

Estudo químico e atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico do fungo de solo *Trichoderma* sp FSF12

Chemical study and antibacterial activity of the hydromethanolic extract of soil fungus

Trichoderma sp FSF12

Estudio químico y actividad antibacteriana del extracto hidrometanólico del hongo del suelo

Trichoderma sp FSF12

Recebido: 24/05/2022 | Revisado: 11/06/2022 | Aceito: 12/06/2022 | Publicado: 21/06/2022

Jorgeffson da Silva Cordeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9859-1413>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: jorgeffson@gmail.com

Eduardo Antonio Abreu Pinheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2052-1650>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: toniabreu19@yahoo.com.br

José Edson de Sousa Siqueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1243-0799>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: siqueira.edson@outlook.com

Heriberto Rodrigues Bitencourt

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0003-2876>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: heriberto.ufpa@gmail.com

Patrícia Santana Barbosa Marinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9368-8574>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: pat@ufpa.br

Andrey Moacir do Rosario Marinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8981-0995>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: andrey@ufpa.br

Resumo

A resistência bacteriana aos antibióticos é um sério problema de saúde pública, que podem levar desde a uma simples infecção limitada ou até mesmo a morte. A busca de novos compostos e/ou extratos que podem ajudar a combater essas infecções deve constantemente renovada como estratégia de combater a resistência bacteriana. O objetivo desse trabalho foi obter substâncias bioativas. Assim, o fungo *Trichoderma* sp FSF12 foi inicialmente cultivado em meio cereal (arroz) e após 28 dias de crescimento foi obtido o extrato hidrometanólico. O extrato foi testado através do método de microdiluição em placa de 96 furos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e apresentou boa atividade. Então o extrato hidrometanólico teve seu perfil químico determinado por HPLC-DAD que apontou a presença de substâncias de diferentes classes de metabólitos secundários. O extrato foi fracionado por cromatografia em coluna e levou ao isolamento dos compostos ácido graxo poliinsaturado (1), 5'-inosil (2), tirosol (3), harzialactona A (4) e 2-anidromevalônico (5), que tiveram as suas estruturas determinadas por Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D. Os resultados obtidos mostram a importância de busca de novos agentes antibacterianos.

Palavras-chave: *Trichoderma*; Atividade antimicrobiana; Fungos endofíticos; Substâncias.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics is a serious public health problem, which can lead to a simple limited infection or even death. The search for new compounds and / or extracts that can help fight these infections must be constantly renewed as a strategy to fight bacterial resistance. The objective of this work was to obtain bioactive substances. Thus, the fungus *Trichoderma* sp FSF12 was initially grown in cereal medium (rice) and after 28 days of growth the hydromethanolic extract was obtained. The extract was tested using the 96-well plate microdilution method against Gram-positive and Gram-negative bacteria and showed good activity. Then, the hydromethanolic extract had its chemical profile determined by HPLC-DAD, which indicated the presence of substances from different classes of secondary metabolites. The extract was fractionated by column chromatography and led to the isolation of the

compounds polyunsaturated fatty acid (1), 5'-inosyl (2), tyrosol (3), harzialactone A (4) and 2-anhydromevalonic (5), which had their structures determined by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance. The results obtained show the importance of searching for new antibacterial agents.

Keywords: *Trichoderma*; Antimicrobial activity; Endophytic fungi; Substances.

Resumen

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema grave de salud pública que puede provocar una simple infección limitada o incluso la muerte. La búsqueda de nuevos compuestos y / o extractos que puedan ayudar a combatir estas infecciones debe renovarse constantemente como estrategia para combatir la resistencia bacteriana. El objetivo de este trabajo fue obtener sustancias bioactivas. Así, el hongo *Trichoderma* sp FSF12 se cultivó inicialmente en medio de cereal (arroz) y después de 28 días de crecimiento se obtuvo el extracto hidrometanólico. El extracto se probó utilizando el método de microdilución en placa de 96 orificios contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y mostró buena actividad. Luego, el extracto hidrometanólico tuvo su perfil químico determinado por HPLC-DAD, lo que indicó la presencia de sustancias de diferentes clases de metabolitos secundarios. El extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna y condujo al aislamiento de los compuestos ácido graso poliinsaturado (1), 5'-inosil (2), tirosol (3), harzialactona A (4) y 2-anhidromevalónico (5), que tenían sus estructuras determinada por Resonancia Magnética Nuclear 1D y 2D. Los resultados obtenidos muestran la importancia de buscar nuevos agentes antibacterianos.

Palabras clave: *Trichoderma*; Actividad antimicrobiana; Hongos endofíticos; Sustancias.

1. Introdução

Os fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos, ubíquos e altamente interativos na raiz e no solo, bem como no interior de plantas (Machado et al., 2012). Reproduzem-se assexuadamente, tendo a sua fase teleomófica pertencente ao gênero *Hypocrea*. Embora sejam considerados fungos de vida livre, já há evidências de que espécies de *Trichoderma* podem ser oportunistas, simbiontes avirulentos de plantas, bem como parasitas de outros fungos (Samuels, 2006). São encontrados com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (Harman et al., 2004), sendo algumas espécies cosmopolitas, enquanto outras são limitadas à sua distribuição geográfica (Samuels, 2006).

Trichoderma caracteriza-se pelo crescimento rápido em meio de cultura, com a produção de um micélio aéreo e esparso, com a formação de pústulas conidiogênicas brancas ou verdes (Bisset, 1991). Em geral as fiálides são hialinas e são formadas sobre os conidióforos. Os conídios são geralmente lisos, dificilmente ornamentados, com formato elipsoidal a quase oblongo, sendo raramente globosos. Possuem coloração verde ou hialina, sendo, às vezes, amarelos. Quando presentes, os clamidósporos são tipicamente globosos para subglobosos e são formados dentro ou nas pontas das hifas (Chaverri & Samuels, 2004).

A maioria das cepas de *Trichoderma* pode produzir metabólitos tóxicos, os quais podem ser voláteis e não voláteis (Stoppacher et al., 2011; Siddiquee et al., 2012, Vinale et al., 2008a). Zhang et al. (2014) observaram que compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado T-E5 de *T. harzianum* mostraram significativa atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Em outro estudo, foi observada a inibição do crescimento micelial de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, por meio de compostos não voláteis presentes em filtrados de *Trichoderma* spp. (Zafari et al., 2008).

Já entre os compostos não voláteis os peptaibols, que são uma grande família de peptídeos antibióticos produzidos por fungos de solo, incluindo *Trichoderma* (Daniel & Rodrigues-Filho, 2007). São oligopeptídeos lineares de 7 a 20 aminoácidos, ricos em ácido α -aminoisobutírico, com uma extremidade N-acilo, geralmente acetil e contendo um amino-álcool no C-terminal, tal como fenilalaninol ou leucinol (Wiest et al., 2002).

Além da capacidade de paralisar o crescimento de fitopatógenos, os metabolitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. podem desempenhar um papel na regulação do crescimento de plantas e atuar como elicitores na indução de respostas de defesa da planta (Vinale et al., 2008). O tipo de composto orgânico e as quantidades produzidas podem variar de acordo com a espécie ou isolado (Arjona-Girona et al., 2014).

Como se verificar o gênero *Trichoderma* produz diversos compostos com grande variedade de atividades biológicas, o que pode ajudar na busca de substâncias e/ou extratos com atividade antimicrobiana para o combate a resistência bacteriana aos antibióticos. As taxas de resistência estão aumentando mundialmente, novos mecanismos de resistência estão surgindo e infecções causadas por bactérias multirresistentes estão cada vez mais difíceis de tratar. O arsenal atual de antibióticos está constantemente perdendo a sua eficácia e há poucos sinais de que será devidamente repostos em um futuro próximo (Wright et al., 2014).

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os micro-organismos, mas é acelerado pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de agentes antibacterianos. Cepas resistentes são capazes de se propagar onde há descumprimento de medidas de prevenção e controle de infecções (WHO, 2021).

A introdução dos antibióticos na quimioterapia das infecções bacterianas em meados do século XX revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Esses agentes antimicrobianos podem eliminar as bactérias (atividade bactericida) ou evitar o seu crescimento (atividade bacteriostática) atacando principalmente três alvos básicos dos sistemas bacterianos: biossíntese da parede celular, síntese de proteínas, reparo e replicação do DNA (Walsh, 2000).

Assim, no presente trabalho estamos reportando a obtenção de extrato e constituintes químicos de *Trichoderma* sp FSF12. Os compostos foram isolados através de técnicas de cromatografia e suas estruturas foram determinadas por RMN. O extrato do fungo *Trichoderma* sp FSF12 apresentou boa atividade antimicrobiana.

2. Metodologia

2.1 Procedimentos gerais

Os dados de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Varian Mercury operando a 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C ; CDCl_3 foi usado como solvente e TMS como referência interna. Os espectros de massas foram obtidos usando um espectrômetro de massas de baixa resolução da Waters Acquity TQD, com ionização por electrospray.

2.2 Ensaio de microdiluição em placa de 96 furos

A suscetibilidade dos microrganismos aos compostos foi determinada por ensaio de microdiluição em placa. O extrato e compostos (1 mg cada) foram dissolvidas em 100 μL de dimetilsulfóxido e 900 μL de BHI dando concentração inicial de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os testes foram realizados em placas de 96 poços contendo 100 μL de Mueller Hinton Broth (MHB) de acordo com Pinheiro et al. (2017). Então 100 μL da solução de cada composto foi adicionada a primeira cavidade da placa dando uma concentração inicial de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e em seguida foram feitas diluições sucessivas, sempre tirando 100 μL do poço e adicionado ao poço posterior de modo a obter as concentrações de 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 e 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; posteriormente 5 μL de solução da bactéria de teste a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL foram adicionadas a cada poço da placa seguido por incubação a 37 °C (24h). Os microrganismos testados foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (obtidos do Instituto Evando Chagas Belém - PA, Brasil). A bioatividade foi registrada como ausência de coloração vermelha nos poços após a adição de 10 μL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Penicilina, vancomicina e tetraciclina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada) foram utilizadas como controles positivos; o meio de cultura (apenas MHB) foi usado como controle negativo.

2.3 Cultura de *Trichoderma* sp FSF12 em arroz e isolamento dos constituintes químicos

Inicialmente o fungo *Trichoderma* sp FSF12 foi cultivado em placa de Petri contendo meio BDA (Batata, dextrose, ágar). Então, 10 (dez) frascos de Erlenmeyer (1.000 mL) contendo 200 g de arroz e 100 mL de água destilada, por frasco, foram autoclavados por 45 min a 121 °C (Carvalho et al., 2016). Após, pequenos cubos de meio BDA contendo micélio de *Trichoderma* sp FSF12 de 7 (sete) dias de cultivo em placa de Petri, foram adicionados nos frascos de Erlenmeyer sob condições estéreis. Dois frascos (contendo somente arroz) foram usados como controle. Após 28 dias de crescimento a 25 °C a biomassa obtida foi macerada com uma solução hidrometanólica 3:7 e após três dias foi filtrado (esse procedimento foi repetido três vezes). A solução hidrometanólica obtida foi evaporada sob pressão reduzida produzindo um resíduo amarelado (15,6 g). Por fim, 10 gramas do extrato hidrometanólico foi fracionado sucessivamente por cromatografia em coluna (sílica) eluída com misturas de hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, para o isolamento dos compostos 1-5.

2.4 Análise por HPLC-DAD do extrato

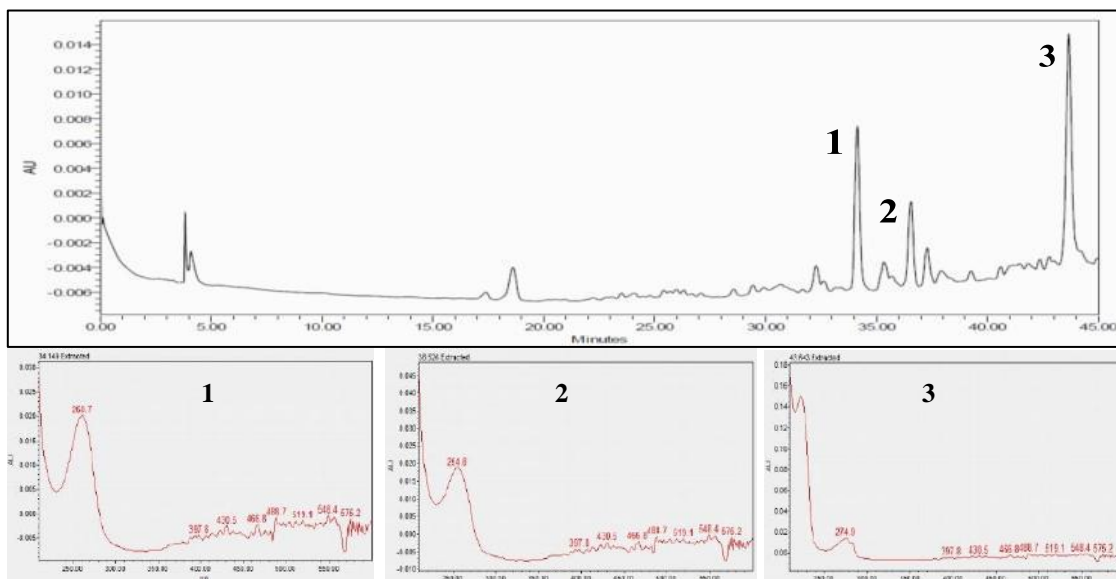
A análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizada em um cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD), o qual coleta dois espectros por segundo na região do ultravioleta e visível, na faixa entre 210 e 600 nm. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 µm. O volume de amostra injetado foi de 20 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A fase móvel constituiu-se de uma mistura de H₂O e MeOH. O gradiente exploratório linear de eluição usado foi de H₂O-MeOH 90:10 a 0:100 em 40 min com mais 5 min mantidos na última concentração. O gradiente foi retornado à concentração inicial em 5 min e mantido por mais 15 min, para o equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 0,5 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos em dois comprimentos de onda 248 nm e 268 nm.

3. Resultados e Discussão

3.1 Determinação das possíveis classes de metabólitos secundários presentes no extrato de *Trichoderma* sp por meio de HPLC - DAD.

A escolha do melhor comprimento de onda para a análise das classes foi realizada através do monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, por meio do sistema de detecção por arranjo de diodos. O comprimento de onda selecionado para as análises foi de 268 nm, o qual obteve-se boa sensibilidade para a maioria das substâncias presentes no extrato. A análise por HPLC-DAD do extrato hidrometanólico de *Trichoderma* sp FSF12 mostrou grande quantidade de constituintes químicos, sendo três majoritários com tempo de retenção entre 34 e 44 minutos de acordo com o cromatograma obtido (Figura 1). No tempo de retenção (t_R) de 43,6 minutos, observou-se as absorções máximas em comprimentos de onda a 224 e 274,9 nm, que é compatível para o composto aromático tirosol (Guimarães et al., 2009). O cromatograma apresenta também um pico com t_R de 34,1 minutos, que no UV apresentou absorção em λ_{max} 260,7 nm, sugerindo a presença de ácidos graxos polinsaturados. Para o t_R 36,5 min foi observado no UV uma absorção λ_{max} 254,8 nm, propondo a presença composto com carbonila α,β -insaturada (Nielsen & Smedsgaar, 2003).

Figura 1. Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato hidrometanólico do fungo *Trichoderma* sp FSF12 em gradiente exploratório em 268 nm.

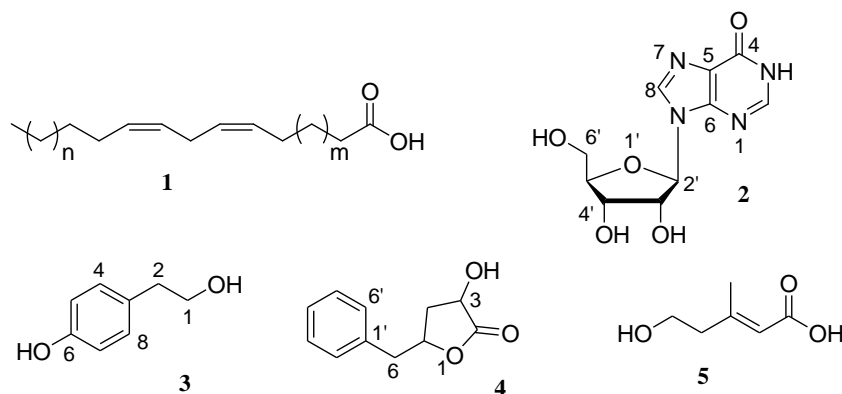


Fonte: Autores.

3.2 Identificação das substâncias isoladas

Os compostos **1-5** isolados do extrato hidrometanólico de *Trichoderma* sp (Figura 2) foram identificados através das análises de seus dados espectrométricos de RMN e EM, além de comparação dos dados reportados na literatura.

Figura 2. Compostos isolados de *Trichoderma* sp.



Fonte: Autores.

O composto **1** apresentou no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de ácidos graxos poliinsaturados. O sinal mais intenso no espectro de RMN de ^1H foi observado em δ 1,25, característicos dos hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica longa, e os sinais em δ 5,35, referente aos hidrogênios olefínicos. Os hidrogênios metílicos são observados em δ 0,86 e os hidrogênios dialílicos e alílicos são observados em δ 2,78 e 2,01, respectivamente. Além disso, observam-se sinais de hidrogênios α e β -carboxílicos em δ 2,34 e 1,63, respectivamente. O padrão espectral apresentado no RMN de ^1H é típico de substância da classe dos ácidos graxos poliinsaturados, o que confirma a informação obtida pela análise de HPLC-DAD do extrato.

A determinação estrutural do composto **2** foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Analisando o espectro de RMN de ^1H , observa-se dois singletos cada um integrando para um hidrogênio, com deslocamentos químicos de δ

8,25 e δ 8,16 os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-2 e H-8, respectivamente. Foi observado, também, um dubleto, em δ 6,00 ($J = 6,0$ Hz) referente ao hidrogênio H2'; o sinal dupleto em δ 4,35 ($J = 4,8$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-3'; um dubleto em δ 4,23, podendo esse ser atribuído ao H-4'. Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H , observa-se um duplo dubleto em δ 3,81 ($J = 2,4$ e 3,9) referente ao hidrogênio H-5' e um dubleto em δ 3,29 referente ao hidrogênio carbínico H-6'. No espectro de RMN de ^{13}C observa-se um sinal de carbono característico de lactama com um deslocamento químico de δ 153,5 o qual foi atribuído ao carbono C-4. Foi observado, também, um sinal de carbono olefínico referentes ao C-8 em δ 141,6. Outros cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (δ 89,3; 86,8; 74,6 e 71,6) e um metilênico com deslocamento de δ 62,5 foram observados, indicando, portanto, a presença de uma unidade de ribose ligada à estrutura. De acordo com essas informações, pode-se concluir que o composto **2** é conhecido na literatura como nucleosídeo 5'-inosil ou inosina (Silva, 2007). Evidências indicam que a inosina apresenta um papel modulatório sobre a inflamação (Rahimian et al., 2010). Muitos outros trabalhos, também, demonstram o efeito anti-inflamatório da inosina e seus análogos como a INO-2002, em modelos de lesão pulmonar aguda (Liaudet et al., 2002; Mabley et al., 2003).

Para o composto **3** a análise do espectro de RMN de ^1H evidenciou dois hidrogênios característicos de anel aromático *para* substituído em δ 7,08 (d, 2H; 8,5 Hz) referente aos hidrogênios H-4 e H-8 e δ 6,68 (d, 2H; 8,5 Hz) referente aos hidrogênios H-5 e H-7, além de dois tripletos ambos integrando para dois hidrogênios em δ 3,67 (t, 2H; 6,6 Hz) e δ 2,70 (t, 2H; 6,6 Hz) de hidrogênios metilênicos H-1 e H-2, respectivamente. O sinal em δ 3,67 é característico de hidrogênio metilênico ligado à hidroxila. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou seis sinais, sendo dois de carbonos metilênicos em δ 63,8 e δ 38,2. O espectro de carbono, também, registrou a presença de quatro sinais de carbonos aromáticos em δ (154,2; 115,4; 130,4; 130,1), os quais foram atribuídos aos carbonos C-6, C-5/7, C-4/8 e C-3, respectivamente, sendo isto uma característica dos sistemas aromáticos *para* substituído, devido à simetria dos núcleos nesse sistema. O sinal em δ 154,2 indica a presença de uma hidroxila liga a carbono aromático. Portanto, pela análise dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura foi possível identificar a estrutura da substância **3** como sendo a do tirosol (Silva 2007). O tirosol demonstra amplo espectro de seus efeitos biológicos nos processos fisiológicos relacionados à saúde e à doença, como antiaterogênico, cardioprotetor, anticâncer, neuroprotetor, antidiabético, anti-obesidade (Markovic et al., 2019)

O espectro de RMN de ^1H do composto **4** mostrou um tripleto em δ 3,99, o qual corresponde ao H-3, bem como dois multipletos em δ 2,36-2,27 e δ 4,92 referentes aos hidrogênios H-4 α , H-4 β e H-5, respectivamente. Foi observado também, um dubleto em δ 2,98 com constante de acoplamento de 6.0 Hz, o qual foi atribuído ao H-6. Os sinais referentes ao anel aromático foram observados como multipletos na região de δ 7,33–7,19. O espectro de RMN de ^{13}C de **4** registrou quatro sinais de carbonos aromáticos δ (135,2; 129,6; 128,9; 127,2), os quais foram atribuídos aos carbonos C-1', C-2'/6', C-3'/5' e C-4', respectivamente, sendo isto uma característica dos sistemas aromáticos *mono*-substituído. Além destes sinais, foi possível observar um sinal com valor de deslocamento em δ 67,0, referente de carbono carbinólico (C-3), sinais em δ 177,1, referentes à carboníla do anel da lactona, também foram identificados sinais em δ 41,1 atribuído ao carbono metilênicos benzílico (C-6) e sinais em δ 34,8 referente ao carbono β -lactâmico (C-4). As correlações observadas em HMBC entre os hidrogênios metilênicos H-4 com o carbono carbonílico da lactona C-2 (δ 177,1) e os carbonos C-3 (δ 67,0), C-5 (δ 78,1) e C-6 (δ 41,1); os hidrogênios benzílicos H-6 (δ 2,98) com o C-4 (δ 34,8); correlações de H-6 com os carbonos aromáticos C1' (δ 135,2) e C2'/6' (δ 129,6), ajudaram a fazer as atribuições dos sinais e determinar a estrutura de **4**. Comparação com dados presente na literatura auxiliaram na identificação da substância **4**, como sendo a harzialactona A. A harzialactona A é um metabólito com potencial aplicação contra leucemia (Chen et al., 2010).

A substância **5** foi identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HETCOR e COSY. A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou dois tripletos acoplado entre si em δ 3,69 e 2,32 com constante de acoplamento de, aproximadamente 6,6 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-5 e H-4, respectivamente. Observou-se, também, dois

singletos: um em δ 5,76 referente ao hidrogênio olefínico H-2 e o outro, em δ 2,10, referente aos hidrogênios metílicos. No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal de carbono característico de carboxila em δ 172,1, o qual foi atribuído ao carbono C-1. Além destes, observou-se, ainda os sinais de carbonos olefínicos C-2 em δ 120,3 e C-3 em δ 152,8, um sinal de carbono carbinólico metilênico C-5 em δ 60,7. Comparação com dados de RMN de ^1H e ^{13}C presentes na literatura (Xu et al., 2011) auxiliaram na identificação da substância **5** como sendo ácido 2-anidromevalônico.

3.3 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico de *Trichoderma* sp FSF12

A resistência aos antimicrobianos sintéticos representa grande desafio no tratamento das infecções. O uso indiscriminado e irregular de antibióticos faz com que as bactérias se adaptem e se multipliquem, aumentando o problema da resistência aos antimicrobianos. Esta situação tem impulsionado a busca de novas formas terapêuticas mais eficientes e menos agressivas ao organismo humano. Os produtos naturais representam uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre serviram de protótipo para o descobrimento de novos fármacos, pelas propriedades encontradas em seus constituintes químicos (Silva et al., 2007). A análise de amostras de extratos biológicos é um modo rápido para se identificar compostos com atividade inibitória. Dessa forma, o extrato do fungo *Trichoderma* sp FSF12 foi testado contra Bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os resultados das CIM para esses micro-organismos teste variaram entre 7,81 - 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Inicialmente o extrato de *Trichoderma* sp foi testado contra cepas de bactérias patogênicas e de acordo com a classificação de Aligiannis e colaboradores (2001) sobre os valores de CIM o extrato mostrou bons resultados. Seguindo esta classificação, o extrato é inibidor potente frente à bactéria Gram positiva *B. subtilis* CIM = 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para bactéria *E. coli*, FSF12 (CIM = 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e frente à bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* apresentou CIM = 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Bom base nesses resultados o extrato foi fracionado em busca dos componentes ativos do extrato. Os compostos **1** – **5** apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura e podem ser os responsáveis pela atividade observada para o extrato.

4. Conclusão

O extrato metanólico do fungo de solo *Trichoderma* sp. FSF12 apresentou boa atividade antimicrobiana e seu perfil químico foi traçado por HPLC-DAD e mostrou a presença de compostos de diferentes classes de metabólitos secundários. Em seguida, o fungo foi cultivado em meio sólido (arroz) com quantidade suficiente para o isolamento de metabólitos secundários do extrato ativo através de técnicas de cromatografia, que levou ao isolamento de 5 substâncias como o ácido graxo poliinsaturado (**1**), 5'-inosil (**2**), tirosol (**3**), harzialactona A (**4**) e 2-anidromevalônico (**5**) identificados por RMN e EM. Esse trabalho mostra a importância do estudo de fungos na busca de compostos bioativos, o que abre a oportunidade de se encontrar compostos que possam vir a ser novos medicamentos.

Agradecimentos

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (FAPESPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo.

Referências

- Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 4168-4170.
- Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M., & Lópezherrerá, C. J. (2014). Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 385-397.

- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. E., & Condón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249260.
- Bisset, J. A. (1991). Revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69, 11, 2357-2372.
- Carvalho, J. M., Paixão, L. K. O., Dolabela, M. F., Marinho, P. S. B., & Marinho, A. M. R. (2016). Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). *Acta Amazonica*, 46(1), 69–72.
- Chaverri, P., Samuels, G. J. (2004). *Hypocrea / Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48, 1-116.
- Chen, B., Yin, H.-F., Wang, Z.-S., & Xu, J.-H. (2010). New synthesis of harzialactone A via kinetic resolution using recombinant *Fusarium proliferatum* lactonase. *Tetrahedron Asymmetry*, 21, 237-240.
- Daniel, J. F. S., & Rodrigues-Filho, E. (2007). Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports*, 24(5), 1128-1141.
- Guimarães, D. O., Borges, K. B., Bonato, P. S., & PUPO, M. T. (2009). A Simple Method for the Quantitative Analysis of Tyrosol by HPLC in Liquid Czapek Cultures from Endophytic Fungi. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(1), 188-194.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
- Keszler, Á., Forgács, E., & Kótai, L. (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 421-424.
- Liaudet, L., Mabley, J. G., Pacher, P., Virag, L., Soriano, F. G., Marton, A., Hasko, G., Deitch, E. A., & Szabo, C. (2002). Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Annals of Surgery*, 235(4), 568-578.
- Mabley, J. G., Pacher, P., Liaudet, L., Soriano, F. G., Hasko, G., Marton, A., Szabo, C., & Salzman, L. A. (2003). Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(1), 138-144.
- Machado, D. F. M., Parzianello, F. R., Silva, A. C. F., & Antonioli, Z. I. (2012). *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35(1), 26: 274-288.
- Markovic, A. K., Toric, J., Barbaric, M., & Brala, C. J. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* 24, 2001.
- Nielsen, K. F., & Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002, 111-136.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2021.
- Pinhero, E. A. A., Pina, J. R., Feitosa, A. O., Carvalho, J. M., Borges, F. C., Marinho, P. S. B., & Marinho, A. M. R. (2017). Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. *Revista Argentina de Microbiologia*, 49(1), 3-6.
- Rahimian, R., Fakhfour, G., Daneshmand, A., Mohammadi, H., Bahremand, A., Rasouli, M. R., Mousavizadeh, K., & Dehpour, A. R. (2010). Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 376-381.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
- Siddiquee, S., Cheong, B. E., Taslima, K., Kausar, H., & Hasan, M. M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of chromatographic science*, 50(4), 358-367.
- Silva, J. G., Souza, I. A., Higino, J. S., Siqueira-Jr, J. P., Pereira, J. V., & Pereira, M. S. V. (2007). Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4), 572-577.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2011). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1), 80-86.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406, 775-781.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B. W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbola, D. J., Bodo, B., & Kenerley, C. (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20862-20868.
- Wright, P. M., Seiple, I. B., & Myers, A. G. (2014). The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 8840–8869.
- Xu, J., Aly, H. A., Wray, V., & Proksch, P. (2011). Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron*, 52, 21-25.
- Zafari, D., Koushki, M. M., & Bazgir, E. (2008). Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3653-3659.
- Zhang, F., Yang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS Microbiology Letters*, 359, 116–123.