadeias de peptídeos, resultando no descolamento da monocamada celular.

b.3.1) Origem das cepas virais

Os vírus utilizados foram adenovírus humano – 2 (HAdV-2) e mouse hepatitis vírus (MHV-3) cedidos gentilmente pela Professora Doutora Clarice Weis Arns (UNICAMP) e pela Universidade de Barcelona.

b.3.2) Preparo das suspensões-estoques virais

Suspensões virais obtidas foram inoculadas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo uma monocamada de suas respectivas linhagens celulares, HAdV-2 em A549 e MHV-3 em L929. Meio de cultura foi aspirado e então a monocamada foi lavada 3x com solução de tampão fosfato salino (PBS). Após, o tapete celular foi inoculado com 1 mL de suspensão viral e então incubado à 37°C em estufa por 1 hora para permitir a adsorção e penetração viral. Após esse período foi removido o excesso de suspensão viral por sucção a vácuo e, 10 mL de meio MEM sem SFB foram adicionados e a cultura foi mantida em incubação até o efeito citopático (ECP) ser evidente em todo tapete celular. Após total ECP evidenciado a garrafa foi congelada a -80°C e descongelada a 37°C três vezes para propiciar o rompimento da membrana de células e liberação das partículas virais. A suspensão foi então centrifugada por 10 min a 350 x g em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado em microtubos estéreis e armazenados a -80°C para posterior utilização.

b.3.3) Determinação dos títulos virais

Antes da realização dos ensaios antivirais ou virucidas se determinou a quantidade de partículas infecciosas nas alíquotas. Para tal, HAdV-2 e MHV-3 foram determinados por TCID (Tissue Culture Infectious Dose). Para a determinação de TCID alíquotas com suspensão viral foram diluídas de forma seriada na base 10, onde cada diluição foi inoculada em placas de 24 cavidades contendo monocamada celular permissiva ao vírus e o ECP foi observado após período estipulado para cada vírus (5-7 dias para HAdV-2 e 3-5 dias para MHV-3) em microscópio invertido. Baseado na diluição que se evidenciou o ECP pode-se calcular a quantidade em log de partículas virais na suspensão viral.

b.4) Ensaio de citotoxicidade

Placas de 96 cavidades foram semeadas com $2,5 \times 10^4$ células por cavidade (100 µl) e mantidas 24 horas para aderência em estufa. O ensaio de citotoxicidade utilizando sulforrodamina B avalia a quantidade de morte celular gerada pelo contato com extratos em

comparação com o controle celular pela coloração de proteínas feita pela sulforrodamina na membrana, indicando integridade da membrana celular. Para a realização do ensaio as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, utilizando-se de uma faixa de concentrações de 500, 250, 125 até 1,95 µg/mL.

A fixação e revelação das placas ocorreu após período específico para cada linhagem (48 horas para VERO; 72 horas para L929 e 96 horas para A549). A fixação foi feita utilizando solução de ácido tricloroacético 10% (100 µl) e mantida a 4°C por 1 hora. As cavidades foram então lavadas com água destilada três vezes, coradas então com sulforrodamina B (0,057% p/v) (100µl) por 30 minutos e lavadas posteriormente com ácido acético 1%. Por fim, adicionou-se 100 µl de solução de Tris Base 10 mM (pH 10,5) e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices) a 510 nm (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Os valores de absorbância medidos em cada cavidade com extrato foram transformados em porcentagem de viabilidade celular comparada com o controle celular, na qual se considera 100% de células viáveis, seguido pela fórmula, onde DO = densidade óptica:

$$X\% = \frac{DO (\text{extrato} - \text{teste}) \times 100}{DO (\text{controle celular})}$$

Os percentuais então calculados referentes às variadas concentrações da amostra foram inseridos em gráfico e por análise de regressão linear pode-se calcular o valor de CC₅₀, sendo esta a concentração que reduziu 50% da viabilidade celular. Valores calculados representam a média de três experimentos independentes.

b.5) Ensaio virucida

Para o ensaio virucida foi realizado o protocolo estabelecido na União Europeia para avaliação de inativação de vírus em superfícies usando desinfetantes e antissépticos DIN – EN (EUROPEAN STANDARD) 14476:2015-12 (Deutsches Institut für Normung).

Placas de 96 cavidades das linhagens L929 e A549 foram preparadas como citado em b.4, após 24 horas incubadas o ensaio foi realizado. Para a realização do ensaio o extrato foi diluído para atingir a concentração de 500 µg/mL em microtubos de 2,5 mL contendo solução aquosa e albumina sérica bovina em concentração 0,3g/mL e 3g/mL para mimetizar respectivamente condições limpas e sujas (poucas e muitas partículas interferindo sendo a albumina sérica uma proteína de alto peso molecular) e MEM (2% de soro fetal bovino).

Os vírus utilizados foram diluídos a fim de se obter diferentes logs, seguindo a ordem de 10^6 à 10^2 PFU/mL. Tanto HAdV-2 quanto o MHV-3 foram aplicados em microtubos contendo solução aquosa e albumina sérica e mantidos em contato com o extrato total em concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ por 120 segundos em temperatura ambiente (23°C), sendo então inativados em MEM contendo 2% de soro fetal bovino em gelo e então aplicados 100 μl da solução final em cavidades com monocamada celular. A leitura dos resultados foi realizada após 5 dias no caso de MHV-3 (respectivo ao período máximo para observação do efeito citopático visível) e entre 5-7 dias no caso de HAdV-2 onde se buscou observar ECP por microscópio óptico de luz invertido.

b.6) Ensaio antiviral

Para a realização do ensaio antiviral placas de 96 cavidades com linhagens respectivas para HAdV-2 e MHV-3 foram semeadas como citado em b., seguindo protocolo adaptado de (JEFFERY; PILLAY, 2004). Após 24 horas o ensaio foi realizado onde os respectivos vírus foram diluídos, a fim de se obter 10^6 a 10^2 PFU/mL em cavidades. Os vírus foram inoculados nas cavidades em réplicas e após 1 hora de infecção (que corresponde ao tempo necessário para a visualização do efeito citopático, representando a replicação viral) o meio da célula foi aspirado para remover vírus restantes no sobrenadante e uma solução de MEM com o extrato em uma concentração específica não citotóxica (500 $\mu\text{g/mL}$) foi aplicado nas células e então mantido em estufa a 37°C . Após período de incubação de cada linhagem (VERO, L929 e A549) as placas foram observadas buscando avaliar presença de efeito citopático em microscópio óptico de luz invertido.

b.7) Ensaio bacteriostático

Para a realização do ensaio bacteriostático, placas de 96 cavidades receberam meio líquido Luria Broth (previamente autoclavado a 121°C) para crescimento bacteriano, em quantidade de 192 μl , 8 μl de bactéria *Listeria monocytogenes* e 2 μl de extrato, resultando numa concentração final de 500 $\mu\text{g/mL}$. A placa foi lida em espectrofotômetro a 540 nm a cada hora por 12 horas, a fim de conferir o retardo no crescimento bacteriano, segundo protocolo (BRADY; KATZ, 1991).

Após, as leituras de absorvância foram então se aferiu o crescimento de células bacterianas comparados entre si, onde o controle de bactérias representou 100% contra o tratamento ao longo das horas.

c) Resultados e discussão

c.1) Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade do extrato total em triplicatas estão apresentados na **Tabela 4**. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade demonstraram que nas respectivas linhagens avaliadas, o valor de CC_{50} se apresentou maior que a concentração máxima testada, sendo acima de 500 $\mu\text{g/mL}$ de extrato total.

Tabela 4: apresenta as linhagens celulares avaliadas e o valor de CC_{50} .

Linhagens celulares	A549	L929	VERO
CC_{50}	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Autor, 2022.

c.2) Resultado de ensaios virucida apresentados na **Tabela 7**.

Os resultados do ensaio virucida apresentaram nenhuma inibição da partícula viral na concentração avaliada de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5: apresenta a concentração de extratos, os vírus respectivos utilizados no ensaio virucida assim como a redução em escala logarítmica.

Vírus avaliado	Concentração de extrato	Redução de logs
MHV-3	250 $\mu\text{g/mL}$	0
HAdV-2	250 $\mu\text{g/mL}$	0

Fonte: Autor, 2022.

c.3) Resultados de ensaios antiviral apresentados na **Tabela 6**.

Os resultados do ensaio antiviral apresentaram nenhuma inibição da replicação viral dos modelos avaliados em suas respectivas linhagens, considerando a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6: apresenta a concentração de extrato em ensaio antiviral, os vírus respectivos e a redução em escala logarítmica.

Vírus avaliado	Concentração de extrato	Redução de logs
MHV-3	500 $\mu\text{g/mL}$	0
HAdV-2	500 $\mu\text{g/mL}$	0

Fonte: Autor, 2022.

c.4) Resultados de ensaio bacteriostático contra *L. monocytogenes* apresentados no **Figura 7** e na **Tabela 7**. O ensaio bacteriostático contra *E. coli* (ATCC® 11303™) não apresentou nenhuma redução bacteriana.

Regressão linear controle de *Listeria monocytogenes*

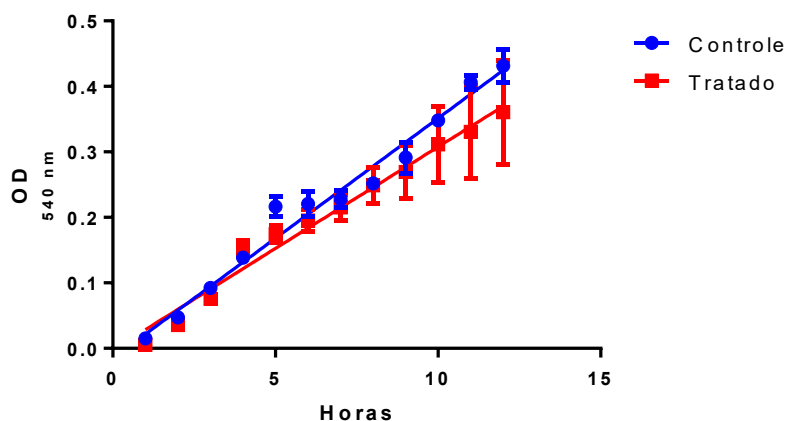


Figura 7: indicando o crescimento de *Listeria monocytogenes* ao longo de 12 horas na presença do extrato total.

Tabela 7: Efeito bacteriostático do extrato contra *L. monocytogenes*.

Tempo	Inibição de crescimento	Média do tratado (OD)	Desvio padrão (OD)
1	62%	0,0056	0,0004
2	24%	0,0358	0,0005
3	17%	0,0757	0,0002
4	-10%	0,1526	0,0124
5	19%	0,1746	0,0137
6	14%	0,1954	0,0170
7	5%	0,2153	0,0197
8	1%	0,2488	0,0274
9	7%	0,2693	0,0403
10	10%	0,3113	0,0581
11	18%	0,3308	0,0713
12	16%	0,3606	0,0792

Tabela 7: redução bacteriana em porcentagem, as quantias em média e o desvio padrão obtido com o grupo tratado após o tratamento por 12 horas. Fonte: Autor, 2022.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade confirmam que o extrato não é tóxico para as linhagens celulares testadas, sendo VERO e L929 as linhagens utilizadas como padrão

celular saudável e A549 linhagem tumoral, até a concentração máxima obtida, sendo esta 500 µg/mL, logo, o valor de CC₅₀ determinado foi acima de 500 µg/mL. Os ensaios realizados buscavam avaliar compostos com atividade biológica frente à bactéria e vírus, para tal se fez necessário determinar a toxicidade deste extrato total em linhagens celulares antes de ademais ensaios.

Desta forma os ensaios a seguir seguiram nas concentrações similares.

Os ensaios virucida e antiviral não apresentaram inibição de efeito citopático em nenhuma diluição viral, demonstrando a não atividade deste extrato para os vírus HAdV-2 e MHV-3. O ensaio virucida avaliou a integridade de partículas virais após o contato com extratos antes que ocorresse o contato com as células, apresentando este, total capacidade replicativa mesmo após tratamento.

O ensaio antiviral avaliou a capacidade replicativa do vírus após sua entrada na célula e então em contato com o extrato, como forma de tratamento terapêutico, demonstrando, portanto, a mesma capacidade replicativa em células mesmo ao receber o extrato.

Os compostos químicos presentes no extrato não foram avaliados anteriormente na literatura contra HAdV-2 e MHV-3, podendo talvez haver atividade contra outros vírus descritos, sendo então, um nicho a ser explorado sobre compostos e atividades virucidas.

O ensaio bacteriostático avaliou o crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* em contato com o extrato ao longo de 12 horas. Pode-se observar redução expressiva durante as primeiras horas de replicação de bactérias em contato com o extrato (**Figura 7** e **Tabela 7**) em contraste com *E. coli*, bactéria gram-positiva que não apresentou nenhuma redução. Nenhum dos compostos mencionados apresenta atividade descrita contra *Listeria monocytogenes*, havendo um relato apenas com baixa inibição (não quantificada) em outras bactérias Gram-positivo (*E. faecalis*) e Gram-negativo (*Pseudomonas adaceae*) (ZHOU; ZHENG; XU, 2022).

O composto -2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona presente no extrato pertence ao grupo das quinonas. As quinonas apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas bactericidas. As quinonas possuem atividade contra enzimas essenciais para a divisão bacteriana, como a enzima DNA girase, presente em plantas e bactérias. Esta enzima pertence ao grupo das topoisomerases e sua atividade consiste em descondensar a dupla fita de DNA para a duplicação do genoma e síntese de proteínas. De forma geral, as naftoquinonas apresentam ligação com a região catalítica N-terminal de uma das duas subunidades (GyrA e

GyrB) sendo esta a região GyrB, que possui sítio ativo para ATPase, necessitando da energia livre da quebra do ATP para realizar um super enovelamento da fita. Por ser uma subunidade específica em procariotos tem sido pesquisada como alvo terapêutico. Outros antibióticos comerciais utilizam a girase como alvo (e.g ciprofloxacina, moxifloxacina), apresentando sucesso na inibição de bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* por exemplo (ARIMONDO, 2007; KHISIMUZI MDLULI; ZHENKUN MA, 2008; DIGHE;KARKARE *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2018; NÖLLMANNCRISONA; COLLET, 2020).

d) Considerações finais do Capítulo III

Os extratos não apresentaram citotoxicidade, indicando possibilidade de uso em altas concentrações para outros ensaios biológicos. Apesar de não demonstrarem atividade antiviral ou virucida, foi promissor no controle de *L. monocytogenes*.

Referências do capítulo III

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Turbidimetric Assay for Tetracyclines in Feeds Using a Microtiter Plate System. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 74, n. 3, p. 465–470, 1 maio 1991. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/74/3/465-470/5687482>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

DIGHE, S. N.; COLLET, T. A. Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112326, 1 ago. 2020.

JEFFERY, K.; PILLAY, D. Diagnostic Approaches. **Principles and Practice of Clinical Virology**, p. 1–21, 21 jul. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0470020970.ch1>>. Acesso em: 8 ago. 2022.

KARKARE, S.; CHUNG, T. T. H.; COLLIN, F.; MITCHENALL, L. A.; MCKAY, A. R.; GREIVE, S. J.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; MAXWELL, A. The Naphthoquinone Diospyrin Is an Inhibitor of DNA Gyrase with a Novel Mechanism of Action * S. 2013.

KHAN, T.; SANKHE, K.; SUVARNA, V.; SHERJE, A.; PATEL, K.; DRAVYAKAR, B. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 923–938, 1 jul. 2018.

KHISIMUZI MDLULI; ZHENKUN MA. Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase as a Target for Drug Discovery. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 159–168, 18 abr. 2008.

LAMONTAGNE, L. M.; DUPUY, J. M. Natural resistance of mice to mouse hepatitis virus type 3 infection is expressed in embryonic fibroblast cells. **Journal of General Virology**, v. 65, n. 7, p. 1165–1171, 1 jul. 1984. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-65-7-1165>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

NÖLLMANN, M.; CRISONA, N. J.; ARIMONDO, P. B. Thirty years of Escherichia coli DNA gyrase: From in vivo function to single-molecule mechanism. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 490–499, 1 abr. 2007.

SMITH, C. D.; CRAFT, D. W.; SHIROMOTO, R. S.; YAN, P. O. Alternative cell line for virus isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 265–268, ago. 1986.

Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.24.2.265-268.1986>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

ZHOU, J.; ZHENG, D.-Y.; XU, J. Two new polyketides from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. HQD-6 isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020.2021.1877674>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

• **O Capítulo I** demonstrou como a bioprospecção de compostos oriundos de fungos endofíticos do mangue se faz rica e compõe um nicho a ser explorado para avaliação de compostos para diversas finalidades biológicas, como atividade bactericida, atividade antiviral e virucida, que até então não foi demonstrada na literatura por tais compostos, além de atividades como antitumoral e antiparasitário.

• **O Capítulo II** apresentou o processo de obtenção de amostras de plantas do manguezal de Itacorubi, Florianópolis – SC para fins de isolamento de fungos endofíticos, sendo aqui estudado o *N. parvum*, capaz de sintetizar 2,2'-Dimetil-3,3'-bi-1,4-naftoquinona, derivado de Radicamina A, Securinol A, Ansellone B, Suspendole, Pestalotiopin B e enzimas ativas (amilase, celulase e peroxidase).

• **O Capítulo III** demonstrou as atividades biológicas do extrato total obtido a partir da fermentação em 21 dias, demonstrando baixa citotoxicidade para células saudáveis (VERO e L929) e tumorais (A549), sem ação em ensaios virucidas e antivirais com modelos MHV-3 e HAdV-2, mas ativo contra *L. monocytogenes*.

5. ESTUDOS FUTUROS

- Prospectar variações de substrato para a fermentação em estado sólido do *N. parvum* para obtenção de biocompostos e enzimas para finalidades farmacológicas, agroindustriais e ambientais.

6. APÊNDICE 1 – MATERIAIS COMPLEMENTARES

6.1 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS


6.1.1 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Archives of Virology (2020) 165:715–718
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04501-9>

BRIEF REPORT



Co-contamination of food products from family farms in an environmental disaster area in Southeast Brazil with pathogenic bacteria and enteric viruses

Sergio Vinicius de Castro Carvalho¹ · Paula Rogovski² · Rafael Dorighello Cadamuro² · Aline Viancelli³ · William Michelin³ · Deyse Almeida dos Reis¹ · Igor Aparecido Santana das Chagas¹ · Regiana Assenço¹ · Maria Célia da Silva Lanna¹ · Helen Treichel⁴ · Gislaïne Fongaro² 

Received: 7 October 2019 / Accepted: 12 November 2019 / Published online: 23 December 2019
 © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

1. Co-contamination of food products from family farms in an environmental disaster area in Southeast Brazil with pathogenic bacteria and enteric viruses.

DE CASTRO CARVALHO, SERGIO VINICIUS; ROGOVSKI, PAULA; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; VIANCELLI, ALINE; MICHELON, WILLIAM; DOS REIS, DEYSE ALMEIDA; SANTANA DAS CHAGAS, IGOR APARECIDO; ASSENÇO, REGIANA; DA SILVA LANNA, MARIA CÉLIA; TREICHEL, HELEN; FONGARO, GISLAÏNE. ARCHIVES OF VIROLOGY

Fator de impacto: 2.506

In the present study, we evaluated the degree of contamination of fresh vegetables, cheeses and jellies from disaster area in Brazil with bacteria and enteric viruses. Food samples (n = 350) were tested for *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., and enteric viruses (rotavirus A (RVA), human adenovirus (HAdV), hepatitis A virus (HAV), and human norovirus (HNoV)). *E. coli* was present in 56% of the samples, *Salmonella* spp. was present in 14% of the samples, *L. monocytogenes* and

Staphylococcus spp. (coagulase-positive) were present in 36% of the samples. The enteric viruses RVA and HAdV were detected in cheeses and vegetables. ARCHIVES OF VIROLOGY, v. 3, p. 122, 2019.

Open Access Communication

Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by *Psychrophilic anaerobic* Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018–2019

by  Doris Sobral Marques Souza^{1,2} ,  Deisi Cristine Tápparo³ ,  Paula Rogovski¹ ,
 Rafael Dorighello Cadamuro¹ ,  Estêvão Brasiliense de Souza¹ ,  Raphael da Silva¹ ,
 Roberto Degenhardt² ,  Juliano De Dea Lindner² ,  Aline Viancelli⁴ ,  William Michelin⁴ ,
 Airtton Kunz⁵ ,  Helen Treichel⁶ ,  Marta Hernández^{7,8} ,  David Rodríguez-Lázaro^{7,*}  and
 Gislaïne Fongaro^{1,*} 

¹ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

² Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

³ UNIOESTE/CCET/PGEAGRI, Western Paraná State University, Cascavel, PR 85819-110, Brazil

⁴ PMPECSA-UnC, University of Contestado, Concórdia, SC 89711-330, Brazil

⁵ Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC 89715-899, Brazil

⁶ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS 99700-970, Brazil

⁷ Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, 47071 Valladolid, Spain

⁸ Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, 09001 Burgos, Spain

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Microorganisms 2020, 8(12), 2045; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122045>

Received: 17 November 2020 / Revised: 9 December 2020 / Accepted: 17 December 2020 / Published: 21 December 2020

(This article belongs to the Special Issue Hepatitis E Virus, an Emergent Foodborne Pathogen? Public Health Implications)

2. Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018-2019

SOUZA, D. S. M.; TÁPPARO, D. C.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; DE SOUZA, E. B.; DA SILVA, R.; DEGENHARDT, R.; LINDNER, J. D.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G.

Fator de impacto: 4.926

Hepatitis E virus (HEV) is an important enteric agent that can circulate in swine; it is excreted in manure, and of zoonotic interest. The present study investigated, by RT-qPCR, the circulation of HEV in swine manure from different types of pig farms (maternity, nursery, and grow-finish farms) in Santa Catarina State, the major pig production area of Brazil, and also evaluated the HEV removal efficiency of psychrophilic anaerobic biodigesters (PABs). While HEV was consistently detected in manure from grow-finish pig farms ($>4 \log_{10}$ HEV genome copies (GC) L⁻¹), the virus was not detected in manure from maternity and nursery farms. These findings suggest a potential high biosafety status during primary-swine production, with a subsequent contamination in grow-finish production. The anaerobic biodigestion process reduced more than 2 log₁₀ HEV GC in the processed swine manure. However, the virus concentration in final effluent remained high, with an average value of 3.85 log₁₀ HEV GC L⁻¹. Consequently, our results demonstrate that PABs can be a robust tool for effective inactivation of HEV, while reinforcing the need for sanitary surveillance and legislation of swine manure-derived biofertilizers, to avoid the spread of zoonotic enteric pathogens such as HEV. *BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING*, v. 1, p. 1-13, 2020.

Bioprocess and Biosystems Engineering (2020) 43:2117–2129
<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02410-9>

CRITICAL REVIEW



A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants

Aline Viancelli¹ · William Michelon¹ · Paula Rogovski² · Rafael Dorighello Cadamuro² · Estêvão Brasiliense de Souza² · Gislaine Fongaro² · Aline Frumi Camargo³ · Fábio Sptiza Stefanski³ · Bruno Venturin^{3,4} · Thamaris Scapini³ · Charline Bonatto^{3,5} · Karina Paula Preczeski³ · Natalia Klanovicz^{3,6} · Débora de Oliveira⁵ · Helen Treichel³

Received: 22 May 2020 / Accepted: 10 July 2020 / Published online: 17 July 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

3. A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants.

VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; DESOUSA, E. B.; FONGARO, G.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F.S.; VENTURIN, B.; SCAPINI, T.; BONATTO, C.; PRECZESKI, K. P.; KLANOVICZ, N.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.
 Fator de impacto: 3.434

Emerging contaminants (ECs) include endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals (lipid regulators, antibiotics, diuretics, non-steroid anti-inflammatory drugs, stimulant drugs, antiseptics, analgesic, beta blockers), detergents, disinfectants, and personal care products. The residues from these compounds have become a concerning because of their bioactive presence on environmental matrices, especially water bodies. The development of technologies, aiming 50 the secure and efficient removal of these compounds from the environment or event to remove them before they achieve the environment, is necessary. In these context, the present review is about promising eco-friendly, low-cost and specially applied, including biological processes using microalgae, bacteria, enzymes produced by fungi, and adsorbent materials such as those recycled from other processes waste. The processes where revised considering the removal mechanism and the efficiency rate. BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, v. 1, p. 1-13, 2020.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

240

Current Genomics, 2020, 21, 240-252

MINI REVIEW ARTICLE

Extremophile Microbial Communities and Enzymes for Bioenergetic Application Based on Multi-Omics Tools

Gislaine Fongaro¹, Guilherme Augusto Maia¹, Paula Rogovski¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Joana Camila Lopes¹, Renato Simões Moreira¹, Aline Frumi Camargo², Thamarys Scapini², Fábio Spitza Stefanski², Charline Bonatto^{2,3}, Doris Sobral Marques Souza¹, Patrícia Hermes Stoco¹, Rubens Tadeu Delgado Duarte¹, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz⁴, Glauber Wagner¹ and Helen Treichel^{2,4}

¹*Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;* ²*Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS, Brazil;* ³*Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;* ⁴*Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil*

4. Extremophile Microbial Communities and Enzymes for Bioenergetic Application Based on Multi-Omics Tools

FONGARO, G; MAIA, G. A.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; LOPES, J. C.; MOREIRA, R. S.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F.S.; BONATTO, C.;

SOUZA, D. S. M.; STOCO, P. H.; DUARTE, R. T. D.; DACRUZ, A. C. C.; WAGNER, G.; TREICHEL, H.

Fator de impacto: 3.528

Genomic and proteomic advances in extremophile microorganism studies are increasingly demonstrating their ability to produce a variety of enzymes capable of converting biomass into bioenergy. Such microorganisms are found in environments with nutritional restrictions, anaerobic environments, high salinity, varying pH conditions and extreme natural environments such as hydrothermal vents, soda lakes, and Antarctic sediments. As extremophile microorganisms and their enzymes are found in widely disparate locations, they generate new possibilities and opportunities to explore biotechnological prospecting, including biofuels (biogas, hydrogen and ethanol) with an aim toward using multi-omics tools that shed light on biotechnological breakthroughs. *CURRENT GENOMICS*, v. 21, p. 240-252, 2020.

Nutritional, Energy and Sanitary Aspects of Swine Manure and Carcass Co-digestion

Deisi Cristina Tápparo^{1,2}, Paula Rogovski³, Rafael Dorighello Cadamuro³, Doris Sobral Marques Souza³, Charline Bonatto^{4,5}, Aline Frumi Camargo⁵, Thamarys Scapini⁵, Fábio Stefanski⁵, André Amaral¹, Airton Kunz², Marta Hernández⁶, Helen Treichel⁵, David Rodríguez-Lázaro^{7} and Gislaine Fongaro^{3*}*

¹ Western Paraná State University - UNIOESTE/CCET/PGEAGRI, Cascavel, Brazil, ² Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Brazil, ³ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil, ⁴ Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ⁵ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, Brazil, ⁶ Laboratory of Molecular Biology and Microbiology, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain, ⁷ Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Burgos, Spain

5. Nutritional, Energy and Sanitary Aspects of Swine Manure and Carcass Co-digestion.

TÁPPARO, DEISI CRISTINA; ROGOVSKI, PAULA; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; MARQUES SOUZA, DORIS SOBRAL; BONATTO, CHARLINE; FRUMI CAMARGO, ALINE; SCAPINI, THAMARYS; STEFANSKI, FÁBIO; AMARAL, ANDRÉ; KUNZ, AIRTON; HERNÁNDEZ, MARTA; TREICHEL, HELEN; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; FONGARO, GISLAINE. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, v. 8, p. 1-13, 2020.

Fator de impacto: 6.064

Renewable energy can assist the management of the effects of population growth and rapid economic development on the sustainability of animal husbandry. The primary aim of renewable energy is to minimize the use of fossil fuels via the creation of environmentally friendly energy products from depleted fossil fuels. Digesters that treat swine manure are extensively used in treatment systems; and inclusion of swine carcasses can increase the organic loading rate (OLR) thereby improving biogas yield and productivity on farms. However, the characteristics of the components including animal residues, proteins, lipids, remains of undigested feed items, antimicrobial drug residues, pathogenic microorganisms and nutrient contents, are complex and diverse. It is therefore necessary to manage the anaerobic process stability and digestate purification for subsequent use as fertilizer. Efficient methane recovery from residues rich in lipids is difficult because such residues are only slowly biodegradable. Pretreatment can promote solubilization of lipids and accelerate anaerobic digestion, and pretreatments can process the swine carcass before its introduction onto biodigesters. This review presents an overview of the anaerobic digestion of swine manure and carcasses. We analyze the characteristics of these residues, and we identify strategies to enhance biogas yield and process stability. We consider energy potential, co-digestion of swine manure and carcasses, physical, chemical, and biological pretreatment of biomass, sanitary aspects of swine manure and co-digestates and their recycling as fertilizers.

Environmental Science and Pollution Research (2021) 28:31653–31658
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13029-y>

RESEARCH ARTICLE



Enteric viruses in lentic and lotic freshwater habitats from Brazil's Midwest and South regions in the Guarani Aquifer area

Rafael Dorighello Cadamuro¹ · Aline Viancelli² · William Michelin² · Tauani Gabriela Fonseca² · Apolline Parise Mass² · Diana Michelle Avalos Krohn² · Nivia Rosana Weber Peter² · Gislaine Fongaro¹

Received: 30 October 2020 / Accepted: 15 February 2021 / Published online: 20 February 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

6. Enteric viruses in lentic and lotic freshwater habitats from Brazils Midwest and South regions in the Guarani Aquifer area.


CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; VIANCELLI, ALINE; MICHELON, WILLIAM; FONSECA, TAUANI GABRIELA; MASS, APOLLINE PARISE; KROHN, DIANA MICHELLE AVALOS; PETER, NIVIA ROSANA WEBER; FONGARO, GISLAINE.

Fator de impacto: 5.053

The present study reports the monitoring of viruses indicating fecal contamination in two distinct regions affected by poor management of wastewater located above the Guarani Aquifer, which is one of the biggest freshwater reservoirs in the world. In the city of Três Lagoas (located in the Midwest region, in the state of Mato Grosso do Sul), water samples were collected from Lagoa Maior, a lake used for recreation, and in Concórdia (located in the South region, in the state of Santa Catarina), from the Queimados River, which crosses the urban area. Four sampling sites were monitored from March to July 2018 in Lagoa Maior, and four sampling sites were monitored along the urban part of the Queimados River area over two periods (rainy and dry). Water samples were analyzed by concentration of Human adenovirus (HAdV), Norovirus (NoV), Rotavirus A (RAV), and Hepatitis A virus (HAV) for the Lagoa Maior samples and RVA, HAV, and Porcine circovirus 2 (PCV2) for the Queimados River samples. All sampling sites presented enteric viruses, demonstrating fecal input and potential contamination of groundwater. Results highlight the need for wastewater management to improve environmental health quality.



SARS-CoV-2 in Human Sewage and River Water from a Remote and Vulnerable Area as a Surveillance Tool in Brazil

Gislaine Fongaro¹ · Paula Rogovski¹ · Beatriz Pereira Savi¹ · Rafael Dorighello Cadamuro¹ · Juliana Virgínia Faria Pereira³ · Iago Hashimoto Sant Anna³ · Ivan Henrique Rodrigues³ · Doris Sobral Marques Souza^{1,2} · Edgard Gregory Torres Saravia³ · David Rodríguez-Lázaro^{4,5}  · Maria Célia da Silva Lanna³

Received: 7 May 2021 / Accepted: 1 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

7. SARS-CoV-2 in Human Sewage and River Water from a Remote and Vulnerable Area as a Surveillance Tool in Brazil.

FONGARO, GISLAINE; ROGOVSKI, PAULA; SAVI, BEATRIZ PEREIRA; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; PEREIRA, JULIANA VIRGÍNIA FARIA; ANNA, IAGO HASHIMOTO SANT; RODRIGUES, IVAN HENRIQUE; SOUZA, DORIS SOBRAL MARQUES; SARAVIA, EDGARD GREGORY TORRES; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; DA SILVA LANNA, MARIA CÉLIA. Food and Environmental Virology, v. 1, p. 1-4, 2021.

Fator de impacto: 4.049

In the present study, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was monitored in environmental samples from rural and vulnerable areas (a presidio, worker accommodation units, and river waters upstream and downstream of a rural community) from Minas Gerais State region, Southern Brazil, in August 2020. The sampling was performed prior to official declaration of the coronavirus disease (COVID-19) cases in those sites. SARS-CoV-2 RNA was detected in the presidio and workers accommodation units (3.0×10^4 virus genome copies (GC)/mL and 4.3×10^4 GC/mL of sewage, respectively). While SARS-CoV-2 was not detected in the river water upstream of the rural community, SARS-CoV-2 RNA was detected in downstream river waters (1.1×10^2 SARS-CoV-2 GC/mL). The results obtained in this study highlight the utility of SARS-CoV-2 monitoring in wastewater and human sewage as a non-

invasive early warning tool to support health surveillance in vulnerable and remote areas, particularly in development countries.

Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators

Paula Rogovski¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Raphael da Silva¹, Estêvão Brasiliense de Souza¹, Charline Bonatto^{2,3}, Aline Viancelli⁴, William Michelon⁴, Elmahdy M. Elmahdy⁵, Helen Treichel³, David Rodríguez-Lázaro^{6,7} and Gislaine Fongaro^{1*}*

¹ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ² Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ³ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul (UFFS), Erechim, Brazil, ⁴ Contested University (PMPECSA), Concórdia, Brazil, ⁵ Laboratory of Environmental Virology, Environmental Research Division, Department of Water Pollution Research, National Research Centre, Giza, Egypt, ⁶ Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Burgos, Spain, ⁷ Centre for Emerging Pathogens and Global Health, Universidad de Burgos, Burgos, Spain

8. Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators.

ROGOVSKI, P; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; SILVA, R.; BRASILIANSE, E.; BONATTO, CHARLINE; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. <https://www.fro-12>, 2021.

Fator de impacto: 6.064

Bacteriophages are bacterial-specific viruses and the most abundant biological form on Earth. Each bacterial species possesses one or multiple bacteriophages and the specificity of infection makes them a promising alternative for bacterial control and environmental safety, as a biotechnological tool against pathogenic bacteria, including those resistant to antibiotics. This application can be either directly into foods and food-related environments as biocontrol agents of biofilm formation. In addition, bacteriophages are used for microbial source-tracking and as fecal indicators. The present review will focus on the uses of bacteriophages like bacterial

control tools, environmental safety indicators as well as on their contribution to bacterial control in human, animal, and environmental health.

Article

Salmonella enterica Serovar Enteritidis Control in Poultry Litter Mediated by Lytic Bacteriophage Isolated from Swine Manure

Paula Rogovski ¹, Raphael da Silva ¹, Rafael Dorighello Cadamuro ¹, Estêvão Brasiliense de Souza ¹, Beatriz Pereira Savi ¹, Aline Viancelli ², William Michelon ², Deisi Cristina Tápparo ³, Helen Treichel ⁴, David Rodríguez-Lazaro ^{5,6,*} and Gislaïne Fongaro ^{1,*}

¹ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; paularogovski@gmail.com (P.R.); rapha.silva1596@gmail.com (R.d.S.); rafaelcada@hotmail.com (R.D.C.); estevaobrasiliense@gmail.com (E.B.d.S.); beasavis2@gmail.com (B.P.S.)

² Research Group on Engineering, Performance and Environmental Quality, Universidade do Contestado (PMPECSA), Concórdia 89711-330, SC, Brazil; alinevortoli@gmail.com (A.V.); william@unc.br (W.M.)

³ Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Western Paraná State University, Cascavel 85819-110, PR, Brazil; deisictapparo@gmail.com

⁴ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 89802-112, RS, Brazil; helentreichel@gmail.com

⁵ Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain

⁶ Research Centre for Emerging Pathogens and Global Health, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain

* Correspondence: drlazaro@ubu.es (D.R.-L.); gislaine.fongaro@ufsc.br (G.F.); Tel.: +34-637-451-110 (D.R.-L.)



Citation: Rogovski, P.; Silva, R.d.; Cadamuro, R.D.; Souza, E.B.d.; Savi, B.P.

9. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Control in Poultry Litter Mediated by Lytic Bacteriophage Isolated from Swine Manure.

ROGOVSKI, PAULA; SILVA, RAPHAEL DA; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; SOUZA, ESTÊVÃO BRASILIENSE DE; SAVI, BEATRIZ PEREIRA; VIANCELLI, ALINE; MICHELON, WILLIAM; TÁPPARO, DEISI CRISTINA; TREICHEL, HELEN; RODRÍGUEZ-LAZARO, DAVID; FONGARO, GISLAINE. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 18, p. 8862-9, 2021.

Fator de impacto: 4.614

We report the use of bacteriophages for control of *Salmonella* Enteritidis in poultry production. Phage was isolated by the double-agar plate assay from agricultural waste samples, and one isolate, named SM1, was selected and propagated for application in poultry litter. Two experimental protocols were tested: single treatment and repeated treatment (re-application of

phage SM1 after 6 h and 12 h). Each treatment cycle involved 25 g of poultry litter placed in plastic boxes and contaminated with 105 Colony Forming Units mL⁻¹ (CFU mL⁻¹) of *S. Enteritidis*, in independent duplicates. The contaminated litter was treated with 106 Plaque Forming Units mL⁻¹ (PFU mL⁻¹) of SM1 phage by dripping. Repeated application of phage SM1 reduced *Salmonella* counts by over 99.9%; the phage persisted in poultry litter for over 35 days. This study illustrates the application of SM1 treatment as a promising technology for bacterial control in production matrices that could allow safe and sustainable use of agricultural waste products as biofertilizers.



Review

Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control

Rafael Dorighello Cadamuro¹, Isabela Maria Agustini da Silveira Bastos¹, Izabella Thais Silva^{1,2}, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz^{1,3}, Diogo Robl¹, Louis Pergaud Sandjo⁴, Sergio Alves, Jr.⁵, Jose M. Lorenzo^{6,7,*}, David Rodríguez-Lázaro⁸, Helen Treichel⁹, Mário Steindel¹ and Gislaine Fongaro^{1,*}

- ¹ Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; rafaelcada@hotmail.com (R.D.C.); isabelamaria646@gmail.com (I.M.A.d.S.B.); izabella.thais@ufsc.br (I.T.S.); ariadne.cruz@ufsc.br (A.C.C.d.C.); diogo.robl@ufsc.br (D.R.); msteindel@gmail.com (M.S.)
- ² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil
- ³ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil
- ⁴ Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; p.l.sandjo@ufsc.br
- ⁵ Laboratory of Biochemistry and Genetics, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89802-112, SC, Brazil; slalvesjr@gmail.com
- ⁶ Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Avd. Galicia n° 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, 32900 Ourense, Spain
- ⁷ Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain
- ⁸ Microbiology Division, Faculty of Sciences, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain; drlazar@ubu.es
- ⁹ Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 99700-000, RS, Brazil; helentreichel@gmail.com
- * Correspondence: jmlorenzo@ceteca.net (J.M.L.); gislainefongaro@gmail.com (G.F.); Tel.: +34-9885-48277 (J.M.L.); +55-49-9825-6993 (G.F.)



Citation: Cadamuro, R.D.; da Silveira Bastos, I.M.A.; Silva, I.T.; da Cruz, A.C.C.; Robl, D.; Sandjo, L.P.; Alves, S., Jr.; Lorenzo, J.M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Treichel, H.; et al. Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. *J. Fungi* **2021**, *7*, 455. <https://doi.org/10.3390/jof7060455>

Academic Editor: Arianna Tavanti

Received: 14 May 2021
Accepted: 3 June 2021
Published: 7 June 2021

Abstract: Mangroves are ecosystems with unique characteristics due to the high salinity and amount of organic matter that house a rich biodiversity. Fungi have aroused much interest as they are an important natural source for the discovery of new bioactive compounds, with potential biotechnological and pharmacological interest. This review aims to highlight endophytic fungi isolated from mangrove plant species and the isolated bioactive compounds and their bioactivity against protozoa, bacteria and pathogenic viruses. Knowledge about this type of ecosystem is of great relevance for its preservation and as a source of new molecules for the control of pathogens that may be of importance for human, animal and environmental health.

Keywords: biotechnology; biodiversity; new drugs; health; pathogen control

10. Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control.

CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; DA SILVEIRA BASTOS, ISABELA MARIA AGUSTINI; SILVA, IZABELLA THAIS; DA CRUZ, ARIADNE CRISTIANE CABRAL; ROBL, DIOGO; SANDJO, LOUIS PERGAUD; ALVES, SERGIO; LORENZO, JOSE M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; TREICHEL, HELEN; STEINDEL, MÁRIO; FONGARO, GISLAINE. JOURNAL OF FUNGI, v. 7, p. 455-1, 2021.

Fator de impacto: 5.724

Mangroves are ecosystems with unique characteristics due to the high salinity and amount of organic matter that house a rich biodiversity. Fungi have aroused much interest as they are an important natural source for the discovery of new bioactive compounds, with potential biotechnological and pharmacological interest. This review aims to highlight endophytic fungi isolated from mangrove plant species and the isolated bioactive compounds and their bioactivity against protozoa, bacteria and pathogenic viruses. Knowledge about this type of ecosystem is of great relevance for its preservation and as a source of new molecules for the control of pathogens that may be of importance for human, animal and environmental health.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymer Technologies and Applications

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/carbohydrate-polymer-technologies-and-applications

Hydrophobic cellulose-based and non-woven fabrics coated with mesoporous TiO₂ and their virucidal properties under indoor light

Darlíane CS Souza^a, Suélen M Amorim^b, Rafael D Cadamuro^c, Gislaine Fongaro^c, Rosely A Peralta^b, Rosane M Peralta^d, Gianluca Li Puma^e, Regina FPM Moreira^{a,*}

^a Laboratory of Energy and Environmental Processes, Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratory of Bioinorganic and Crystallography, Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^c Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^d Department of Biochemistry - State University of Maringá, Maringá - PR, Brazil

^e Environmental Nanocatalysis & Photoreaction Engineering, Department of Chemical Engineering, Loughborough University, Loughborough, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:

Titanium dioxide hydrosol
Human coronavirus and adenovirus
Virucidal effect
Textiles
Nanoparticles
Sol-gel synthesis

ABSTRACT

Antiviral hydrophobic cellulose-based cotton or non-woven fabrics containing mesoporous TiO₂ particles were developed for potential use in healthcare and in other contaminated environments. Hydrosols made with the sol-gel method using two different amounts of the Ti precursor were applied to cotton and non-woven fabrics and their virucidal effect on Murine Coronavirus (MHV-3) and Human Adenovirus (HAdV-5) was evaluated under indoor light irradiation. The results show 90% reduction of HAdV-5 and up to 99% of MHV-3 in non-woven fabric, and 90% reduction of MHV-3 and no reduction of HAdV-5 in cotton fabric. The antiviral activity was related to the properties of the TiO₂ powders and coatings characterized by BET surface area, DRX, DLS, FTIR, DRS, SEM, TEM and water contact angle. The hydrophobic characteristic of the treated fabrics and the high surface area of the TiO₂ particles favor interaction with the virus, especially MHV-3. These results demonstrate that non-woven fabric and cotton, coated with TiO₂, can be highly effective in preventing contamination with MHV-3 and HAdV-5 viruses, particularly for applications in healthcare indoor environments.

11. Hydrophobic cellulose-based and non-woven fabrics coated with mesoporous TiO₂ and their virucidal properties under indoor light.

SOUZA, DARLIANE CS; AMORIM, SUÉLEN M; CADAMURO, RAFAEL D ; FONGARO, GISLAINE; PERALTA, ROSELY A; PERALTA, ROSANE M; PUMA, GIANLUCA LI; MOREIRA, REGINA FPM. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, v. 3, p. 100182, 2022.

Fator de impacto: 5.787

Antiviral hydrophobic cellulose-based cotton or non-woven fabrics containing mesoporous TiO₂ particles were developed for potential use in healthcare and in other contaminated environments. Hydrosols made with the sol-gel method using two different amounts of the Ti precursor were applied to cotton and non-woven fabrics and their virucidal effect on Murine Coronavirus (MHV-3) and Human Adenovirus (HAdV-5) was evaluated under indoor light

irradiation. The results show 90% reduction of HadV-5 and up to 99% of MHV-3 in non-woven fabric, and 90% reduction of MHV-3 and no reduction of HadV-5 in cotton fabric. The antiviral activity was related to the properties of the TiO₂ powders and coatings characterized by BET surface area, DRX, DLS, FTIR, DRS, SEM, TEM and water contact angle. The hydrophobic characteristic of the treated fabrics and the high surface area of the TiO₂ particles favor interaction with the virus, especially MHV-3. These results demonstrate that non-woven fabric and cotton, coated with TiO₂, can be highly effective in preventing contamination with MHV-3 and HadV-5 viruses, particularly for applications in healthcare indoor environments.

Broad Spectrum Algae Compounds Against Viruses

Jacqueline Graff Reis¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Ariadne Cristiane Cabral^{1,2}, Izabella Thaís da Silva^{1,3}, David Rodríguez-Lázaro^{4,5} and Gislaine Fongaro^{1}*

¹ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ² Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ⁴ Microbiology Division, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain, ⁵ Research Centre for Emerging Pathogens and Global Health, University of Burgos, Burgos, Spain

The pharmaceutical industry is currently trying to develop new bioactive compounds to inactivate both enveloped and non-enveloped viruses for therapeutic purposes. Consequently, microalgal and macroalgal bioactive compounds are being explored by pharmaceutical, as well as biotechnology and food industries. In this review, we show how compounds produced by algae include important candidates for viral control applications. We discuss their mechanisms of action and activity against enveloped and non-enveloped viruses, including those causing infections by enteric, parenteral, and respiratory routes. Indeed, algal products have potential in human and animal medicine.

Keywords: virucidal, algae, antiviral, health, mechanisms

12. Broad Spectrum Algae Compounds Against Viruses.

REIS, JACQUELINE GRAFF; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; CABRAL, ARIADNE CRISTIANE; THAÍS DA SILVA, IZABELLA; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; FONGARO, GISLAINE. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 1-8, 2022.

Fator de impacto: 6.064

The pharmaceutical industry is currently trying to develop new bioactive compounds to inactivate both enveloped and non-enveloped viruses for therapeutic purposes. Consequently, microalgal and macroalgal bioactive compounds are being explored by pharmaceutical, as well as biotechnology and food industries. In this review, we show how compounds produced by algae include important candidates for viral control applications. We discuss their mechanisms of action and activity against enveloped and non-enveloped viruses, including those causing infections by enteric, parenteral, and respiratory routes. Indeed, algal products have potential in human and animal medicine.

5.1. CAPÍTULO DE LIVROS

CAPÍTULO 14 188

POTENCIALIDADES BRASILEIRAS NA INTEGRAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA E PRODUÇÃO BIOENERGÉTICA NA VISÃO DE ECONOMIA CIRCULAR

Priscila Mara Knoblauch
 Caroline Dalastra
 Fábio Spitz Stefanski
 Jessica Zanivan
 Natalia Klanovicz
 Simone Kubeneck
 Gilmar Antonio da Rosa
 Paulo Reis
 Aline Frumi Camargo
 Thamarys Scapini
 Charline Bonatto
 Maria Célia da Silva Lanna
 Paula Rogovski
 Rafael Dorighello Cadamuro
 William Michelin
 Aline Viancelli
 Helen Treichel
 Gislaine Fongaro

DOI 10.22533/at.ed.05419180614

1. POTENCIALIDADES BRASILEIRAS NA INTEGRAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA E PRODUÇÃO BIOENERGÉTICA NA VISÃO DE ECONOMIA CIRCULAR

Knoblauch, Priscila Mara; Dalastra, Caroline; Stefanski, Fábio Spitz; Zanivan, Jessica; Klanovicz, Natalia; Kubeneck, Simone; Rosa, Gilmar Antonio da; Reis, Paulo; Camargo, Aline Frumi; Scapini, Thamarys; Bonatto, Charline; Lanna, Maria Célia da Silva; Rogovski, Paula; **Cadamuro, Rafael Dorighello**; Michelin, William; Viancelli, Aline; Treichel, Helen; Fongaro, Gislaine. Inovação, Gestão e Sustentabilidade 2. 1ed.Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, v. 2, p. 188-203.



Publication Date: May 24, 2021

Status: Available

Pages: 463

1

Add to cart

Add to Wishlist

ISBN: 978-1-53619-233-9

Categories: 2021, Books, Business and Economics, Economic Issues, Problems and Perspectives, Economics, Business, & Finance, Nova, Social Sciences, Special Topics



2. Waste valuation for environmental and health improvement on circular economy view.

MICHELON, W.; Viancelli, ALINE; MASS, APOLLINE PARISE; VANIN, D. V. F.; **RAFAEL DORIGHELLO CADAMURO**; ROGOVSKI, P.; CAMARGO, ALINE FRUMI; BONATTO, C.; STEFANSKI, FÁBIO; SCAPINI, T.; FONGARO, G.; TREICHEL, HELEN. Waste valuation for environmental and health improvement on circular economy view. 1ed., 2020, v. , p. 183-.



The Future of Effluent Treatment Plants

Biological Treatment Systems

2021, Pages 33-50



Chapter 3 - Perspectives of biological bacteriophage-based tools for wastewater systems monitoring and sanitary control

Paula Rogovski ^a, Rafael Dorighello Cadamuro ^a, Doris Sobral Marques Souza ^a, Estêvão Brasiliense Souza ^a, Raphael da Silva ^a, Michelly Alves Silva ^a, Aline Viancelli ^b, William Michelon ^b, Aline Frumi Camargo ^c, Charline Bonatto ^c, Fábio Spitza Stenfanski ^c, Thamarys Scapini ^c, David Rodríguez-Lázaro ^d, Helen Treichel ^c, Gislaine Fongaro ^a

3. Perspectives of biological bacteriophage-based tools for wastewater systems monitoring and sanitary control.

ROGOVSKI, PAULA; CADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO; SOUZA, DORIS SOBRAL MARQUES; SOUZA, ESTÊVÃO BRASILIENSE; DA SILVA, RAPHAEL; SILVA, MICHELLY ALVES; VIANCELLI, ALINE; MICHELON, WILLIAM; CAMARGO, ALINE FRUMI; BONATTO, CHARLINE; STENFANSKI, FÁBIO SPITZA; SCAPINI, THAMARYS; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; TREICHEL, HELEN; FONGARO, GISLAINE. The Future of Effluent Treatment Plants. 1ed.: Elsevier, 2021, v. 1, p. 33-50.



Wastewater Treatment

Cutting Edge Molecular Tools, Techniques and Applied Aspects

2021, Pages 253-278



Chapter 12 - Wastewater Treatment for Bioenergy Purposes Using a Metaproteomic Approach

Deisi Cristina Tápparo¹, David Rodríguez-Lázaro², Marta Hernández², Aline Frumi Camargo³, Charline Bonatto^{3, 4}, Guilherme Maia⁵, Paula Rogoviski⁶, Rafael Dorighello Dadamuro⁶, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto⁵, Thamarys Scapini³, Patrícia Hermes Stoco⁵, Glauber Wagner⁵, Airton Kunz^{1, 7}, William Michelon⁸, Aline Viancelli⁸, Helen Treichel³, Gislaïne Fongaro⁶

4. Wastewater Treatment for Bioenergy Purposes Using a Metaproteomic Approach.

TÁPPARO, DEISI CRISTINA; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; HERNÁNDEZ, MARTA; CAMARGO, ALINE FRUMI ; BONATTO, CHARLINE ; MAIA, GUILHERME ; ROGOVISKI, PAULA ; **DADAMURO, RAFAEL DORIGHELLO** ; SORATTO, TATIANY APARECIDA TEIXEIRA ; SCAPINI, THAMARYS ; STOCO, PATRÍCIA HERMES ; WAGNER, GLAUBER ; KUNZ, AIRTON ; MICHELON, WILLIAM ; VIANCELLI, ALINE ; TREICHEL, HELEN ; FONGARO, GISLAINE . IN: GISLAINE FONGARO. (Org.). Wastewater Treatment. 1ed.: Elsevier, 2021, v. , p. 253-278.



New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering

Sustainable Agriculture: Revitalization through Organic Products



2022, Pages 131-158

Chapter 7 - Animal residues use and application for sustainable agriculture on one health approach

Paula Rogovski ^a, Rafael Dorighello Cadamuro ^a, Doris Sobral Marques Souza ^a, Beatriz Pereira Savi ^a,
Maria Tereza Pepe Razzolini ^{b, e}, Marcelo de Souza Lauretto ^{b, d}, Maria Inês Zanoli Sato ^{d, e}, Adelaide
Cássia Nardocci ^{c, e}, Sérgio Luiz Alves Júnior ^f, Helen Treichel ^g, Gislaïne Fongaro ^a

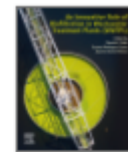
5. Animal residues use and application for sustainable agriculture on one health approach

ROGOVSKI, P.; **Rafael Dorighello Cadamuro**; SOUZA, D. S. M.; SAVI, B. P.;
RAZZOLINI, M. T. P.; LAURETTO, M. S.; SATO, M. I. Z.; NARDOCCI, A. C.; ALVES
JUNIOR, S. L.; TREICHEL, H.; FONGARO, G. Animal residues use and application for
sustainable agriculture on one health approach. 1ed.: 2022, v. , p. 131-158.



An Innovative Role of Biofiltration in Wastewater Treatment Plants (WWTPs)

2022, Pages 267-284



Chapter 14 - Trends in biofiltration applied to remove pharmaceuticals and personal care products from wastewater

Rafael Dorighello Cadamuro ^a, Paula Rogovski ^a, Isabella Dai Prá ^a, Iara Zanella Guterres ^a, Aline Frumi Carmargo ^b, Charline Bonatto ^{b, c}, Thamarys Scapini ^b, Fábio Spitz Stefanski ^b, Tauani Gabriela Fonseca ^c, Apolline Parise Mass ^c, William Michelon ^d, Aline Viancelli ^d, Ariádne Cristiane Cabral da Cruz ^{a, e}, Helen Treichel ^b, Izabella Thaís Silva ^{a, f}, Gislaine Fongaro ^a

6. Trends in biofiltration applied to remove pharmaceuticals and personal care products from wastewater

Rafael Dorighello CADAMURO; ROGOVSKI, PAULA; PRA, I. D.; GUTERRES, I. Z.; CAMARGO, A. F.; BONATTO, C.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F. S.; FONSECAC, T. G.; MASS, APOLLINE PARISE; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; DA CRUZ, ARIADNE CRISTIANE CABRAL; TREICHEL, H.; SILVA, I. T.; FONGARO, G. Trends in biofiltration applied to remove pharmaceuticals and personal care products from wastewater. 1 ed.: 2022, v. , p. 267-284.

5.2. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. Enteric Viruses Detection in Environmental Water From Midwest-Brazil After One Decade Of Attenuated Vaccine Against Rotavirus Introduction.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P. ; SOUSA, E. B. ; SILVA, R. ; BONATTO, CHARLINE ; TREICHEL, HELEN ; FONGARO, GISLAINE ; MACHADO, A. M. . 2019. XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019, Cuiába.

2. BRAZILIAN CATTLE BACTERIOPHAGES ISOLATION

SILVA, R.; ROGOVSKI, P.; **CADAMURO, R. D.**; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.
XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

3. BACTERIOPHAGES ISOLATION AGAINST KLEBSIELLA PNEUMONIAE AND PROTEUS MIRABILIS FOR ENVIRONMENTAL APPLICATION.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; FONGARO, G.
XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

4. VIRUSES AND BACTERIA ADSORPTION FROM SWINE WASTEWATER USING MORINGA OLEIFERA SEED SHELL.

SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; ROGOVSKI, P.; **CADAMURO, R. D.**; SILVA, R.; ALVES, M. S.; FONGARO, G.; LANNA, M. C. S.
XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019, Cuiabá.

5. VIRAL AND BACTERIAL DECAY IN OYSTER TISSUES UNDERGO TO RELAYING POST-HARVEST TREATMENT IN BRAZIL: A PRELIMINARY STUDY.

SOUZA, D. S. M.; SILVA, V. C.; SILVA, M. A.; LANZZARIN, P. K.; DAMO, A. C. M.; ROGOVSKI, P.; **CADAMURO, R. D.**; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; MIOTTO, M.; FONGARO, G.; LINDNER, J. D.
XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

6. VIRALL BRAZIL: BRAZILIAN VIROLOGY NETWORK FOCUSED ON ONE HEALTH APPROACH.

SILVA, R.; PAVI, C. P.; ZUCHI, I. D. P.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; **CADAMURO, R. D.**; ROGOVSKI, P.; GUTERRES, I. Z.; REIS, J. G.; SILVA, V. C.; SILVA, S. S. F.; SOUZA, D. S. M.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.; FONGARO, G.

XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

7. FRESHWATER ENVIRONMENTS ABOVE THE GUARANI AQUIFER.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; FONSECA, T. G.; MASS, A. P.; KROHN, D. M. A.; PETER, N. R. W.; SCHNEIDER, T. M.; FONGARO, G. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

8. SALMONELLA ENTERITIDIS CONTROL IN POULTRY LITTER MEDIATED BY LITIC BACTERIOPHAGE.

ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; **CADAMURO, R. D.**; SOUZA, E. B.; SAVI, B. P.; VIANCELLI, A.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G.

XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

9. REDUÇÃO DE SALMONELLA ENTERITIDIS EM CAMAS DE AVIÁRIO COM USO DE UM BACTERIÓFAGO LÍTICO

Paula Rogovski, Raphael da Silva, **Rafael Dorighello Cadamuro**, Estêvão Brasiliense de Souza, Gislaine Fongaro e Aline Viancelli.

VII Simpósio de Integração das Pós-Graduações do Centro de Ciências Biológicas

10. CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES DE ÁGUA DOCE ACIMA DO AQUÍFERO GUARANI

Rafael Dorighello Cadamuro, Paula Rogovski, Estêvão Brasiliense de Souza, Aline Viancelli, William Michelon e Gislaine Fongaro.

VII Simpósio de Integração das Pós-Graduações do Centro de Ciências Biológicas

11. Surveillance in Sewage of Minas Gerais-Brazil, a Tool to Identification of SARS-CoV-2

Gislaine Fongaro, Paula Rogovski, Beatriz Pereira Savi, **Rafael Dorighello Cadamuro**, Juliana Virgínia Faria Pereira, Iago Hashimoto Sant'Anna, Ivan Henrique Rodrigues, Doris Sobral Marques Souza, Edgard Gregory Torres Saravia, David Rodriguez-Lazaro e Maria Celia da Silva Lanna

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa

12. Use of Moringa oleifera Whole and Fractionated Seed Shells in Swine Effluent Treatment

Estêvão Brasiliense de Souza, Paula Rogovski, **Rafael Dorighello Cadamuro**, Maria Celia da Silva Lanna, Doris Sobral Marques Souza e Gislaine Fongaro.

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa

13. The stability of a Betacoronavirus species in seawater

Doris Sobral Marques Souza, Vilaine Corrêa Da Silva, Mariana Elois, Jacqueline Graff Reis, **Rafael Dorighello Cadamuro**, Marília MIOTTO, Juliano De Dea Lindner e Gislaine Fongaro

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa

5.3. CURSO DE CURTA DURAÇÃO MINISTRADO

1. BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA VIRAL

FONGARO, G.; **CADAMURO, R. D.**; ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ZUCHI, I. D. P. Semana acadêmica da biologia, UFSC (2019)

2. Virologia Aplicada à Saúde Única

CADAMURO, R. D., FONGARO G.; PAVI, C.; PADILHA, D.; SILVA, R.; REIS, JG.; XXI Semana Acadêmica da Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (2021)

5.4. PALESTRA MINISTRADA

1. Virologia Ambiental

Rafael Dorighello Cadamuro

Universidade Federal da Fronteira Sul (2022)

5.5. PRÊMIOS

1. CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES DE ÁGUA DOCE ACIMA DO AQUÍFERO GUARANI

MELHOR APRESENTAÇÃO ORAL (2020)

VII Simpósio de Integração das Pós-Graduações do Centro de Ciências Biológicas – UFSC

5.6. COORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aluna: Lilian Matias Fernandes Stang

Curso: Ciências Biológicas

Instituição: UFSC

1. Avaliação de enterobactérias e mesófilos aeróbios e sua redução após higienização em utensílios de um frigorífico de suínos de Santa Catarina

Resumo: Os ambientes dos frigoríficos apresentam uma grande quantidade de matéria orgânica rica em nutrientes que favorecem no crescimento de microrganismo. A preocupação com a segurança dos alimentos é um desafio, visto que problemas a ela relacionados podem comprometer a saúde do consumidor. A manutenção das condições higiênicas na produção de alimentos é considerada peça chave na obtenção de alimentos seguros. Uma superfície mal higienizada em um ambiente produtivo, somada à capacidade de adesão, pode se tornar um potencial contaminação. O objetivo desse trabalho foi avaliar as enterobactérias e mesófilos aeróbios e a sua redução após higienização nos utensílios e superfícies de um frigorífico de suínos de Santa Catarina. Inicialmente os resultados microbiológicos de coleta de swabs em utensílios e superfícies após a higienização seguindo os padrões das empresas habilitadas à exportação foram analisados. Com base nos conceitos das normativas que falam a respeito das condições sanitárias nos ambientes de produção, assim como a bibliografia existente, foram avaliadas as condições favoráveis à higiene em utensílios e superfícies do processo. Os resultados das avaliações microbiológicas de mesófilos aeróbios mostraram resultados irregulares apenas para serra de carcaça e bandeja, que na qual foram corrigidas com ações corretivas. A aplicação de uma ação corretiva foi favorável nos resultados de análises seguintes para enterobactérias, demonstrando a eficácia do processo de sanitização.

7. APÊNDICE 2 – MATERIAIS COMPLEMENTARES

7.1. ESPECTROS DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS APÓS FERMENTAÇÃO EM 14 E 21 DIAS EM LEITURA POSITIVA E NEGATIVA.

