



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO METABOLÔMICO DE *Penicillium* sp. POR MEIO DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO E REDES
MOLECULARES

ELDRINEI GOMES PERES
MESTRADO

Manaus/AM
Janeiro/2022

ELDRINEI GOMES PERES

ESTUDO METABOLÔMICO DE *Penicillium* sp. POR MEIO DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO E REDES
MOLECULARES

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Amazonas, exigida
para o título de mestre em Química com ênfase
na Linha de Pesquisa de Química de Produtos
Naturais e Biomoléculas.

PROF. DR. HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN
ORIENTADOR

PROF. DR. EMMANOEL VILAÇA COSTA
CO-ORIENTADOR

Manaus/AM
Janeiro/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P437e Peres, Eldrinei Gomes
Estudo metabolômico de *Penicillium* sp. por meio de espectrometria de massas de alta resolução e redes moleculares / Eldrinei Gomes Peres . 2022
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Coorientador: Emmanoel Vilaça Costa
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Penicillium* sp.. 2. Osmac. 3. Espectrometria de massas. 4. redes moleculares. I. Koolen, Hector Henrique Ferreira. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Estudo Metabolômico de *Penicillium sp.* por meio de Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Redes Moleculares

ELDRINEI GOMES PERES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre(a) em Química.

Aprovada em, 28 de janeiro de 2022.

Documento assinado digitalmente
 HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN
Data: 03/02/2022 12:17:49-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientador

Documento assinado digitalmente
 ALISSON MEZA NOVAIS
Data: 03/02/2022 09:58:34-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

ALISSON MEZA NOVAIS (PPGQ/UFAM)
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 LÍVIA SOMAN DE MEDEIROS
Data: 01/02/2022 15:18:50-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

LÍVIA SOMAN DE MEDEIROS (UNIFESP)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 28 de janeiro de 2022.

**Dedico à toda minha família como
forma de agradecimento por todo
incentivo, apoio e amor.**

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, meu Deus, pelo cuidado, proteção diária e pelas oportunidades concedidas até aqui. À Ele toda honra e glória.

À CAPES, pelo apoio financeiro. À UFAM e PPGQ pela oportunidade e suporte. À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), onde passei a maior parte do mestrado e desenvolvi meu trabalho.

À banca examinadora.

Ao meu orientador, Professor Dr. Hector Koolen, pela oportunidade, acolhimento, conversas e conselhos. Em nossos encontros presenciais ou virtuais, sempre tirei algo de motivação e aprendizado.

Aos professores Felipe Moura e Emmanoel Vilaça, meu co-orientador.

À Professora Dra. Livia Soman de Medeiros pela colaboração e realização dos experimentos de LC-MS.

Ao doutorando Thiago Souza pela colaboração para obtenção dos mutantes.

À minha querida professora de graduação, Dra. Klenicy Yamaguchi, pelo cuidado e apoio, mesmo de longe. Como sempre digo, serei eternamente grato!

À minha enorme e amada família. Aos meus pais, Sebastião e Izonilde, pelos ensinamentos e princípios repassados. Aos meus irmãos, Equiane, Elke, Everton, Evila, Eldriane, Eldrisson, Eldrilene, Elton e Evisson, por todo apoio e alegrias compartilhadas durante toda minha vida. Aos meus sobrinhos, cunhados e cunhadas.

À minha esposa e companheira, Edriely Vilela, pelo apoio incondicional, cuidados e amor. À toda família Vilela de Oliveira, em especial aos meus sogros, José e Nilça, pelo acolhimento e por sempre me tratarem como filho.

Aos meus amigos e irmãos, José Renato, Francisco, Sandro, Fernando, Eliana, Nickson, Marcos, Ananias Facundes e Ananias Santos.

Aos meus amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA, pelos ensinamentos e conversas. Em especial, Carlos Vinícius, Gleucinei, Brenda e Debora.

Às minhas amigas de mestrado, Claudia e Sarah, pelo acolhimento, apoio, risadas, dias de estudos e, principalmente, pelo respeito. Vocês são especiais.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

**“Quanto mais aumenta nosso
conhecimento, mais evidente fica
nossa ignorância.” John F.
Kennedy**

RESUMO

A metabolômica é uma ferramenta com aplicações variadas e de grande importância na exploração e descoberta de novos compostos bioativos de origem natural, utilizando técnicas analíticas avançadas e quimioinformática. Por meio da mesma, compostos com aplicações biotecnológicas diversas foram identificados e isolados de diferentes organismos. Entre os principais produtores de compostos bioativos, destacam-se as plantas e os microrganismos. Entre os últimos, os fungos apresentam-se como produtores de metabólitos com diversas atividades biológicas com grande importância econômica. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo utilizar abordagem metabolômica através da espectrometria de massas e redes moleculares para uma caracterização compreensiva dos metabólitos secundários de *Penicillium* sp. MMSRG-058 e linhagens mutantes de interesse biotecnológico. Para obtenção dos extratos de *Penicillium* sp., foram realizados cultivos fermentativos pelo método OSMAC, utilizando quatro meios de cultivo distintos (BDL, ISP2, CZAPECK e Carne2), em diferentes condições, estático e agitado. Foram utilizados tanto a fração líquida quanto o micélio utilizando como solventes extratores acetato de etila e metanol. Os extratos foram analisados por meio de HPLC-HRMS/MS e redes moleculares. A análise tanto das redes como a interpretação manual dos espectros de MS/MS permitiu a identificação de mais de 30 moléculas, sendo a maioria pertencente à classe dos policetídeos, especificamente, às azafilonas, dentre elas a esclerotioramina, isocromofilona I, II, VI e IX, esclerotiorina e ocrefilona. A produção das diversas moléculas nos diferentes meios e condições, apresentou uma significativa diferença, com presença de moléculas distintas ou mesmo, especificidade em alguns casos. Nos dados de HPLC-HRMS/MS da linhagem mutante de *Penicillium* sp., houve a ausência de todos os policetídeos produzidos pela linhagem selvagem, tendo sido detectado apenas um meroterpenoide denominado de atlantinona A como íon majoritário. Esta mesma molécula foi encontrada em pequena quantidade em apenas três meios de cultivo da linhagem selvagem. Uma quantidade significativa de metabólitos ainda precisa ser identificada, evidenciando a capacidade metabólica de *Penicillium* sp., em diferentes condições. O estudo por meio da abordagem metabolômica envolvendo técnicas analíticas e redes moleculares possibilitou a caracterização metabólica do fungo explorado, bem como a anotação de moléculas de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: *Penicillium* sp., OSMAC, Espectrometria de Massas, Redes Moleculares.

ABSTRACT

Metabolomics is a tool with varied applications and of great importance in screening and discovery of new bioactive compounds of natural origin, using advanced analytical techniques and chemoinformatics. By means of metabolomics, compounds with diverse biotechnological applications were identified and isolated from different organisms. Among the main sources of bioactive compounds, plants and microorganisms stand out. Among the latter, fungi present themselves as sources of metabolites with different biological activities with great economic importance. In this sense, this work aimed to use a metabolomics approach through mass spectrometry and molecular networks for a comprehensive characterization of the secondary metabolites of *Penicillium* sp. MMSRG-058 and mutant strains of biotechnological interest. To obtain the *Penicillium* sp., fermentation cultures were carried out by the OSMAC method, using four different culture media (BDL, ISP2, CZAPECK and Carne2), under different conditions, such as static and agitated. Both, the liquid fraction and the mycelium were used, using ethyl acetate and methanol as extracting solvents. Extracts were analyzed using HPLC-HRMS/MS and molecular networks. The analysis of both the networks and the manual interpretation of the MS/MS spectra allowed the identification of more than 30 molecules, most of which as part of polyketides class, specifically azaphilones, among them sclerotioramine, isochromophilone I, II, VI and IX, sclerotiorine and ocrephillone. The production of different molecules in different media and conditions showed a significant difference, with the presence of distinct molecules or even specificity in some cases. In the HPLC-HRMS/MS data of the mutant strains of *Penicillium* sp., all the polyketides produced by the wild strain were absent, with the exception of the meroterpenoid atlantinone A as the major ion. This same molecule was found in small amounts in only three culture media of the wild strain. A significant number of metabolites still lacks of identification, evidencing the metabolic capacity of *Penicillium* sp., under different conditions. The study using the metabolomics approach involving analytical techniques and molecular networks allowed the metabolic characterization of the fungus explored, as well as the annotation of molecules of biotechnological interest.

Keywords: *Penicillium* sp., OSMAC, Mass Spectrometry, Molecular Networking.

LISTA DE ABREVIACÕES

μL - Microlitro

ACN - Acetonitrila

AcOEt - Acetato de Etila

BDA - Batata Dextrose Ágar

BDL - Batata Dextrose Líquido

Cos - Cosseno

Da - Dalton

ESI - *Electrospray Ionization*

eV - Elétron-Volt

GC-MS - *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

GNPS - *Global Natural Product Social Molecular Networking*

HPLC-HRMS - *High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*

HR-PKS - *Highly Reducing Polyketide Synthase*

ISP2 - *International Streptomyces Project*

LA - Líquido Agitado

LC-MS - *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

LE - Líquido Estático

m/z - Razão massa/carga

MA - Micélio Agitado

ME - Micélio Estático

MeOH - Metanol

mM - Milimolar

MS - *Mass Spectrometry*

MS/MS ou MS^2 - Espectrometria de Massas Sequencial

nM - Nanomolar

NR-PKS - *Non-Reducing Polyketide Synthase*

OSMAC - *One Strain Many Compounds*

PKS - *Polyketide Synthase*

ppm - Partes por milhão

QTOF - *Quadrupole Time-of-Flight*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

rpm - rotação por minuto

RT - *Retention Time*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Penicillium</i> sp. MMSRG-058 e <i>Penicillium chrysogenum</i>	19
Figura 2. Produtos naturais recentemente aprovados	22
Figura 3. Metabólitos fúngicos com atividades biológicas	25
Figura 4. Moléculas bioativas de fungos endofíticos	27
Figura 5. Exemplos de espécies de <i>Penicillium</i> produtoras de compostos bioativos	30
Figura 6. Moléculas identificadas por estudos metabolômicos	33
Figura 7. Redes moleculares baseadas em dados de LC-MS/MS de <i>Penicillium canescens</i>	34
Figura 8. Redes moleculares baseadas em dados de LC-MS/MS de <i>Penicillium ubiquetum</i>	34
Figura 9. Perfil cromatográfico dos meios de cultivo	41
Figura 10. Representação das moléculas anotadas nos meios de cultivo	54
Figura 11. Estrutura geral das azafilonas	57
Figura 12. Espectro de MS e MS/MS de esclerotioramina	59
Figura 13. Proposta de mecanismo de fragmentação de esclerotioramina	59
Figura 14. Espectro de MS e MS/MS de isocromofilona VI	60
Figura 15. Proposta de mecanismo de fragmentação de isocromofilona VI	61
Figura 16. Espectro de MS e MS/MS de geumsanol A	62
Figura 17. Proposta de mecanismo de fragmentação de geumsanol A	62
Figura 18. Espectro de MS e MS/MS de isocromofilona IX	63
Figura 19. Proposta de mecanismo de fragmentação de isocromofilona IX	64
Figura 20. Espectro de MS e MS/MS de ocrefilona	65
Figura 21. Proposta de mecanismo de fragmentação de ocrefilona	66
Figura 22. Espectro de MS e MS/MS de isocromofilona II	67
Figura 23. Proposta de mecanismo de fragmentação de isocromofilona II	67
Figura 24. Espectro de MS e MS/MS de esclerotiorina	68
Figura 25. Espectro de MS e MS/MS de atlantinona A	69
Figura 26. Proposta de mecanismo de fragmentação de atlantinona A	70
Figura 27. Estrutura geral das azafilonas anotadas	70
Figura 28. Espectro de MS e MS/MS do composto 123	71
Figura 29. Espectro de MS e MS/MS do composto 140	72

Figura 30. Espectro de MS e MS/MS do composto 166	72
Figura 31. Espectro de MS e MS/MS do composto 102	73
Figura 32. Espectro de MS e MS/MS do composto 113	74
Figura 33. Espectro de MS e MS/MS do composto 120	74
Figura 34. Espectro de MS e MS/MS do composto 132	75
Figura 35. Espectro de MS e MS/MS do composto 135	75
Figura 36. Espectro de MS e MS/MS do composto 105	76
Figura 37. Espectro de MS e MS/MS do composto 108	77
Figura 38. Espectro de MS e MS/MS do composto 199	77
Figura 39. Espectro de MS e MS/MS de isorotiorina	78
Figura 40. Espectro de MS e MS/MS de 5-cloroisorotiorina	78
Figura 41. Espectro de MS e MS/MS de isocromofilona I	79
Figura 42. Espectro de MS e MS/MS do composto 110	80
Figura 43. Espectro de MS e MS/MS de penazafilona F	80
Figura 44. Espectro de MS e MS/MS de penazafilona A	81
Figura 45. Espectro de MS e MS/MS do composto 52	82
Figura 46. Espectro de MS e MS/MS de geumsanol B	82
Figura 47. Espectro de MS e MS/MS do composto 183	83
Figura 48. Espectro de MS e MS/MS do composto 216	83
Figura 49. Espectro de MS e MS/MS do composto 70	84
Figura 50. Espectro de MS e MS/MS do composto 185	84
Figura 51. Espectro de MS e MS/MS do composto 21	85
Figura 52. Espectro de MS e MS/MS de geumsanol C	86
Figura 53. Espectro de MS e MS/MS do composto 90	86
Figura 54. Espectro de MS e MS/MS de 7-deacetylisocromofilona VI	87
Figura 55. Espectro de MS e MS/MS de dechloroisocromofilona III	87
Figura 56. Espectro de MS e MS/MS do composto 177	88
Figura 57. Rede molecular geral contendo os grupos anotados	89
Figura 58. Grupo A. Azafilonas nitrogenadas com/sem cloro	90
Figura 59. Grupo B. Azafilonas oxigenadas com/sem cloro	91
Figura 60. Grupo C-F	92

Figura 61. Característica fenotípica da linhagem selvagem de <i>Penicillium</i> sp. MMSRG-058 e das linhagens mutantes	94
Figura 62. Perfil cromatográfico da linhagem selvagem em comparação com as duas linhagens mutantes	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Biodiversidade Brasileira e a Amazônia	19
3.2 Microrganismos e sua importância biotecnológica	20
3.3 Fungos como fonte de substâncias bioativas	23
3.4 Gênero <i>Penicillium</i>	28
3.5 Estudos metabolômicos de <i>Penicillium</i>	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Obtenção da linhagem fúngica	35
4.2 Cultivo do fungo e produção de extratos	35
4.2.1 Meios de cultura utilizados	35
4.2.2 Produção de extratos	36
4.3 Obtenção das linhagens mutantes.....	36
4.3.1 Cultivo e produção de extratos das linhagens mutantes.....	36
4.4 Análise por Espectrometria de Massas (MS)	37
4.5 Construção de redes moleculares e análise usando o GNPS	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Comparação entre os meios de cultivo e perfil cromatográfico	39
5.2 Análise metabolômica comparativa preliminar	42
5.3 Anotação espectral manual	57
5.4 Análise metabólica das linhagens mutantes	94
6. CONCLUSÃO	96
7. REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país altamente diversificado, seja em questões sociais, econômicas e/ou culturais. Além disso, possui lugar de destaque a nível global quando o tema é diversidade de organismos vivos. O Brasil é também um país de enorme extensão territorial, ocupando quase metade da América do Sul, e assim envolvendo diversas zonas climáticas e ecossistemas. Tais características possibilitam variações ecológicas importantes, favorecendo a formação de diferentes biomas como a Amazônia, que compreende a maior floresta tropical úmida do mundo. A variedade de biomas atribui ao Brasil a maior biodiversidade do planeta, compreendendo 20% do número total de espécies da Terra correspondendo a 1,8 milhão de espécies, além disso, possui o maior sistema fluvial do planeta. Cada bioma apresenta características ecológicas e funções evolutivas distintas (MMA, 2016).

Ainda mencionando a Amazônia, esta que é o maior bioma brasileiro, ocupa 49,3% do território nacional (IBGE, 2019) e, por sua grande diversidade de organismos, desempenhou um grande papel na biodiversidade neotropical, influenciando a construção biótica de outros biomas (ANTONELLI et al., 2018). Essa riqueza de organismos como plantas e microrganismos, além da importância biológica, foi, e segue sendo uma fonte para a descoberta de substâncias químicas com potenciais biológicos. Dentre estes seres, os microrganismos apresentam-se como uma fonte diversa de metabólitos bioativos com aplicação na indústria farmacêutica. Estes organismos são responsáveis pela biossíntese de compostos bioativos com diferentes finalidades: antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da mobilidade gástrica, fármacos hipocolesterolêmicos, inseticidas, herbicidas, antiparasitários entre outras (DEMAIN & SANCHEZ, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2020).

Em especial, os fungos foram alvos das primeiras descobertas que conduziram a fármacos de origem natural comercializados em larga escala, como o caso do antibiótico penicilina, isolado inicialmente de *Penicillium chrysogenum*. Este exemplo de sucesso inicial impulsionou diversos estudos posteriores com diversos outros microrganismos, o que possibilitou a descoberta e obtenção de novos fármacos (BUTLER et al., 2014; DEMAIN, 2014; KATZ & BALTZ, 2016; NEWMAN & CRAGG, 2016). Mesmo após a descoberta da penicilina, fungos do gênero *Penicillium* continuaram a ser estudados quanto à sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas

prejudiciais, agentes antifúngicos, imunossupressores e agentes redutores do colesterol (EL HAJJ ASSAF et al., 2020). Para tal, ao longo das últimas décadas, estudos com fungos deste gênero utilizaram diversas abordagens experimentais, e diversas delas acompanharam a evolução instrumental, bem como do processamento de dados, sempre com o intuito de descobrir novas substâncias bioativas, dentre elas, aquelas envolvendo metabolômica.

A metabolômica é o estudo aprofundado do metaboloma (conjunto de pequenas moléculas) de um organismo através do uso de técnicas analíticas diversas. Estudos como estes buscam conhecer a composição química de diferentes organismos e assim obter conhecimento sobre alguma problemática biológica. Dentre as técnicas utilizadas em metabolômica, duas ganham destaque, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) e espectrometria de massas (MS do inglês *Mass Spectrometry*) (BELINATO et al., 2019; SEGERS et al., 2019; YI et al., 2016).

Diante disso, o trabalho justifica-se pela necessidade de maior exploração da biodiversidade amazônica, através do estudo de microrganismos capazes de produzir substâncias benéficas ao ser humano, de forma a contribuir para qualidade e expectativa de vida. Mesmo com todo seu potencial, pouco se sabe sobre a composição da maioria dos organismos que compõem a Amazônia. No entanto, a atividade antropológica vem ameaçando a sobrevivência de espécies de organismos vivos, ocasionando uma desordem no meio natural, dada a importância e função de cada organismo no meio em que vive. Apesar disso, as pesquisas envolvendo microrganismos vêm crescendo ano a ano, e a procura por produtos oriundos de fontes naturais com aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola, é cada vez maior.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi utilizar a abordagem metabolômica através da espectrometria de massas e redes moleculares para realizar uma caracterização compreensiva dos metabólitos secundários de *Penicillium* sp. e linhagens mutantes de interesse biotecnológico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes fontes de carbono e sua influência sobre policetídeos das classes das azafilonas.
- Caracterizar possíveis novos metabólitos por meio da análise aprofundada dos dados de redes moleculares.
- Avaliar desvios metabólitos entre a linhagem selvagem e mutantes obtidos a partir da deleção de genes responsáveis pela expressão de policetídeo sintases selecionadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiversidade Brasileira e a Amazônia

A biodiversidade brasileira é representada por mais de 104.546 espécies animais e 43.893 espécies vegetais conhecidas (MMA, 2016). Dados atuais da Flora do Brasil (2020), apontam 49.993 espécies reconhecidas para a flora brasileira, incluindo plantas nativas, cultivadas e naturalizadas. As florestas de clima tropical, como a Amazônia, possuem 45% da cobertura florestal mundial que tem extensão de 4,06 bilhões de hectares (FAO, 2020). A Floresta Amazônica se destaca como o maior ecossistema tropical remanescente do mundo e possui cerca de 12.000 espécies de árvores (TER STEEGE et al., 2019). Com sua exuberante flora e fauna, assumiu grande importância para a diversidade de organismos e evolução das espécies, dentre elas, os microrganismos.

Há estimativa da existência de pelo menos 2,2-3,8 milhões de espécies de fungos na Terra, das quais apenas cerca de 10% foram isolados e descritos (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017). No Brasil, a última estimativa datada de 2010 indica que na época existiam 14.923 espécies de fungos (FORZZA et al., 2010). Destas, 5.719 espécies foram catalogadas, distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões, predominando os Basidiomycota (2.741 espécies, em 22 ordens) e Ascomycota (1.881 espécies, em 41 ordens). Na Amazônia, foram registradas 1.050 espécies (MAIA et al., 2015). Um exemplo de gênero de fungo encontrado na Amazônia e em outras partes do mundo é o gênero *Penicillium*. Na **Figura 1**, podem ser vistos dois exemplares deste gênero.

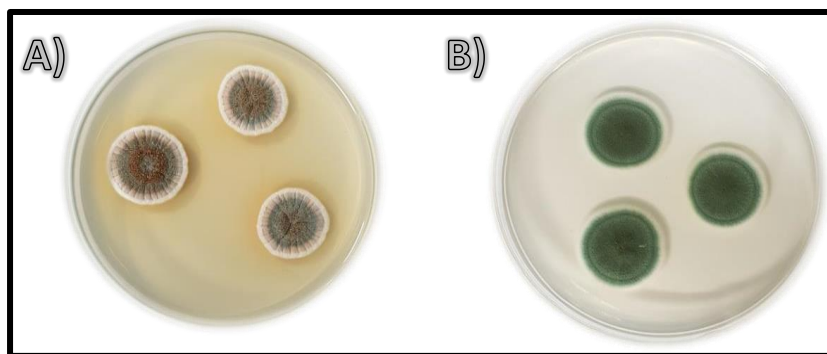


Figura 1. *Penicillium* sp. MMSRG-058 (A). *Penicillium chrysogenum* (B). **Fonte:** HHF. KOOLEN.

A conservação da biodiversidade mundial é primordial para a manutenção da vida e assume papel importante como fonte de produtos que auxiliam a humanidade. A depender do ambiente, o número de organismos e a disponibilidade de recursos podem

variar. Ambientes tropicais oferecem grande riqueza de compostos com potencial bioativo que podem ser usados como modelos para química medicinal e propiciar a descoberta de drogas (BOLZANI et al., 2012). Entre esses organismos com grande capacidade biossintética e metabólica estão os microrganismos, utilizados na produção de alimentos e medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas e não infecciosas existentes e emergentes, entre outras aplicações.

3.2 Microrganismos e sua importância biotecnológica

Atualmente, a importância dos microrganismos como fonte de produtos químicos e bioquímicos, é amplamente difundida no meio científico (IOCA et al., 2014). Desde as décadas de 1940 e 1950, com a advento, respectivamente, da penicilina e estreptomicina, os produtos oriundos de fontes naturais contribuíram de forma expressiva para a expansão e consolidação da medicina e agricultura (BUTLER et al., 2014; DEMAIN, 2014; KATZ & BALTZ, 2016; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Representando as bactérias, o filo Actinobacteria é uma fonte rica de metabólitos com grande bioatividade (ZHANG et al., 2018). Em especial, o gênero *Streptomyces* é um destaque como exemplo da capacidade biossintética e metabólica desses microrganismos. Actinobactérias são responsáveis pela produção de um número bastante significativo de compostos bioativos destinados à área médica, veterinária e agrícola. Tais compostos são antibióticos, antitumorais, anti-helmínticos, imunossupressores e antivirais (NEWMAN & CRAGG, 2016; NIU et al., 2017; YIN et al., 2017). Por outro lado, os metabólitos de origem fúngica têm despertado grande interesse de exploração biotecnológica e, ainda que menos aplicados que as moléculas de actinobactérias, vêm sendo utilizados em diversas áreas, incluindo química, agroquímica, farmacêutica, alimentícia, entre outras (MEDEIROS, 2014; ZAIN et al., 2014).

Dos mais diversos produtos terapêuticos aprovados entre 1981 a 2010, 29% foram de origem natural. Os avanços no tratamento de doenças como o câncer e infecções causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus, com produtos oriundos de fontes naturais também foram expressivos. Exemplo disso é o número desses produtos aprovados para o tratamento do câncer (48,6%) e infecções (33,7%), evidenciando o grande potencial de fontes naturais na oferta de produtos com aplicações específicas (NEWMAN & CRAGG, 2012). Dados atualizados (de janeiro de 1981 a setembro de 2019) publicados em 2020

apontam a importância de moléculas e esqueletos moleculares naturais na elaboração de medicamentos para o tratamento de inúmeras doenças. Nesse período, dos 1881 medicamentos aprovados, 67,6% são macromoléculas biológicas e moléculas pequenas de origem natural, derivados de produtos naturais com modificações sintéticas e mimetizadores de produtos naturais. Agentes terapêuticos de origem natural ou baseados em produtos naturais foram 94 (58%) de 162 agentes antibacterianos aprovados; 7 (20,6%) de 34 agentes antifúngicos aprovados; 98 (42,7%) de 185 agentes antivirais aprovados; 12 (60%) de 20 agentes antiparasitários aprovados; 208 (84,2%) de 247 agentes anticâncer aprovados; 59 (93,6%) de 63 agentes antidiabéticos aprovados; 11 (84,6%) de 13 agentes contra esclerose múltipla aprovados e, 17 (89,5%) de 19 agentes antiglaucoma aprovados (NEWMAN & CRAGG, 2020).

Alguns exemplos de fármacos de origem microbiana aprovados ou em fase de testes estão apresentados na **Figura 2**. Entre os agentes antibacterianos, a fidaxomicina (1) foi aprovada em 2011, produzida pelo actinomiceto *Dactilopora aurantiacum* subespécie *hamdenesis* (BAKTASH et al., 2018; NEWMAN & CRAGG, 2020). Foram aprovados, recentemente, três agentes semissintéticos a base de tetraciclina: omadaciclina (2), eravaciclina (3) e sareciclina (4) e ainda, a lefamulina (5), um derivado do produto natural fúngico original pleuromutilina (NEWMAN & CRAGG, 2020). Entre os antifúngicos, a enfumafungina (6) foi isolada do fungo *Hormonema carpetanum* e levou ao semissintético ibrexafungerp (7), ambos estão em fase de ensaios (KUHNERT et al., 2018; NEWMAN & CRAGG, 2020; PELÁEZ et al., 2000); como antiparasitário, além da ivermectina já existente, foi aprovado em 2018 um agente semissintético para uso em humanos, a moxidectina (8), derivada do produto natural nemadectina, pertencente à classe das milbemicinas, produzidas por espécies de *Streptomyces* (LI et al., 2019; NEWMAN & CRAGG, 2020); um exemplo de fármaco antitumoral é o semissintético midostaurina (9), aprovado em 2017, derivado do produto natural estaurosporina, biossintetizada pela bactéria *Streptomyces staurosporeus* (LAZARUS & MILLER, 2016; NEWMAN & CRAGG, 2020); aprovado em 2010, o fingolimode (10) é um exemplo de agente contra esclerose múltipla, derivado da miriocina, um produto natural biossintetizado pelo fungo ascomiceto *Isaria sinclairii* (NEWMAN & CRAGG, 2020; PORTACCIO, 2011).

A preocupação no combate a doenças cardiovasculares levou à confirmação de que a inibição na síntese contínua de colesterol era uma das formas para redução do nível de

colesterol plasmático (GRAVES & MILLER, 2003). A enzima HMG-CoA redutase (ou 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase) é a enzima responsável pela síntese de colesterol, sendo as estatinas, metabólitos isolados de fungos, as principais classes de inibidores dessa enzima (HYDE et al., 2019). A lovastatina foi o primeiro medicamento aprovado dessa classe, isolada de *Aspergillus terreus* (JAHROMI et. al., 2012), evidenciando a ampla aplicabilidade dos microrganismos e a importância dos fungos como fonte de moléculas bioativas.

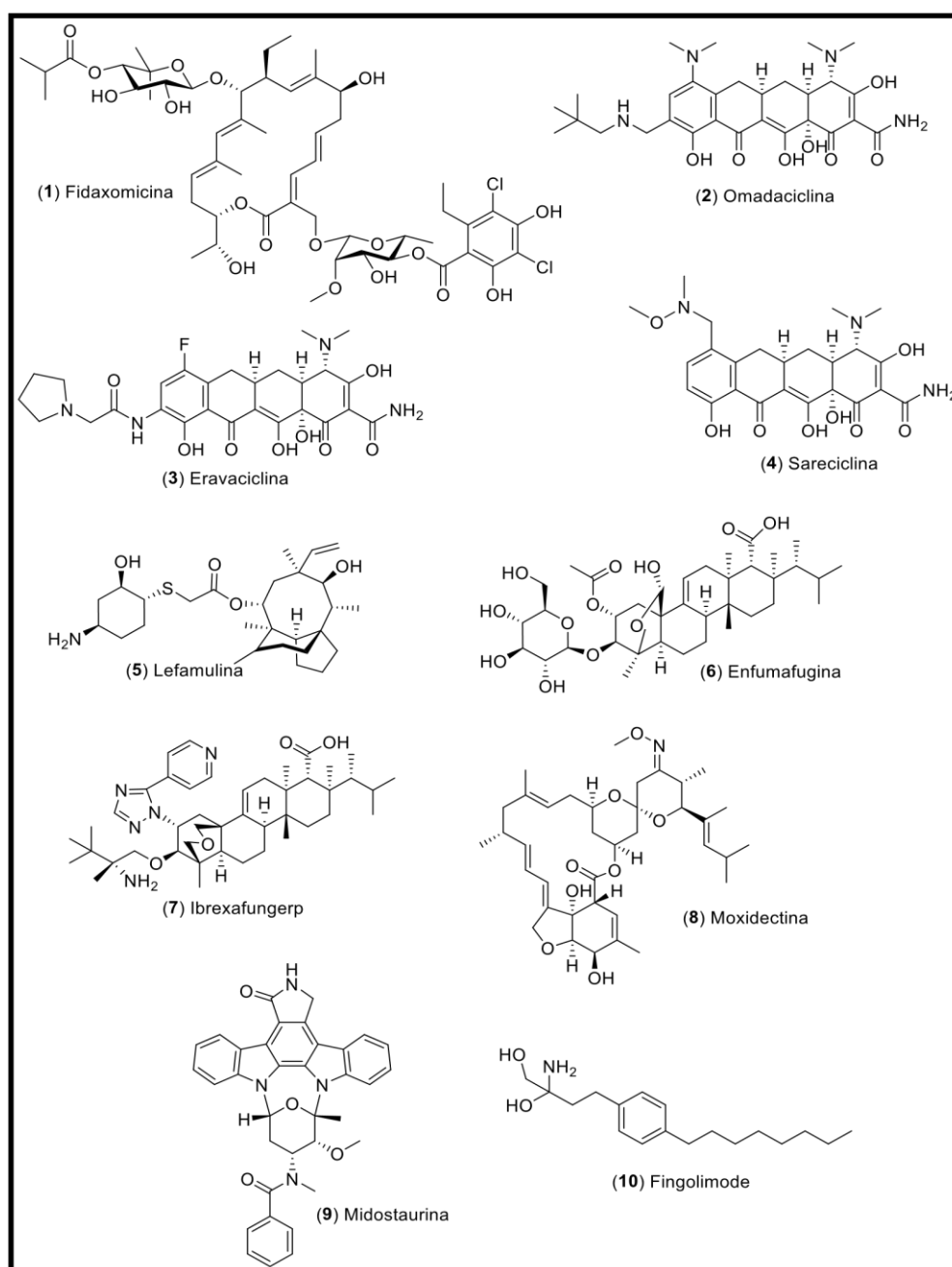


Figura 2. Produtos naturais recentemente aprovados. Adaptado de Newman e Cragg (2020).

3.3 Fungos como fonte de substâncias bioativas

Os fungos são organismos heterótrofos, desprovidos de clorofila e, portanto, não realizam fotossíntese. Eles adquirem alimento do meio em que estão inseridos (BORGES et al., 2009). Os metabólitos secundários fúngicos constituem uma ampla variedade de compostos, que desempenham um papel vital no contexto agrícola, farmacêutico e industrial. Gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Acremonium* estão entre os fungos capazes de produzir uma alta diversidade de metabólitos secundários (ZAIN et al., 2014). Essa diversidade fica evidente em diversos estudos, como por exemplo na avaliação destes como antibióticos e antitumorais em bibliotecas de substâncias puras, algumas com milhares de compostos. Em um destes estudos, Stadler e Keller (2008) apontaram para 1.500 metabólitos secundários oriundos de fungos, caracterizados entre 1993 e 2001 que apresentam alguma atividade biológica.

Estudos experimentais comprovaram a capacidade dos fungos filamentosos em produzir compostos bioativos (BILLS et al., 2009), alguns exemplos estão apresentados na **Figura 3**. Três substâncias denominadas de artrobotrisinas A (**11**), B (**12**) e C (**13**), isoladas do fungo *Arthrobotrys oligospora*, exibiram atividades antibacterianas específicas (WEI et al., 2011; ZAIN et al., 2014). Extratos de culturas de *Pestalotiopsis guepinii* foram ativos contra *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto cepas de *Phomopsis* sp. mostraram um efeito antifúngico significativo contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae* (RODRIGUES et al., 2000; ZAIN et al., 2014). Dois compostos derivados de α -pironas chamados fusapirona (**14**) e desoxifusapirona (**15**) foram isolados de culturas de *Fusarium semitectum*. Os dois compostos mostraram considerável atividade antifúngica contra vários fungos filamentosos fitopatogênicos e/ou micotoxigênicos, além de apresentar considerável atividade inibidora em relação a agentes de micoses humanas (ALTOMARE et al., 2000). Sete diterpenoides, denominados heptemeronas A-G (**16-22**), foram isolados do caldo de culturas submersas do basidiomiceto *Coprinus heptemerus*. Dentre as atividades biológicas, a inibição da germinação fúngica foi a mais potente e dependeu fortemente da composição do meio de ensaio. Na água, a inibição ocorreu em concentrações 5 a 10 vezes menores em comparação com os meios complexos. A heptemerona G foi o composto mais ativo. As atividades citotóxicas foram moderadas e apenas a heptemerona D foi fitotóxica (KETTERING et al., 2005).

Os wickerols A (23) e B (24) foram produzidos pelo fungo *Trichoderma atroviride* FKI-3849. O wickerol A mostrou potente atividade antiviral contra a cepa A/PR/8/34 (H1N1), enquanto o wickerol B exibiu atividade mais fraca (YAMAMOTO et al., 2012). Já as frações do extrato aquoso do fungo *Inonotus obliquus* exibiram um efeito antiviral frente ao agente causador da hepatite C. Especificamente, as frações foram capazes de reduzir em até 100 vezes as propriedades infecciosas do vírus em 10 minutos. Os efeitos antivirais dos extratos de fungos se manifestam após o uso preventivo (24 horas antes da infecção) e terapêutico (durante a infecção de células renais de embriões suínos) (SHIBNEV et al., 2011).

As hipocrelinas A (25) e B (26), perilenquinonas de ocorrência natural, foram isoladas de *Hypocrella bambusae*. O primeiro composto exibiu potente atividade contra *Leishmania donovani*, enquanto o segundo foi moderadamente ativo (MA et al., 2004). Nove compostos foram isolados do fungo *Eurotium chevalieri*. Dentre eles, os compostos chevalona D (27), eurochevalierina (28) e um terpenoide pirrolobenzoxazina denominado CJ-12662 (29) exibiram atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*. Chevalona C (30), eurochevalierina e CJ-12662 mostraram atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Chevalona B (31) e CJ-12662 mostraram citotoxicidade contra linhagens de células cancerosas (KANOKMEDHAKUL et al., 2011).

A virulência de cinco cepas de fungos, *Acremonium cephalosporium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride* e *Verticillium albo-atrum* pela aplicação de 108 conídios/mL a larvas e adultos de moscas domésticas, *Musca domestica*, apresentou resultados significativos. *A. niger* produziu a maior porcentagem de mortalidade para larvas, 85,1%, e adultos, 98,2% de moscas domésticas, respectivamente. A aplicação tópica das cepas fúngicas em larvas mostrou resposta dependente da concentração e causou mortalidade variando entre 41% e 83% com valores de LT₅₀ (Tempo Médio de Letalidade) variando entre 5,22 e 7,81 dias (AL-OLAYAN, 2013).

Dois novos metabólitos secundários, denominados 7-desidroxil-ziniol (32) e 20-hidroxil-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (33), foram isolados da cultura de *Alternaria solani*, um fungo endofítico. Testes de atividade biológica indicaram que o composto 32 apresentou atividade anti-HBV moderada (AI et al., 2012). Extratos de fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* inibiram o crescimento de actinomicetos. *Guignardia* sp. também foi ativo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis* (WEI et al., 2011; ZAIN et al., 2014).

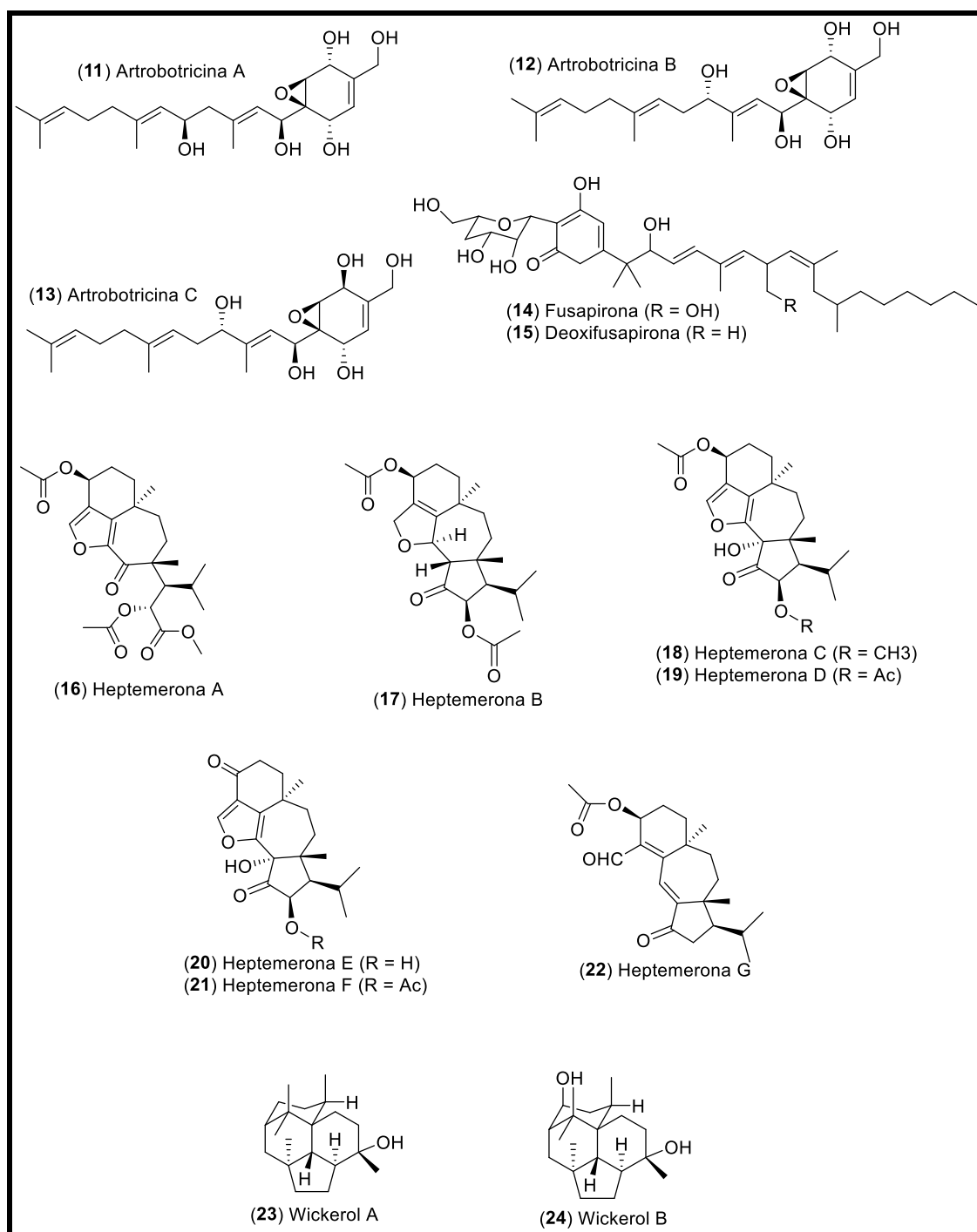
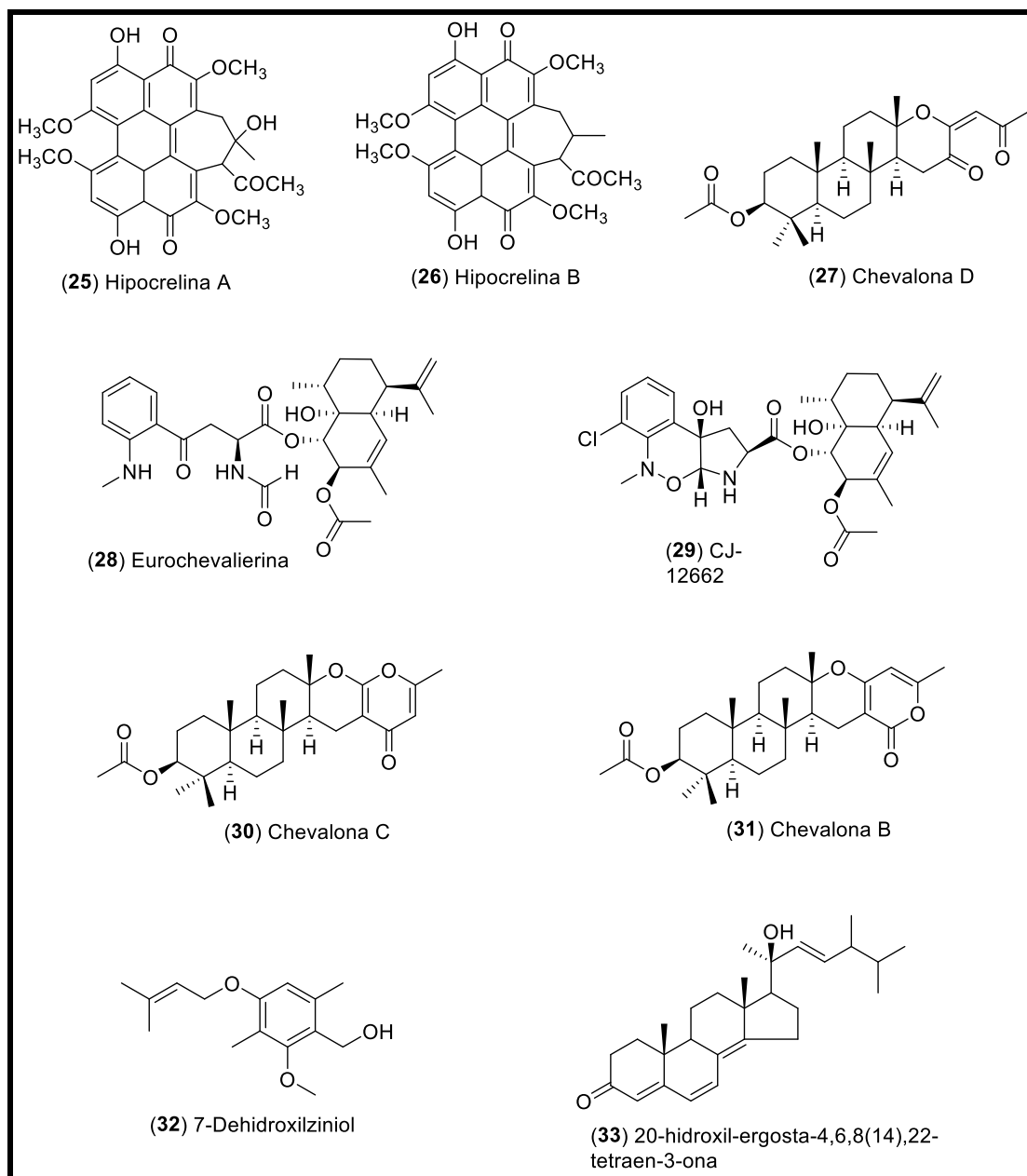


Figura 3. Metabólitos fúngicos com atividades biológicas.



Continuação da **Figura 3**.

Diversos outros estudos apontam os fungos endofíticos como sendo promissores, e por isso inúmeros trabalhos dedicam-se a pesquisar este nicho particular. Alguns exemplos desses estudos são descritos a seguir e as moléculas estão apresentadas na **Figura 4**. Por meio de fracionamento guiado por bioensaio, o extrato em acetato de etila de uma cultura do fungo endofítico *Phoma* sp. ZJWCF006, isolado de *Arisaema erubescens*, proporcionou o isolamento de quatro substâncias, das quais apenas duas apresentaram atividade biológica. Dentre elas, um novo derivado de α -tetralona (3S)-3,6,7-trihidróxi- α -tetralona (**34**), causou a inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporium* e *Rhizoctonia*

solani. A outra, denominada cercosporamida (35), exibiu atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (WANG et al., 2012). Os compostos palmarumicina CP17 (36) e palmarumicina CP18 (37), isolados de *Edenia* sp., fungo obtido da folha de *Petrea volubilis*, apresentaram atividade antiparasitária acentuada contra *Leishmania donovani*, inibindo seu crescimento (ALY et al., 2011).

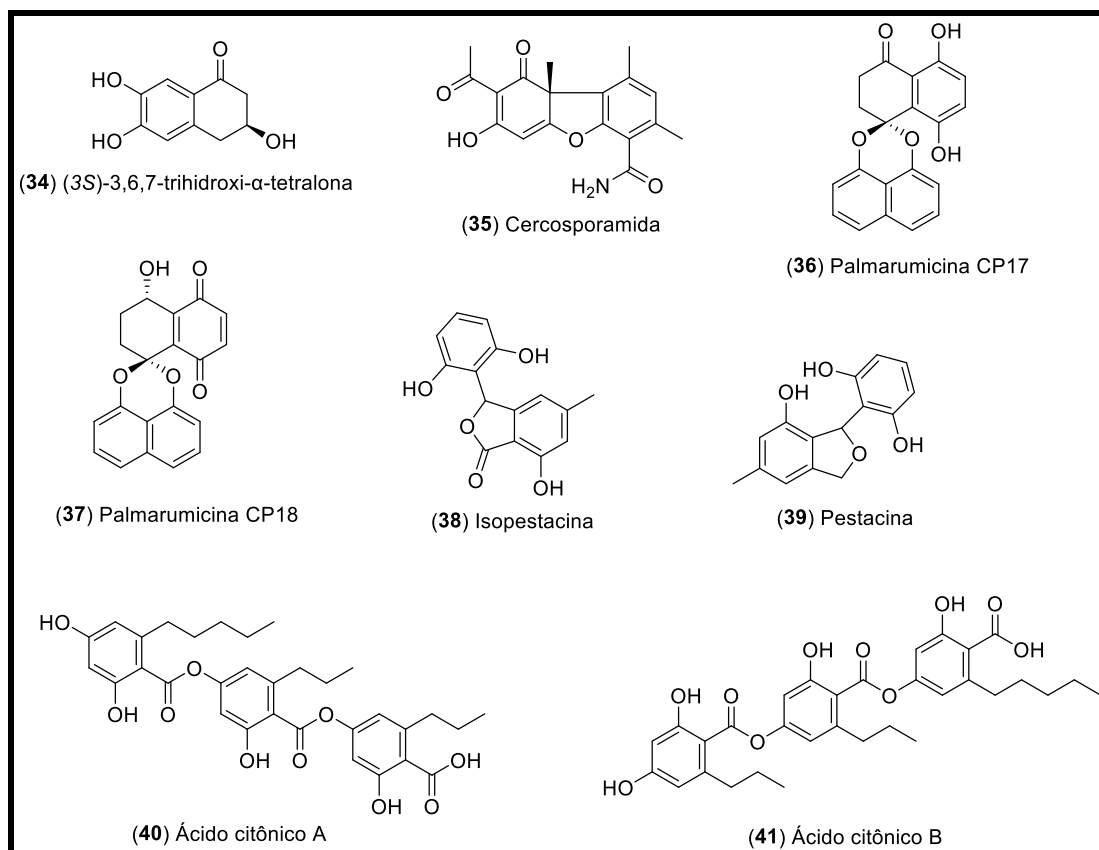


Figura 4. Moléculas bioativas de fungos endofíticos.

Outras moléculas, como a isopestacina (38) e a pestacina (39), produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis microcarpa*, isolado de *Terminalia morobensis*, apresentaram uma notável atividade antioxidante, além da atividade antifúngica (HARPER et al., 2003; TOGHUEO & BOYOM, 2019; STROBEL et al., 2002). Os ácidos citônicos A (40) e B (41), isolados da fermentação em meio sólido do fungo endofítico *Cytospora* sp., são inibidores da protease do citomegalovírus humano, um patógeno oportunista que causa doenças em bebês infectados congenitamente e adultos imunodeficientes (GUO et al., 2000). A crisogenamida A, sintetizada por *Penicillium chrysogenum*, um fungo endofítico associado com *Cistanche deserticola*, demonstrou atividade neuroprotetiva frente a morte celular induzida por estresse oxidativo, melhorando a viabilidade celular em 59,6% (ALY et

al., 2010). Todas as atividades biológicas citadas acima são evidências do potencial metabólico dos fungos, e um gênero de destaque na busca por novos fármacos é o gênero *Penicillium*.

3.4 Gênero *Penicillium*

Penicillium spp. São fungos filamentosos de ampla distribuição e que produzem metabólitos antimicrobianos de importância significativa para as indústrias farmacêutica e alimentícia (KIM H. Y. et al., 2016; YADAV et al., 2018). É um dos gêneros de fungos mais conhecidos, contendo mais de 200 espécies com distribuição mundial (KIM et al., 2012). São encontrados em diferentes habitats, incluindo solo, ar, ambientes extremos e vários produtos alimentares (YADAV et al., 2018). O gênero é importante dentro do filo ascomycota com grande impacto econômico na vida humana. As espécies produzem compostos com atividades biológicas, corantes alimentícios e são utilizadas na fabricação de queijos (FRISVAD & SAMSON, 2004; MORALES-OVERVIDES et al., 2020; YADAV et al., 2018), produzem também metabólitos com importante atividade antioxidante (ALFARO et al., 2003). É indiscutível que o gênero *Penicillium* se tornou um dos mais conhecidos de fungos para a descoberta de compostos bioativos (NICOLETTI & TRINCONE, 2016). As espécies de *Penicillium* possuem capacidade metabólica excepcionalmente diversa, com relatos de produção de literalmente centenas de compostos por uma única espécie ou outra. Os perfis de tais compostos provaram ser altamente específicos para cada espécie (PITT, 2014).

Uma das espécies mais estudadas, *Penicillium expansum*, é conhecida por produzir uma variedade de metabólitos com bioatividades já comprovadas, incluindo efeitos imunossupressores, antiparasitários, antioxidantes, antifúngicos e antibacterianos (ALFARO et al., 2003; FRISVAD et al., 2004; KIM et al., 2012). Outras espécies como, por exemplo, *Penicillium europium* são capazes de produzir pigmentos com aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica como corantes para substratos têxteis e não têxteis, como papel, couro, revestimentos e tintas, em cosméticos e aditivos alimentares (KHAN et al., 2021). Semelhantemente às espécies de *Monascus*, as espécies de *Talaromyces*/*Penicillium* foram reconhecidas como potenciais produtoras de pigmentos naturais (MORALES-OVERVIDES et al., 2020). Tais pigmentos possuem múltiplas

propriedades biológicas, como propriedades antioxidantes, atividade antibacteriana e atividade citotóxica contra linhagens de câncer (PANDIT et al., 2018; SHAH et al., 2014).

Ao longo dos anos, a investigação de espécies de *Penicillium*, particularmente endófitos, expandiu-se muito e diversas atividades e aplicações biológicas foram relatadas. Um artigo de revisão mostrou que 131 endófitos deste gênero foram investigados no período de 2000-2019 e mais de 280 compostos exibiram atividades antimicrobiana, anticâncer, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antiparasitária, imunossupressora, antidiabética, antiobesidade, neuroprotetora, efeitos antifibróticos, atividades inseticidas e de biocontrole foram relatadas (TOGHUEO & BOYOM, 2020). A esclerotiorina, um pigmento clorado da classe das azafilonas produzido pelo fungo endofítico *Penicillium mallochii*, isolado de *Himatanthus* sp., apresentou atividade antioxidante moderada e antibacteriana moderada contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (DOS SANTOS et al., 2019). Um estudo envolvendo plantas medicinais, na busca de fungos endofíticos como potenciais produtores de antibióticos, levou à descoberta, dentre outros, do fungo *Penicillium chrysogenum* como um dos endófitos com maior capacidade de inibição de bactérias patogênicas humanas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, além de *Enterococcus faecalis* (GASHGARI et al., 2016; TOGHUEO & BOYOM, 2020). Os extratos de *P. chermesinum* KM405640, isolado da planta etnomedicinal *Melastoma malabathricum* L., apresentou atividade significativa contra vários patógenos bacterianos e fúngicos (MISHRA et al. 2016; TOGHUEO & BOYOM, 2020). Um total de 58 isolados fúngicos, pertencentes a 24 gêneros, foram obtidos das folhas, caules e raízes de *Ginkgo biloba* L. Dentre eles, uma cepa de fungo endofítico *Penicillium cataractum* SYPF 7131 apresentou a maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (WU et al., 2018).

A busca por agentes antiparasitários revelou que fungos endofíticos de *Syphonia globulifera* possuem atividade contra uma cepa de *Plasmodium falciparum* (PfINDO) resistente à cloroquina. Sessenta e um isolados fúngicos com frequência de infecção de 67,77% foram obtidos da casca de *S. globulifera*. Doze isolados foram selecionados e classificados em seis gêneros diferentes, incluindo *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Bipolaris*. Dentre os extratos testados contra PfINDO, o extrato de *Penicillium janthinellum* apresentou considerável atividade (ATEBA et al., 2018). Peniisocumarinas isoladas de *Penicillium commune* QQF-3, endófito de *Kandelia candel*,

foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade e atividade de inibição das enzimas α -glucosidase e tirosina fosfatase B do *Mycobacterium tuberculosis* (MtpB). Alguns desses compostos exibiram efeitos inibitórios elevados sobre α -glucosidase (CAI et al., 2018). O extrato de acetato de etila obtido de *Penicillium sclerotiorum*, isolado de *Cassia fistula*, afetou significativamente a viabilidade das células HeLa (carcinoma cervical humano) de maneira dose-dependente, além de exibir propriedades antioxidantes e antiangiogênicas (KURIAKOSE et al., 2018). Algumas culturas de *Penicillium* estão ilustradas abaixo (Figura 5).

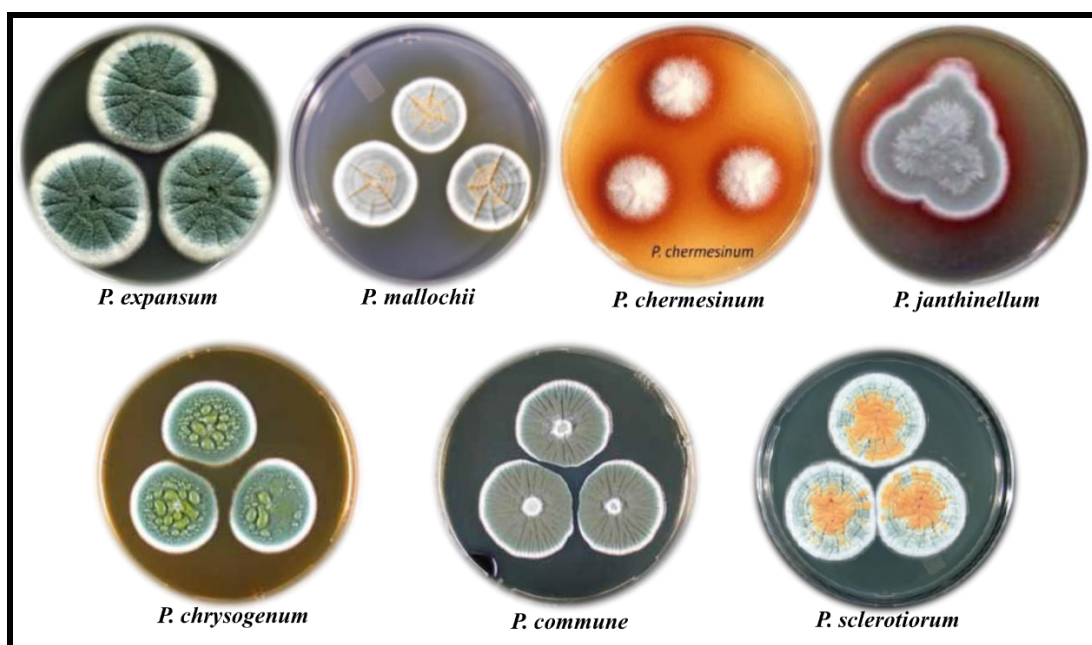


Figura 5. Exemplos de espécies de *Penicillium* produtoras de compostos bioativos. **Fonte:** *P. expansum* (KIM et al., 2007); *P. mallochii* (RIVERA et al., 2012); *P. chermesinum* (YADAV et al., 2018); *P. janthinellum* (ZAIN et al., 2009); *P. chrysogenum*, *P. commune* (FRISVAD & SAMSON et al., 2004); *P. sclerotiorum* (RIVERA & SEIFERT, 2011).

3.5 Estudos metabolômicos de *Penicillium*

O conjunto completo de pequenas moléculas ($< \pm 2000$ Da), que desempenham funções importantes nas vias metabólicas e processos celulares em um sistema biológico, é denominado metaboloma (SEGERS et al., 2019). A metabolômica, por sua vez, é a análise abrangente e aprofundada do metaboloma, com o objetivo de reunir a maior quantidade possível de informações sobre a composição química de diferentes organismos, através da utilização de técnicas analíticas (BELINATO et al., 2019). Sua aplicabilidade pode ser em diferentes áreas de pesquisa, como detecção e progressão precoce de doenças, toxicologia,

controle de qualidade de extratos de ervas, alimentos e nutrição e análise ambiental (SEGERS et al., 2019).

É comum, em investigações metabolômicas, a utilização de duas abordagens principais e complementares, denominadas de perfil metabólico (do inglês, *metabolic profiling*) e impressão digital metabólica (do inglês, *metabolic fingerprinting*). Outros termos também podem ser usados, análise alvo ou direcionada (do inglês, *targeted metabolomics*) e análise global ou não direcionada (do inglês, *untargeted metabolomics*). Quando o estudo envolve a análise de um grupo ou classe de metabólitos específico, a abordagem metabolômica é denominada análise alvo ou direcionada. Já a análise global ou não direcionada, é mais abrangente e busca estudar todas as classes de metabólitos produzidas pelo organismo. Portanto, a amplitude de análise é a principal diferença entre os tipos de abordagem, além dos procedimentos metodológicos. Além disso, a análise global permite explorar profundamente o perfil metabólico do organismo e possibilita a descoberta e identificação de novas classes de metabólitos (BELINATO et al., 2019; YI et al., 2016).

As principais técnicas analíticas utilizadas na geração de dados em metabolômica são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS) (YI et al., 2016). É essencial a utilização de ferramentas analíticas com capacidade de gerar dados com nível alto de precisão na detecção de metabólitos produzidos por organismos e o número de estudos envolvendo a espectrometria de massas vem crescendo ainda mais (CHENG et al., 2013; KRUG et al., 2008; VINAYAVEKHIN & SAGHATELIAN, 2010). Dentro de metabolômica de microrganismos as principais técnicas analíticas empregadas são NMR e cromatografia acoplada à espectrometria de massas como, GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) e LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (BELINATO et al., 2019).

O estudo metabolômico envolvendo microrganismos é cada vez mais abrangente, com aplicação em diversos campos de pesquisas, incluindo identificação microbiana, mutações celulares, pesquisas de genes funcionais e identificação de vias metabólicas. Os avanços em instrumentação analítica desempenharam um papel essencial no desenvolvimento e expansão da metabolômica de microrganismos, destacando-se técnicas analíticas complementares como cromatografia e espectrometria de massas, além dos avanços das ferramentas de quimioinformática. A metodologia em metabolômica

microbiana, geralmente, constitui-se da etapa de preparo de amostra, que envolve principalmente o *quenching* e a extração de metabólitos, análise instrumental, processamento e análise dos dados (BELINATO et al., 2019). Entre os microrganismos estudados por abordagem metabolômica estão os fungos do gênero *Penicillium*, com alguns trabalhos publicados recentemente. Exemplos de metabólitos identificados através da abordagem metabolômica são descritos a seguir e estão representados na **Figura 6**.

O estudo do extrato de fermentação do fungo *Penicillium* sp. GDGJ-285, endofítico da planta medicinal tradicional chinesa *Sophora tonkinensis*, através da análise não direcionada de LC-MS/MS e rede molecular, possibilitou a descoberta e isolamento de cinco novos meroterpenoides, denominados peniclactonas A-C (**42-44**), e dois novos análogos de isoaustrina, 6-hidroxiisoaustrina (**45**) e 6-cetoisoaustrina (**46**). Suas estruturas foram elucidadas por espectroscopia HRMS e NMR, e suas configurações absolutas foram determinadas por análise de difração de cristal único de raios-X. Os bioensaios mostraram que o composto **44** inibiu a produção de óxido nítrico em células de macrófagos RAW 264.7 induzidas por lipopolissacarídeo com um valor de IC₅₀ de 39,03 µM (MO et al., 2021). A integração de rede molecular, dados de LC-MS/MS e RMN de ¹H, por meio de uma abordagem direcionada, possibilitou a identificação de sete novos ciclohexadepsipeptídeos, denominados de crisogeamidas A-G (**47-53**), obtidos a partir da fermentação do fungo *Penicillium chrysogenum* (CHNSCLM-0003), isolado de coral (HOU et al., 2019).

Para caracterizar metabólitos produzidos pelo fungo *Penicillium nordicum*, foi feita uma interação de marcação isotópica dupla (¹³C e ¹⁵N) com a desreplicação de dados de espectrometria de massas (MS/MS) por redes moleculares, por meio de abordagem não direcionada. Desta forma, foram identificados 92 compostos, sendo 69 desconhecidos (HAUTBERGUE et al., 2019). Quatro policetídeos incomuns, possuindo três arquiteturas químicas não ambíguas, foram descobertos a partir da fermentação de *Penicillium canescens*, auxiliada pela estratégia de OSMAC e rede molecular baseada em MS². A penicanona (**54**) é o primeiro policetídeo de ocorrência natural caracterizado por um esqueleto de carbono tricíclico 6/6/8 incorporando um núcleo biciclo [5.3.1] undecano incomum. As penicanesonas A-C (**55-57**) são dímeros do policetídeo aromático apresentando núcleos de anel heterotetracíclicos de 6/5/5/6 e 6/6/5/6 inconsistentes (ZANG et al., 2020). Da mesma forma, utilizando abordagem OSMAC e, posteriormente, cultivo em

larga escala, dados de LC-MS/MS, redes moleculares e RMN, foi possível isolar e identificar nove meroterpenoides incluindo dois novos análogos, 22-desoximiniolutelídeo A (**58**) e 4-hidróxi-22-desoximiniolutelídeo B (**59**), juntamente com sete compostos conhecidos, produzidos pelo fungo *Penicillium ubiquetum* MMS330 isolado do mexilhão azul (*Mytilus edulis*) (HOANG et al., 2018). Os dois últimos exemplos de estudos metabolômicos envolvendo redes moleculares estão representados nas figuras a seguir (**Figura 7 e 8**).

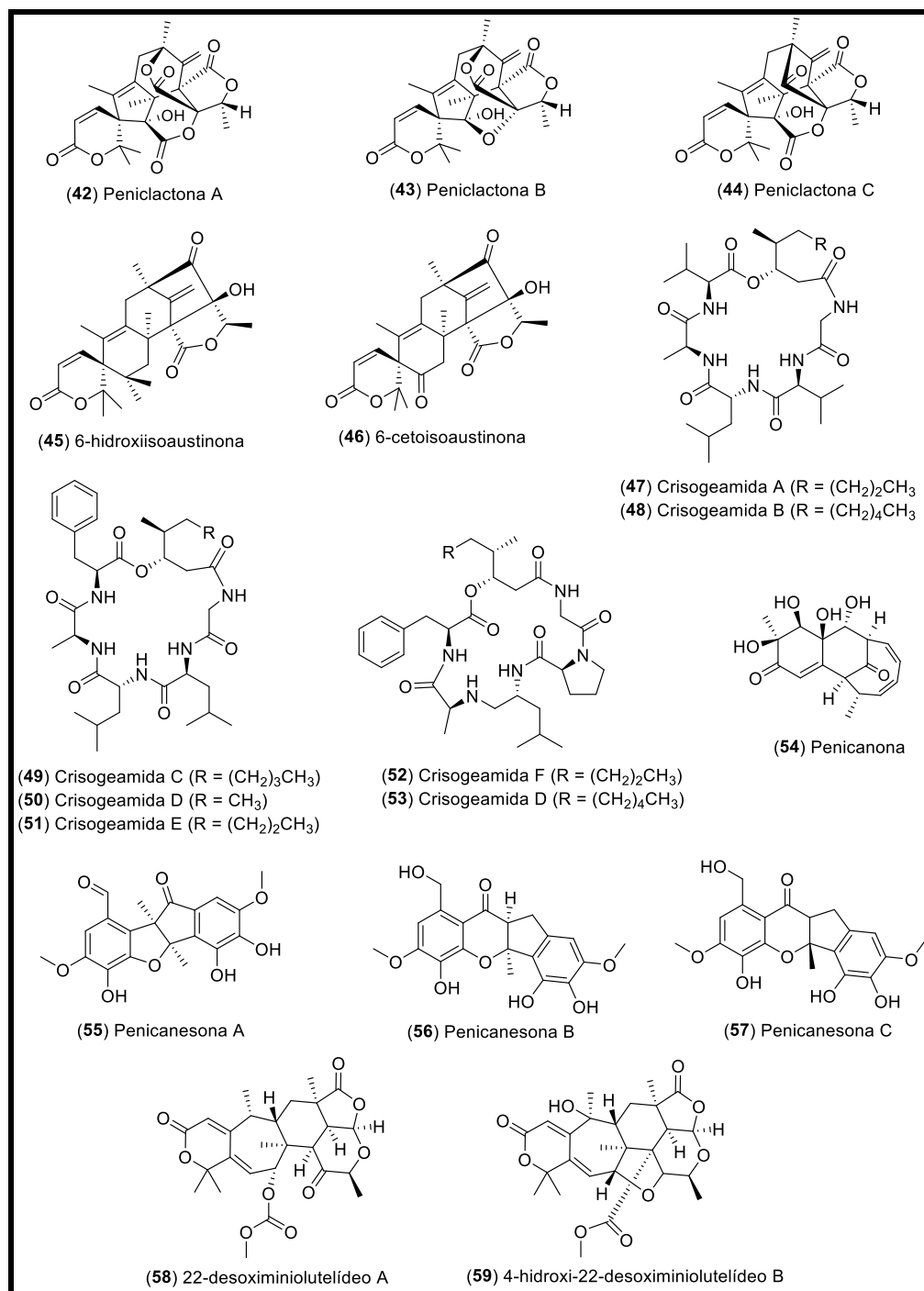


Figura 6. Moléculas identificadas por estudos metabolômicos.

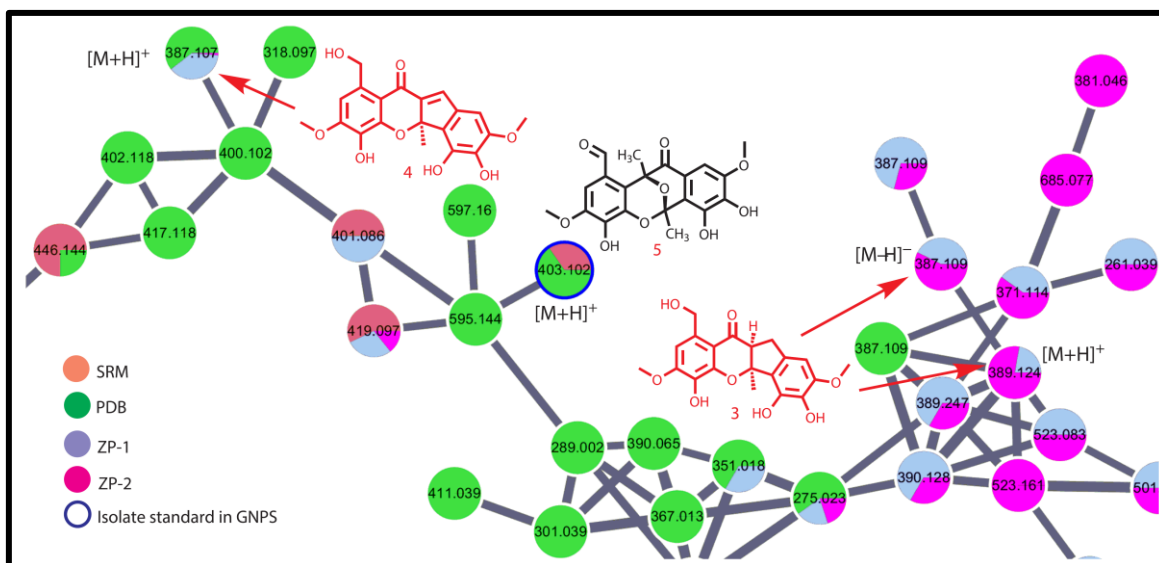


Figura 7. Rede molecular baseada em dados de LC-MS/MS de *Penicillium canescens* (ZANG et al., 2020)

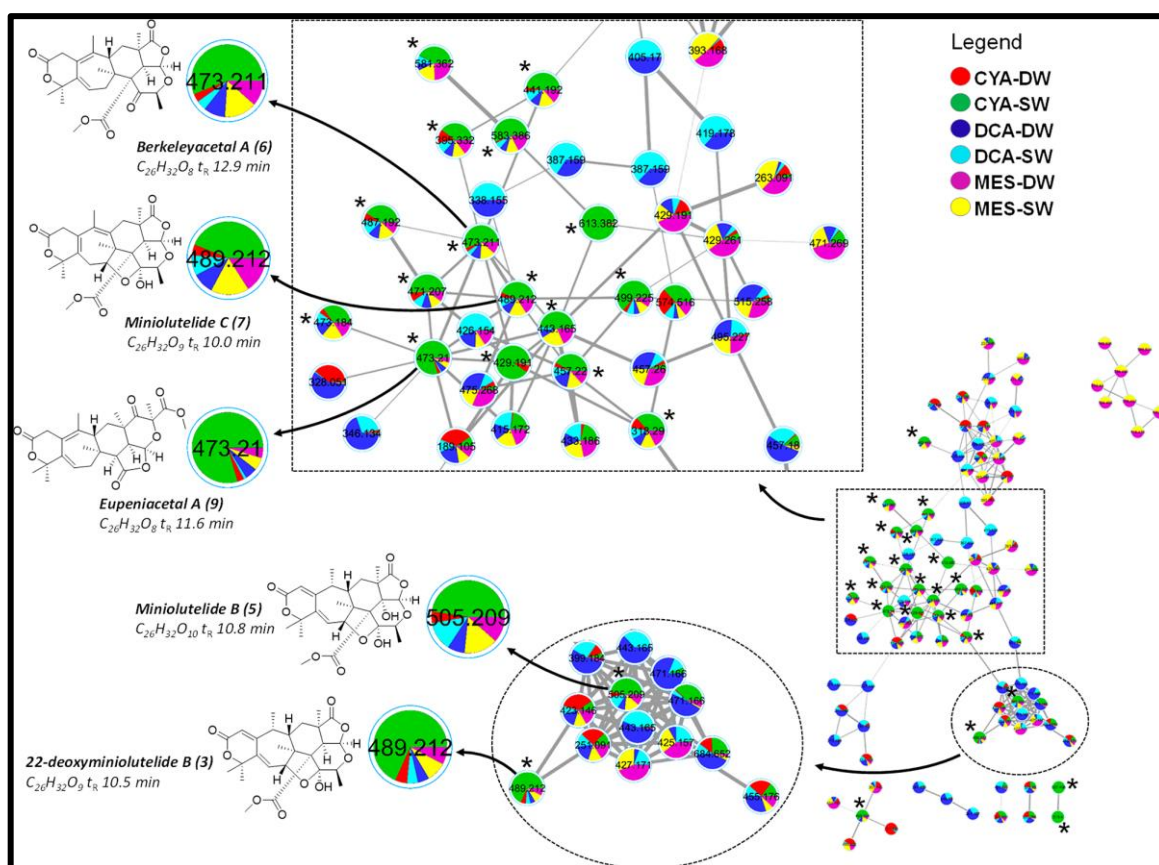


Figura 8. Redes moleculares baseadas em dados de LC-MS/MS de *Penicillium ubiquetum* (HOANG et al., 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da linhagem fúngica

A linhagem fúngica utilizada neste trabalho, foi isolada do caule da planta amazônica *Duguetia stelechantha* (Annonaceae) no Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos (LABMICRA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e purificada por meio de culturas monospóricas em 2012 (SOUZA, 2012). No ano de 2016, foi cedida por sua descobridora, Professora Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas ao Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas – MMSRG da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Ainda na UFAM, a linhagem foi identificada como DgC32.2 e na UEA, recebeu um novo código de identificação, MMSGR-058.

4.2 Cultivo do fungo e produção de extratos

Inicialmente foram feitas réplicas através do cultivo em meio BDA (batata, dextrose, ágar) sólido e algumas conservas através do método de Castellani (1939). Posteriormente, utilizando abordagem OSMAC (do inglês, *One Strain Many Compounds*) (PARANAGAMA et al., 2007), os esporos do fungo foram inoculados, por meio de solução de esporos (50 µL), em vidrarias do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de diferentes meios de cultura, esterilizados por vapor. Os cultivos ocorreram a 26 °C, sendo avaliada a influência de maior oxigenação (agitação em shaker a 180 rpm; Shaker: modelo MA420, MARCONI) e de pouca oxigenação (estático) durante 28 dias.

4.2.1 Meios de cultura utilizados

- **BDL:** 3 g de glicose anidra, 0,3 g de extrato de levedura, 150 mL de água de batata (20 g/L).
- **ISP2:** 0,6 g de amido, 0,6 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de malte e 150 mL de água destilada.
- **CZAPEK:** 1,5 g de glicose anidra, 0,0015 g de sulfato de ferro hidratado, 0,45 g de nitrato de sódio, 0,15 g de fosfato de potássio dibásico anidro, 0,075 g de sulfato de magnésio, 0,075 g de cloreto de potássio e 150 mL de água destilada.
- **CARNE 2:** 3 g de glicose anidra, 0,75 g de extrato de carne e 150 mL de água

destilada.

4.2.2 Produção de extratos

Para separar o micélio do caldo fermentado, foi realizada filtração a vácuo utilizando papel de filtro no sistema de filtração. Em seguida, os metabólitos secundários foram extraídos do meio líquido com AcOEt por meio de procedimento de partição líquido-líquido (1 x 125 mL, 1:1 v/v). O micélio foi triturado utilizando Turrax (modelo T10BS32, IKA) e colocado para maceração por 48h com solução de AcOEt/MeOH 1:1 v/v (125 mL) e, posteriormente, filtrado. O solvente foi removido das amostras por rotoevaporação a vácuo (com rotação de 70-80 rpm e temperatura entre 40-50 °C; Rotaevaporador modelo 803, Fisatom) e os extratos colocados em dessecadores contendo sílica granular para o processo de secagem.

4.3 Obtenção das linhagens mutantes

As duas linhagens mutantes utilizadas neste trabalho, produzidas a partir da linhagem selvagem de *Penicillium* sp. MMSRG-058, foram obtidas por meio de colaboração com o aluno de doutorado Thiago Fernandes Souza da UFAM e seu orientador Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A partir da descoberta dos genes responsáveis pela síntese de policetídeos sintases (PKS) envolvidas na biossíntese de esclerotiorina e seus derivados, utilizando mineração genômica, genômica funcional e metabolômica, foi realizada a inativação gênica por meio da estratégia *Split-Marker* para obtenção das linhagens mutantes. A metodologia detalhada pode ser encontrada no trabalho de Sousa (2021).

4.3.1 Cultivo e produção de extratos das linhagens mutantes

O cultivo dos mutantes obtidos, foram realizados em microescala em frascos de Erlenmeyer (capacidade de 250 mL) com 100 mL de meio de caldo BD estático a 25 °C por 21 dias. Logo após, a massa micelial foi separada do caldo fermentado por meio de filtração, em seguida, o caldo fermentado foi extraído com acetato de etila (1:1 v/v) e o solvente evaporado sob pressão reduzida para obtenção do extrato bruto.

4.4 Análise por Espectrometria de Massas (MS)

Foram separados de 2 a 3 mg de cada extrato de *Penicillium* sp. em tubos de Eppendorf os quais foram enviados para análise sob supervisão da Professora Dra. Livia Soman de Medeiros do departamento de Química da Universidade Federal de São Paulo.

Para o processo de análise, as amostras foram solubilizadas em 1 mL de MeOH grau HPLC e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para frascos do tipo vial de 1,5 mL, sendo cada amostra posteriormente analisada em sistema de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS). O equipamento abrange um cromatógrafo líquido Nexera X2 (Shimadzu) com detector de arranjos de diodos (DAD) - SPD M20A acoplado a um espectrômetro com analisador tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF), MicroTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com fonte eletrospray (ESI), operando no modo positivo de ionização, com tempo de transferência de íons de 70 μ s e prepulse de 5 μ s. O intervalo de massas selecionado foi de m/z 50-1200, modo AutoMS, com energia de colisão variando de 20 - 65 eV de acordo com m/z 50-700, mantendo-se a energia constante em 65 eV para valores de massa acima de m/z 700. Foi adquirido o máximo de cinco íons precursores por ciclo. Os parâmetros de funcionamento do equipamento foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 4 bars, gás secante (nitrogênio) 9 L/min, temperatura da fonte 200 °C. Para calibração interna do sistema foi utilizada solução de formiato de sódio 10 nM em isopropanol/água (1:1 v/v). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1mm, 2.6 μ m) (Phenomenex) mantida em 50 °C, com vazão de 0,35 mL/min. A fase móvel (A) foi constituída de água deionizada enquanto a fase (B) constituída de ACN, ambas grau HPLC e contendo 20 mM de ácido fórmico como aditivo. Inicialmente foi aplicada eluição isocrática de 0-2 min em 15 % de (B), com posterior gradiente de eluição de 2-12 min de 15 % até 95 % de (B) e novamente eluição isocrática de 12-17 min à 95 % de (B). Para a injeção da amostra foi utilizado o volume de 5 μ L.

4.5 Construção de redes moleculares e análise usando o GNPS

Os espectros de íons do produto decorrentes da análise HPLC-HRESIMS/MS dos extratos de *Penicillium* sp. foram analisados e organizados em redes moleculares usando a plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados de MS/MS obtidos, inicialmente, foram convertidos para o

formato .mzXML com o MS-Convert versão 3.0.21132 e carregados na plataforma GNPS Web. Para construção das redes moleculares foi utilizado o modo clássico. Os parâmetros foram definidos como descritos a seguir: a tolerância de massa de íon precursor de 0,05 Da, tolerância de íon de produto de 0,1 Da, o cosseno de 0,6 com um mínimo de seis íons para fragmentos correspondentes, podendo cada nó ter no máximo 10 nós vizinhos conectados com no mínimo dois nós por *cluster* e com o máximo de 100 nós podendo ser conectados (WANG et al., 2016). A desreplicação de moléculas conhecidas, bem como a identificação de novas moléculas, foi realizada por meio de análise das redes moleculares e por interpretação manual dos espectros MS/MS utilizando o software DataAnalysis versão 4.2 (Bruker) em comparação com banco de dados como, Atlas de Produtos Naturais e METLIN. Por fim, os dados foram visualizados no software Cytoscape 3.7.0. A rede molecular utilizada neste trabalho pode ser acessada no site do GNPS por meio do seguinte link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2ef399befc2c43f69d8891f6a984c242>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho de Souza (2012), utilizando a mesma linhagem fúngica, foram isolados e identificados dois análogos principais de azafilonas, a esclerotioramina e isocromofilona VI. Essas moléculas serviram como ponto de partida para o presente trabalho e foram consideradas as sementes (do inglês, *seeds*), e assim, serviram como base para a interpretação do perfil metabólico nos diferentes cultivos testados.

De modo geral, o cultivo pela abordagem OSMAC apresentou semelhanças e diferenças quanto à produção de metabólitos comparando o meio líquido (metabólitos extracelulares) e o micélio (metabólitos intracelulares). Comparando em função da agitação, também houve diferença quanto a especificidade e compartilhamento de metabólitos nos diferentes meios. Além disso, é evidente a diferença de moléculas majoritárias em cada meio, algumas com o mesmo tempo de retenção, mas padrão isotópico distinto. Com base nessas observações, cada meio de cultivo é apresentado na **Figura 9** e discutido adiante.

5.1 Comparação entre os meios de cultivo e perfil cromatográfico

A quantidade de picos cromatográficos apresentada em cada meio de cultivo é mostrada na **Tabela 1**. A contagem de picos foi feita apenas para aqueles que apresentaram compostos com espectro de fragmentação interpretável (Intensidade dos fragmentos ≥ 1000 contagens de íons).

Tabela 1. Comparativo entre o número de picos cromatográficos de cada meio de cultivo. LE (Líquido Estático), LA (Líquido Agitado), ME (Micélio Estático), MA (Micélio Agitado).

Meio de cultivo	Nº de picos cromatográficos				Total
	LE	LA	ME	MA	
BDL	23	22	18	24	87
CZAPECK	16	21	30	19	86
ISP2	17	20	24	22	83
CARNE2	33	21	31	20	105

A maioria dos picos anotados estão no intervalo de tempo de retenção (RT) de 5-12 minutos e variaram quanto à intensidade. Analisando o perfil cromatográfico de cada meio é notável a existência de similaridade. Comparando meio líquido e micélio estáticos (LE/ME) as diferenças quanto ao número de picos cromatográficos são maiores em BDL, CZAPECK e ISP2, com diferença de 5, 14 e 7 picos, respectivamente. Em relação a meio

líquido e micélio agitados, as diferenças foram menos discrepantes, variando entre 1-3 picos cromatográficos apenas.

Também foi encontrada diferença quanto ao número de picos comparando os diferentes meios de cultivo, com o meio CARNE2 apresentando o maior número total de picos. Houve diferença também quando comparado o perfil cromatográfico por extrato de cada meio como, por exemplo, comparando meio líquido estático (LE), onde a maior quantidade de picos se encontra em CARNE2 e a menor em CZAPECK.

A agitação foi um fator importante levado em consideração na quantidade de picos presentes em cada meio. No meio BDL, o fator agitação é pouco interferente no quantitativo de picos entre os meios líquidos, mas influencia no número de picos nos micélios. Já no meio CZAPECK, a influência acontece tanto no meio líquido quanto no micélio. No meio ISP2 há um equilíbrio quanto aos números de picos, enquanto isso, no meio CARNE2 há maior diferença quando comparado LE/LA e ME/MA.

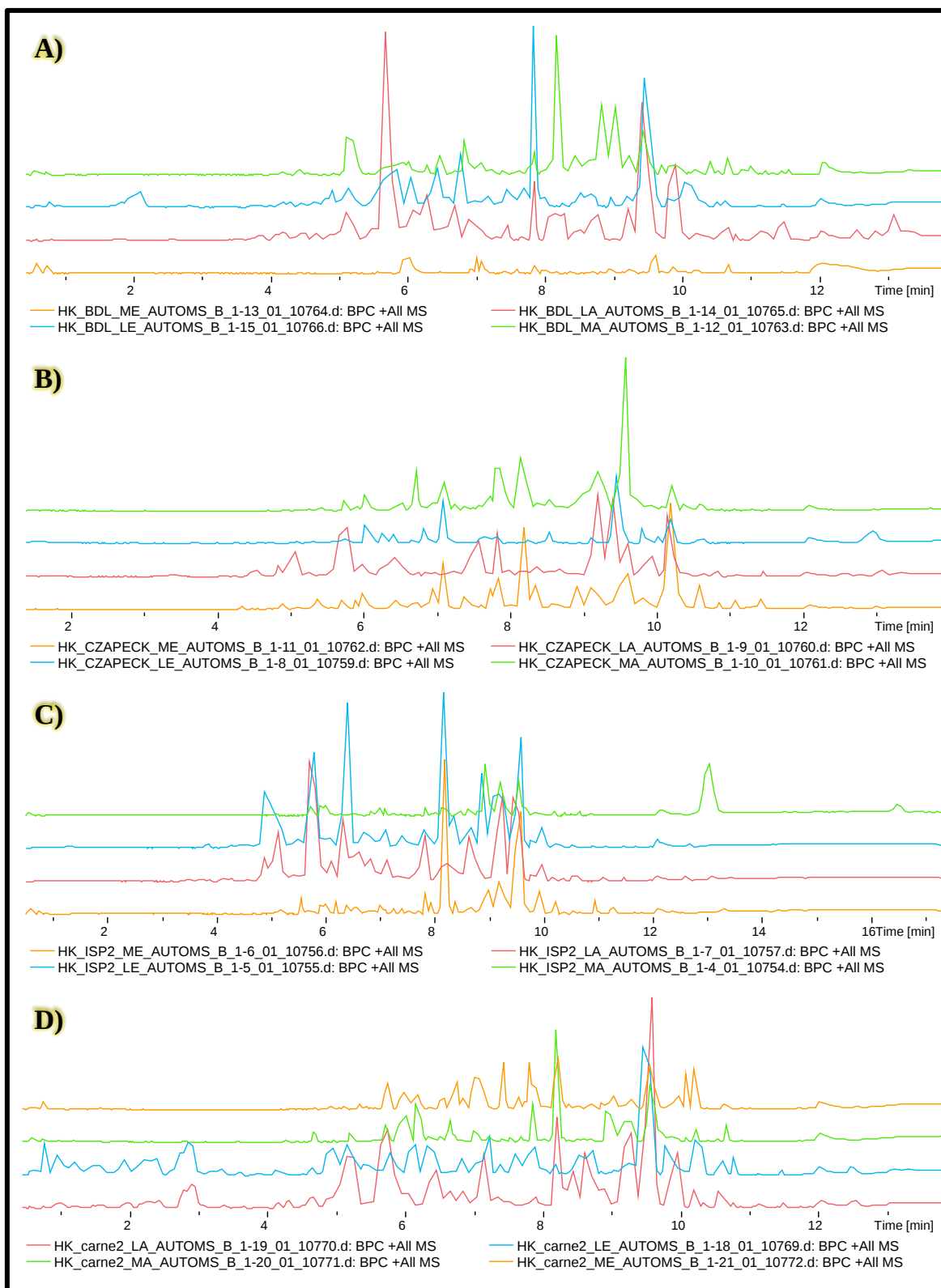


Figura 9. Perfil cromatográfico dos meios de cultivo. A) Meio BDL, B) Meio CZAPECK, C) Meio ISP2, D) Meio CARNE2. ME (Amarelo), LA (Rosa), LE (Azul), MA (Verde).

5.2 Análise metabolômica comparativa preliminar

Sobre a produção metabólica de cada meio e condição (**Tabela 2**), entre moléculas compartilhadas e específicas, o meio BDL (**Figura 9-A**) apresentou 114 moléculas, com BDL_LE contendo 54 moléculas, sendo 25 específicas; BDL_LA apresentou 47 moléculas, com 17 específicas; BDL_ME apresentou 32 moléculas, onde 12 são específicas e BDL_MA apresentou 47 moléculas, sendo 17 específicas. Em relação ao número de moléculas compartilhadas entre os extratos deste meio, LE/LA compartilharam 13 moléculas; LE/ME 6 moléculas; LA/MA 8 moléculas e ME/MA compartilharam 8 moléculas. Apenas 9 moléculas foram compartilhadas entre todos os extratos.

Sobre a produção metabólica de cada meio e condição (**Tabela 2**), entre moléculas compartilhadas e específicas, o meio BDL (**Figura 9-A**) apresentou 114 moléculas, com BDL_LE contendo 54 moléculas, sendo 25 específicas; BDL_LA apresentou 47 moléculas, com 17 específicas; BDL_ME apresentou 32 moléculas, onde 12 são específicas e BDL_MA apresentou 47 moléculas, sendo 17 específicas. Em relação ao número de moléculas compartilhadas entre os extratos deste meio, LE/LA compartilharam 13 moléculas; LE/ME 6 moléculas; LA/MA 8 moléculas e ME/MA compartilharam 8 moléculas. Apenas 9 moléculas foram compartilhadas entre todos os extratos.

O número total de moléculas no meio CZAPECK (**Figura 9-B**) foi 118, dos quais CZAPECK_LE apresentou 33, sendo 15 específicas; CZAPECK_LA apresentou 50 moléculas, sendo 18 específicas; CZAPECK_ME apresentou 56 moléculas, com apenas 16 específicas e CZAPECK_MA apresentou 15 moléculas específicas do total de 58. O número de moléculas comuns entre os extratos deste meio também foi distinto, LE/LA compartilharam 8 moléculas; LE/ME, 3 moléculas; LA/MA 14 moléculas e ME/MA compartilharam 26 moléculas. Apenas 8 moléculas foram compartilhadas entre todos os extratos.

O meio ISP2 (**Figura 9-C**) apresentou um total de 122 moléculas; ISP2_LE apresentou 62 moléculas, com 19 específicas; ISP2_LA apresentou 52 moléculas, sendo 14 específicas; ISP2_ME apresentou 66 moléculas, onde apenas 16 são específicas e ISP2_MA apresentou 49 moléculas, sendo apenas 8 específicas. Sobre o compartilhamento de moléculas, LE/LA compartilharam 18 moléculas; 12 moléculas foram compartilhadas entre LE/ME; LA/MA compartilharam apenas 3 moléculas e ME/MA compartilharam 22 moléculas. Um total de 16 moléculas foram comuns entre todos os extratos.

Tabela 2. Moléculas com seus locais de detecção. As mesmas, estão enumeradas em ordem crescente de tempo de retenção, totalizando 220 moléculas detectadas.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	0,6	222,0204 261,1790 287,1963 296,1349				x								x	x				
						x								x					
						x				x	x			x					
				x	x	x	x					x						x	
	0,8	276,1432 294,1547 310,1284 409,2180 688,3265				x								x	x			x	x
								x											
	1,0	261,1259														x	x		
	1,2	227,1409														x	x		x
	1,9	211,1466 277,1225														x			
																x			
	2,1	243,0860		x															
	2,8	247,1061		x															
	2,9	245,1300																	
																x	x		
	3,4	284,1395														x	x		
	3,9	243,0891 317,1835 350,1921	C ₁₉ H ₂₇ NO ₅ (9,14 ppm)	x															
						x								x					
																x			
	4,1	247,1465 279,0886														x	x		
						x					x					x			
	4,2	281,1654 627,2182		x															
														x					

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	4,4	401,1694								x								x	
	4,5	307,1191				x													
		309,0737			x	x						x	x						
		445,0560			x	x	x	x			x	x							
		489,2209								x								x	
	4,6	331,1190		x				x	x			x	x					x	
	4,7	293,1022				x													
		403,1743				x													
		413,2432																	x
35 (Geumsanol A)	4,9	351,1809	C ₁₉ H ₂₆ O ₆ (0,28 ppm)	x	x			x				x	x	x	x	x	x		
		445,2289								x								x	
		490,2055								x									
39 (Geumsanol C)	5,1	335,1852		x	x			x				x	x			x	x		
		353,1958	C ₁₉ H ₂₈ O ₆ (-1,98 ppm)	x	x			x				x	x	x	x	x	x		
		404,2051		x				x	x								x	x	
	5,2	390,2216										x		x					
		583,2584												x					x
	5,3	404,2083		x	x			x					x					x	
	5,4	309,1714		x				x				x				x			
		446,2173								x	x	x	x				x	x	
	5,6	335,1828		x				x										x	
		400,2486		x		x	x			x		x		x		x			

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	5,6	450,1653 568,1951		x	x					x									
52	5,7	321,1360	C ₂₂ H ₃₀ O ₆ (3,58 ppm)		x		x						x				x		
		348,1787			x			x					x				x		
		391,2135		x	x		x	x	x		x	x	x	x	x		x		
		461,2216																	x
		462,2095															x		
		528,1868				x				x	x						x	x	
		662,2111								x	x						x	x	
	5,8	307,1536		x												x			
		356,1826		x												x			
		373,1985			x			x	x				x		x		x		
		662,2080																x	
	5,9	370,2016								x	x							x	
	6,0	219,1765		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		264,2349		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		505,2116					x						x						x
		547,2332							x	x			x				x	x	
	6,1	387,1817			x							x	x				x		
	6,2	354,2164														x			
		519,2252				x								x			x	x	
70	6,3	352,2103	C ₂₂ H ₂₈ O ₅ (3,22 ppm)	x												x			
		373,2027		x	x		x		x			x	x	x	x	x	x		x
		398,3421					x												

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	6,3	414,2588		x												x			
75 (Geumsanol B)	6,4	373,1969	C ₂₃ H ₂₈ O ₇ (0,48 ppm)	x								x	x			x			
		417,1730						x											
		417,1915		x				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
		498,1351								x									x
		635,1975																x	
	6,5	448,3445					x						x	x					
		498,1351								x	x						x	x	
		528,2585								x									
		563,2104								x	x							x	
	6,6	284,6285											x	x					
		373,1993		x				x					x			x	x		
		390,1445		x															
		568,2496											x	x					
90	6,7	265,1105	C ₂₆ H ₃₁ ClN ₂ O ₇ (0,00 ppm)					x											
		342,2021										x							
		373,2028			x		x								x		x		
		390,3367					x												
		519,1898								x	x					x		x	x
	6,8	715,2760														x			x
		290,1391					x						x	x			x		
		306,1717						x											
		375,2153										x	x						

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	6,8	376,1658		x			x		x				x	x		x	x		x
		399,1785		x					x				x			x	x		
		418,3307					x							x	x				
		476,2253		x															
		561,2438									x								x
		577,1940															x		
102	6,9	311,0934		x	x	x	x		x				x	x	x	x	x		
		506,1580	C ₂₅ H ₂₈ ClNO ₈ (-0,40 ppm)	x			x				x	x			x	x			x
105	7,0	274,2761			x	x			x			x	x		x	x		x	x
		405,2296			x								x	x	x				
		505,1722	C ₂₅ H ₂₉ ClN ₂ O ₇ (3,96 ppm)										x				x		
		631,2426													x			x	x
108	7,1	318,3016		x	x	x	x		x			x		x	x	x	x		x
		399,1797	C ₂₃ H ₂₆ O ₆ (-2,76 ppm)										x	x	x			x	
478,1598																x		x	
520,1744		C ₂₆ H ₃₀ ClNO ₈ (1,15 ppm)				x					x	x						x	
536,3348							x												
112 (7-Deacetiliso- cromofilona VI)	7,2	392,1627	C ₂₁ H ₂₆ ClNO ₄ (-0,51 ppm)				x		x			x			x		x		
478,1602		C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₇ (-6,27 ppm)	x							x	x								
572,2526																		x	
	7,3	332,1411										x			x	x		x	

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	7,3	356,1843 392,1613 401,1947 517,1734					x							x	x				x
								x	x	x		x	x					x	
120	7,4	448,1526 552,3305	C ₂₃ H ₂₆ ClNO ₆ (-0,22 ppm)			x				x	x	x		x		x		x	x
							x												
123	7,5	309,0781		x	x														
		356,1831	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄ (-8,70 ppm)									x		x					
124 (Atlantinona A)		443,2409	C ₂₆ H ₃₄ O ₆ (-5,64 ppm)	x				x				x							
		598,2685												x			x	x	x
	7,6	291,1613 492,1792 554,1902 583,2945 698,2900		x				x	x			x				x		x	
										x	x							x	
							x												
132	7,7	305,1975 460,1533	C ₂₄ H ₂₆ ClNO ₆ (1,30 ppm)	x				x								x			
										x	x							x	x
134 (Isocromofilona VI)	7,8	373,2020										x	x	x					
		434,1732	C ₂₃ H ₂₈ ClNO ₅ (-0,46 ppm)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
135		462,1671	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₆ (-2,60 ppm)							x	x	x		x				x	x

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
136 (Isocromofilona IX)	7,8	476,1848 609,2734	C ₂₅ H ₃₀ ClNO ₆ (1,68 ppm)			x			x	x	x	x		x				x	x
140	8,0	302,3015	C ₂₀ H ₂₄ ClNO ₃ (-4,42 ppm)	x	x	x	x			x	x				x			x	
		346,3330		x		x				x			x					x	x
		362,1507					x				x			x	x				
141 (Penazafilona F)	8,1	490,2003	C ₂₆ H ₃₂ ClNO ₆ (1,43 ppm)		x							x	x						
		547,2196		x								x	x			x			
144 (Esclerotioramina)	8,2	360,1822	C ₂₁ H ₂₄ ClNO ₄ (2,05 ppm)		x		x		x		x			x	x		x	x	x
		390,1480		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		399,1822							x		x		x				x		
		453,3485			x		x												
		520,1732					x				x				x				
		685,3232						x											
	8,3	445,7002					x			x								x	
	8,4	261,1502						x											
		316,1543			x				x			x	x	x	x	x	x	x	x
		370,1987										x	x	x			x		
		414,1900										x					x		
		415,1779						x						x	x				x
		445,6981									x			x				x	

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	8,4	453,3486 458,3632 561,2325 622,2408					X X					X X			X	X X X			
161 (Decloroisocromofilon III)	8,5	316,1565									X				X				X
		319,1890	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ (-5,95 ppm)	X					X			X				X X X			
		415,1734							X		X							X	
		617,2206			X			X											
166	8,6	345,2046											X						
		388,1745										X					X		
		404,1610	C ₂₂ H ₂₆ ClNO ₄ (-4,45 ppm)											X					X
		441,1887							X										
	8,7	385,2024		X	X			X		X		X	X	X	X	X			X
		474,2025																X	X
		490,1955								X		X					X	X	
		575,2482										X					X		
	8,8	300,1619			X			X		X		X	X	X					
		345,2068			X														
		520,3347				X	X							X	X				
		538,1958										X						X	
177	8,9	370,1988										X					X		
		415,2126	C ₂₄ H ₃₀ O ₆ (1,20 ppm)			X	X		X					X	X				X

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	8,9	538,1962										x					x		
182 (Penazafilona A)	9,0	374,1972	C ₂₇ H ₃₄ ClNO ₆ (-4,76 ppm)				x				x			x	x				
		402,1884									x			x				x	x
		415,2085									x			x				x	
		504,2128								x		x				x		x	
183	9,1	349,1239	C ₁₉ H ₂₁ ClO ₄ (9,16 ppm)					x	x	x									
		391,1674							x	x	x			x				x	x
185	9,2	357,2069	C ₂₂ H ₂₈ O ₄ (0,84 ppm)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	9,3	383,1832		x	x	x		x	x	x				x		x		x	x
	9,4	435,2993		x	x			x	x			x	x			x	x		
		452,3258		x	x			x	x			x	x			x	x		
	9,5	402,1885									x			x	x			x	x
		439,1549								x	x							x	
		452,3202								x				x		x			
192 (Ocrefilona)	9,6	383,1855	C ₂₃ H ₂₆ O ₅ (-0,78 ppm)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	9,7	449,1737				x	x			x	x			x	x			x	x
	9,8	369,3823		x		x	x	x				x				x		x	
		393,2003										x	x						
		425,1289								x									
	9,9	259,1550			x														
		312,1595							x			x	x	x		x	x	x	x

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
199	9,9	385,1985	C ₂₃ H ₂₈ O ₅ (7,79 ppm)											x					
200 (Isocromofilona II)		391,1677	C ₂₂ H ₂₇ ClO ₄ (0,26 ppm)				x		x	x	x	x	x	x	x		x		x
201 (Isorotiorina)	10,0	381,1683	C ₂₃ H ₂₄ O ₅ (-4,98 ppm)	x				x								x			
	10,1	446,1715									x						x		x
204 (Esclerotiorina)	10,2	276,1598					x							x					
		391,1328	C ₂₁ H ₂₃ ClO ₅ (4,09 ppm)	x				x	x	x	x					x	x	x	x
		417,1471	C ₂₃ H ₂₅ ClO ₅ (0,48 ppm)			x				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		546,4041						x						x			x		
		590,4229				x		x						x			x		
	10,4	404,2075					x				x				x				
		443,1044							x	x									
	10,5	427,1636		x			x					x	x	x	x		x		x
212 (5-cloroisorotiorina)	10,6	386,2331												x					
		415,1329	C ₂₃ H ₂₃ ClO ₅ (4,09 ppm)						x	x	x					x		x	
		425,2155			x	x	x	x	x		x				x			x	x
	10,8	425,0940							x										
	10,9	697,3433												x					
216	11,1	419,1637	C ₂₃ H ₂₇ ClO ₅ (2,86 ppm)							x	x								

Continuação Tabela 2.

Molécula (i.d.)	TR	m/z [M+H] ⁺	Fórmula (Erro ppm)	BDL				CZAPECK				ISP2				CARNE 2			
				LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA	LE	LA	ME	MA
	11,5	392,1612					x				x								
	12,1	463,2804			x						x								
	13,0	610,1894						x							x				
	13,1	495,3634			x														
Total de moléculas por condição de cultivo				54	47	32	47	33	50	56	58	62	52	66	49	58	61	65	53

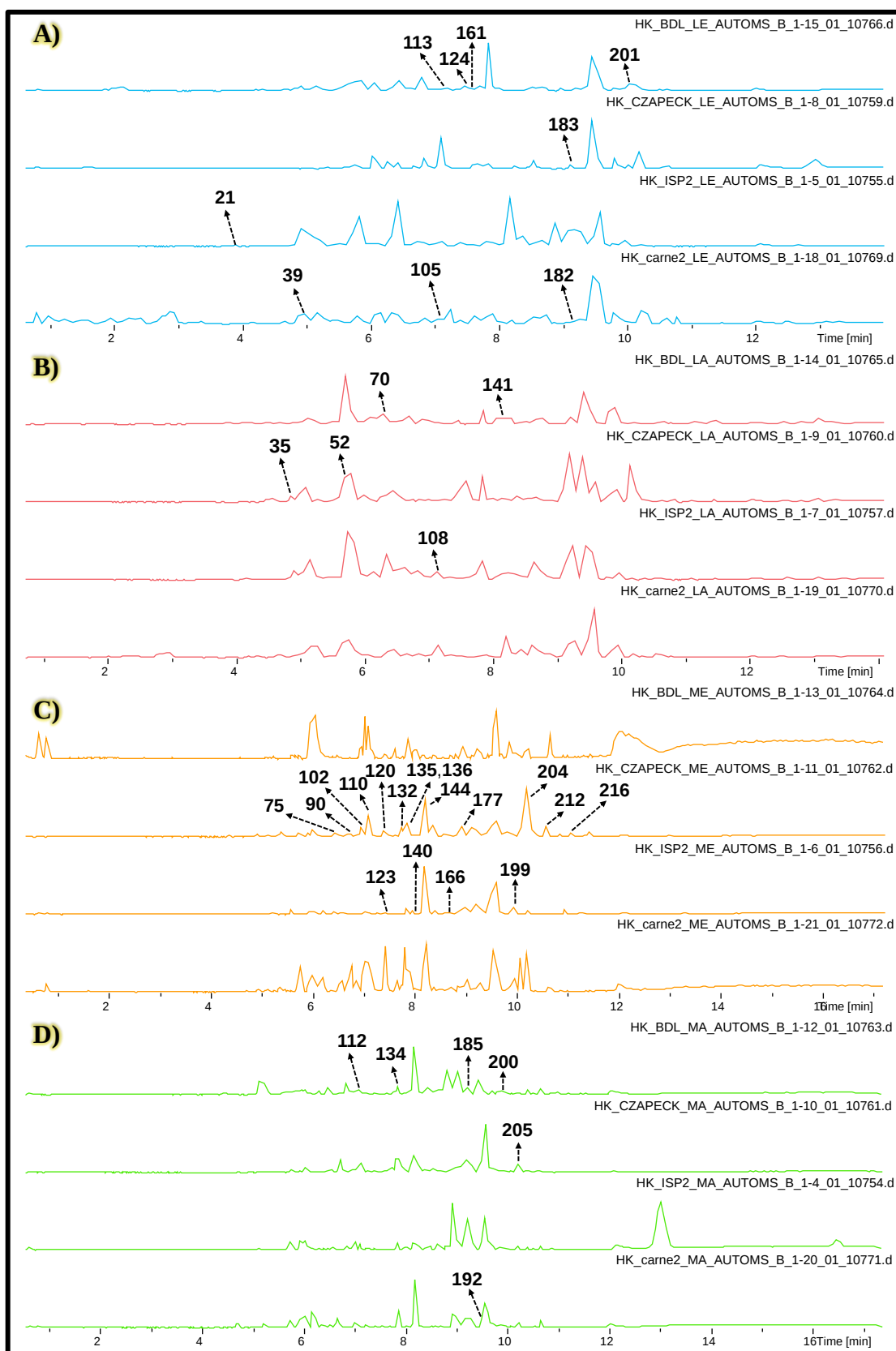


Figura 10. Representação das moléculas anotadas nos meios de cultivo. A indicação das mesmas na imagem está vinculada ao meio do qual foram retirados os espectros de MS e MS/MS presentes neste trabalho, para cada uma. Como apresentado na **Tabela 2**, essas moléculas são encontradas em diferentes meios de cultivo. A) Meios LE (azul), B) Meios LA (rosa), C) Meios ME (laranja), D) Meios MA (verde).

O meio CARNE2 (**Figura 9-D**) apresentou um total de 138 moléculas; CARNE2_LE apresentou 58 moléculas, sendo 19 específicas; CARNE2_LA apresentou 61 moléculas, sendo 26 específicas; CARNE2_ME apresentou 65 moléculas com 19 específicas e CARNE2_MA apresentou 53 moléculas com apenas 9 específicas. LE/LA compartilharam 17 moléculas; LE/ME compartilharam 12 moléculas; LA/MA compartilharam 9 e ME/MA compartilharam 25 moléculas; 10 moléculas foram comuns a todos os extratos.

A análise por condição de cultivo mostrou que moléculas também foram compartilhadas entre os quatro meios de cultivo citados acima (BDL, CZAPECK, ISP2 e CARNE2). Tanto nos extratos de LE (**Figura 10-A**) quanto LA (**Figura 10-B**), 10 moléculas foram comuns a todos os meios; em ME (**Figura 10-C**) foram compartilhadas 8 moléculas e em MA (**Figura 10-D**), 7 moléculas foram compartilhadas. Entre todos os meios de cultivo, apenas quatro moléculas foram compartilhadas entre todos os meios, isocromofilona VI (**134**), esclerotioramina (**144**), composto **185** e ocrefilona (**192**), todas são policetídeos pertencentes à subclasse das azafilonas.

Com base nos resultados, dois fatores importantes devem ser considerados. O primeiro é a fonte de carbono presente em cada meio de cultivo, desempenhando papel essencial no fornecimento dos blocos construtores para a biossíntese de metabólitos secundários (PAN et al., 2019; RUIZ et al., 2009; SINGH et al., 2017). O segundo fator é a oxigenação, apontado em alguns estudos como fundamental na biossíntese de metabólitos distintos, uma vez que aumenta a disponibilidade de O₂ a ser utilizado em reações de oxido-redução (BODE et al., 2002; PAN et al., 2019; SATO et al., 1990). Além desses, outros fatores como pH e temperatura também são essenciais para ativação de genes biossintéticos e produção de metabólitos estruturalmente diversificados, ainda que não tenham sido avaliados neste estudo (BODE et al., 2002; PAN et al., 2019; PARANAGAMA et al., 2007).

Cada vez mais, a abordagem OSMAC tem sido aplicada em estudos envolvendo microrganismos comprovando que diferentes parâmetros de cultivo afetam a produção metabólica. Estudos envolvendo espécies de fungos como, por exemplo, as pertencentes ao gênero *Penicillium* são cada vez maiores. Por meio da abordagem OSMAC utilizando *P. brocae* MA-231, endofítico derivado de mangue, foram identificados 12 alcaloides, sendo seis novos e seis conhecidos, a partir do extrato do meio de cultivo CZAPECK líquido agitado (contendo glicose, manitol, NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, glutamato de sódio, tartarato

de sódio e sal marinho), com dois apresentando atividade antimicrobiana (MENG et al., 2017).

O cultivo em meio líquido estático (contendo arroz e água destilada) de *P. allii-sativi* MCCC 3A00580, derivado do fundo do mar, produziu dois novos meroterpenoides (andrastona A e 16-*epi*-citreo Hibridiona A) e um conhecido (citreo Hibridiona A), onde andrastona A apresentou atividade citotóxica (XIE et al., 2019). Alterando o meio de cultivo de arroz para aveia (meio líquido estático; contendo aveia, água e sal marinho), 14 meroterpenoides (nove novos e cinco conhecidos) da subclasse das andrastonas foram identificados a partir do extrato da mesma cepa, com um apresentando atividade antialérgica (XIE et al., 2021). Pela adição de CuCl₂ ao meio de cultivo, dois novos derivados de citrinina (pencitrina e pencitrinol) e três outros compostos conhecidos (citrinina e penicitrinona A e E) foram produzidos por *P. citrinum* Salicorn 46, endofítico isolado de *Salicornia herbacea* Torr.; pencitrina e penicitrinona E apresentaram atividade anticâncer (HU et al., 2017).

Foi observado que *Penicillium* sp. F23-2, derivado do fundo do mar, produziu diferentes metabólitos quando submetido a diferentes condições de cultivo. Quando cultivado em meio líquido estático (contendo batata, glicose, manitol, maltose, peptona, extrato de levedura e água do mar), a cepa produziu quatro novos alcaloides incluindo dois novos análogos de meleagrina, meleagrina B e C, e duas novas dicetopiperazinas, roquefortinas F e G, junto com seis novos diterpenos, conidiogenonas B-G; meleagrina B e conidiogenona C apresentaram atividade citotóxica (DU et al., 2009). A mesma cepa, ao ser cultivada em meio PYG (contendo peptona, fermento em pó, glicose e água do mar) agitado, apresentou grande mudança quanto a produção metabólica, com produção de cinco novos sorbicilinoídes, policetídeos com nitrogênio em sua estrutura, denominados de sobicilaminas A-E, bem como outros dois conhecidos, bisvertinolona e rezisanona C (GUO et al., 2013). Utilizando a mesma cepa, agora em meio líquido estático (contendo arroz e água do mar), foram identificados cinco novos policetídeos análogos do ácido ambuico, denominados de peniciclonas A-E, que apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (GUO W. et al., 2015). Além de *Penicillium*, outros gêneros fúngicos foram e continuam sendo estudados por meio de abordagem OSMAC, como *Xylaria* (VIEIRA et al., 2021), *Fusarium* (HEMPHILL et al., 2017), *Aspergillus* (ABDELWAHAB et al., 2018; ÖZKAYA

et al., 2018; SI et al., 2018); *Talaromyces* (LIU et al., 2016), *Trichoderma* (YU J.-Y. et al., 2021), *Pestalotiopsis* (YU X. et al., 2021), entre vários outros.

5.3 Anotação espectral manual

Das 220 moléculas detectadas, apenas 37 foram anotadas (**Figura 10**). A maioria das moléculas anotadas pertence à classe dos policetídeos, especificamente, às azafilonas. As azafilonas constituem um grande grupo de pigmentos fúngicos que compartilham uma estrutura em comum: são caracterizados pela presença de um núcleo bicíclico pirano-quinona, altamente oxigenado. Também são altamente reativas na presença de amônia, característica que deu origem ao nome, além de poderem reagir com grupos amino de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, tornando-se vermelhas na presença de aminas primárias devido à troca do oxigênio do anel pirano por nitrogênio (**Figura 11**) (STADLER et al., 1995; GAO et al., 2013; PAVESI et al., 2021). O grupo é bastante diversificado e possui análogos oxigenados/nitrogenados, ambos com ou sem átomo de cloro, e/ou com modificações nas insaturações da cadeia lateral. Apresentam diversas atividades biológicas como inibição de enzimas, atividade antimicrobiana, antiviral, citotóxica, anticâncer, anti-inflamatória e antioxidante (GAO et al., 2013; CHEN et al., 2020). Essas moléculas estão distribuídas nos diferentes meios de cultivo como mostrado na **Tabela 2**, onde as mesmas, estão enumeradas em um sistema crescente, obedecendo os tempos de retenção a que se encontram.

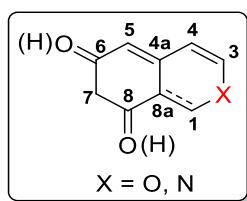


Figura 11. Estrutura geral das azafilonas (GAO et al., 2013).

Por meio das redes moleculares e dos dados de fragmentação foi possível caracterizar diferentes análogos de azafilonas. Inicialmente, buscou-se estudar as fragmentações das moléculas previamente conhecidas, e assim, validar as fragmentações de modo a ser estabelecida a rota de fragmentação das *seeds* (isocromofilona VI (**134**) e esclerotioramina (**144**)), isoladas e descritas no trabalho de dissertação de Souza (2012). Com isto, foi possível investigar de maneira comparativa as fragmentações dos demais análogos.

O espectro de MS da esclerotioramina (**144**) apresentou m/z 390,1480, consistente com a fórmula $C_{21}H_{24}ClNO_4$ (2,05 ppm) (**Figura 12-A**). Em seu espectro de varredura de íons produtos, observam-se diversos íons fragmentos (**Figura 12-B**) resultantes de perdas características, como perdas de monóxido de carbono (CO, - 28 u) e água (H₂O, - 18 u). A rota de fragmentação do composto **144** inicia-se com a fragmentação no grupo acetil conectado ao carbono C-7. Neste ponto, são possíveis duas fragmentações competitivas, na qual a primeira (favorecida) é a perda de um grupo ceteno (C₂H₂O, - 42 u, m/z 390 $\rightarrow$ m/z 348) e a segunda é perda neutra de ácido acético (C₂H₄O₂, - 60 u, m/z 390 $\rightarrow$ m/z 330), o que leva à formação dos íons fragmentos m/z 348 e m/z 330, respectivamente. Adicionalmente, o íon m/z 330 também pode ser formado pela perda de água, a partir do fragmento em m/z 348. Com relação a este último fragmento, o mesmo pode sofrer a eliminação de ácido clorídrico (HCl, - 36 u), em um mecanismo proposto entre o átomo de cloro e a carbonila protonada adjacente, o que leva a formação do fragmento com m/z 312 (m/z 348 $\rightarrow$ m/z 312), o qual representa um cátion vinílico, e consequentemente reforça sua estrutura. Outra perda neutra importante observada foi a perda dirigida por carga de CO, o que levou à formação do fragmento em m/z 302 a partir do m/z 330.

Em seguida, a formação de espécies de tamanho inferior a partir de íons fragmentos indica ser por mecanismos homolíticos. Destes, cita-se a perda radicalar de metila (CH₃, - 15 u) e de etila (C₂H₅, - 29 u), a partir do fragmento m/z 302, que respectivamente, fornecem os íons m/z 287 e m/z 273. Para estes, foi proposta a formação de íons distônicos, nos quais o fragmento é estabilizado por meio de isomerização alílica radicalar. Além destes, propõe-se que o fragmento em m/z 258 seja formado a partir de uma perda radicalar de metila do fragmento m/z 273 e também pela perda de etila do fragmento m/z 287. A rota de fragmentação é apresentada na **Figura 13**.

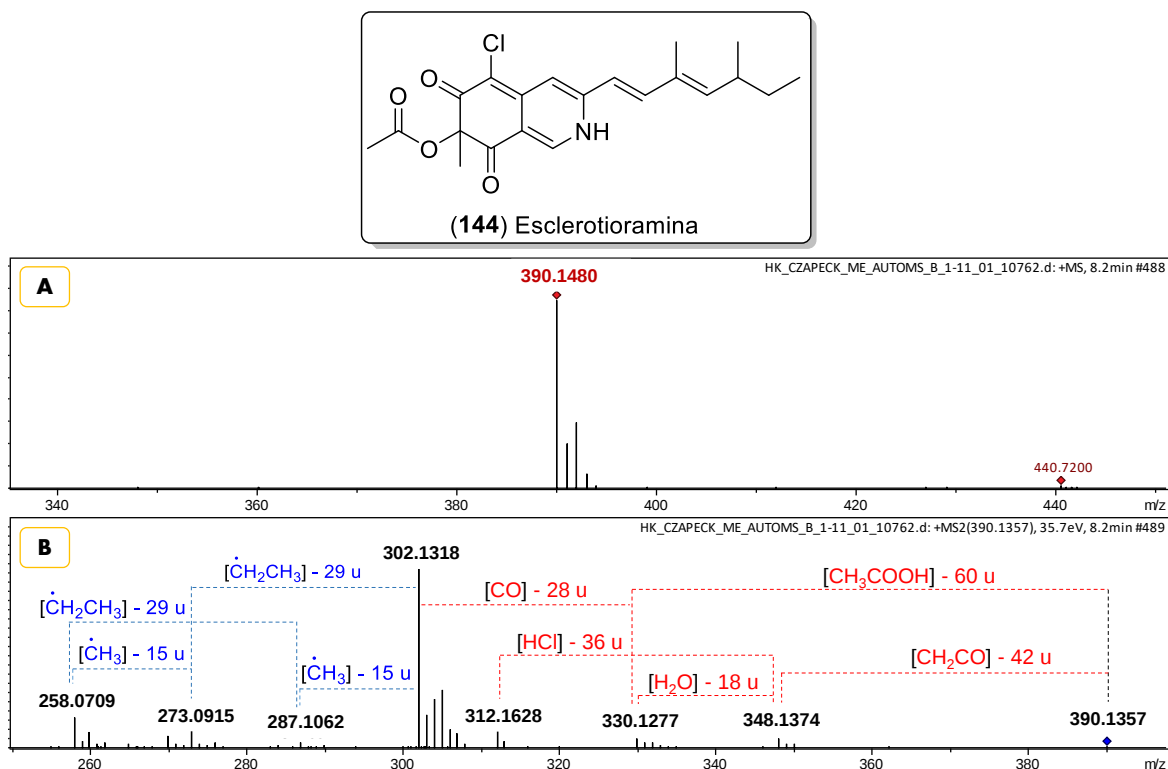


Figura 12. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de esclerotioramina (144).

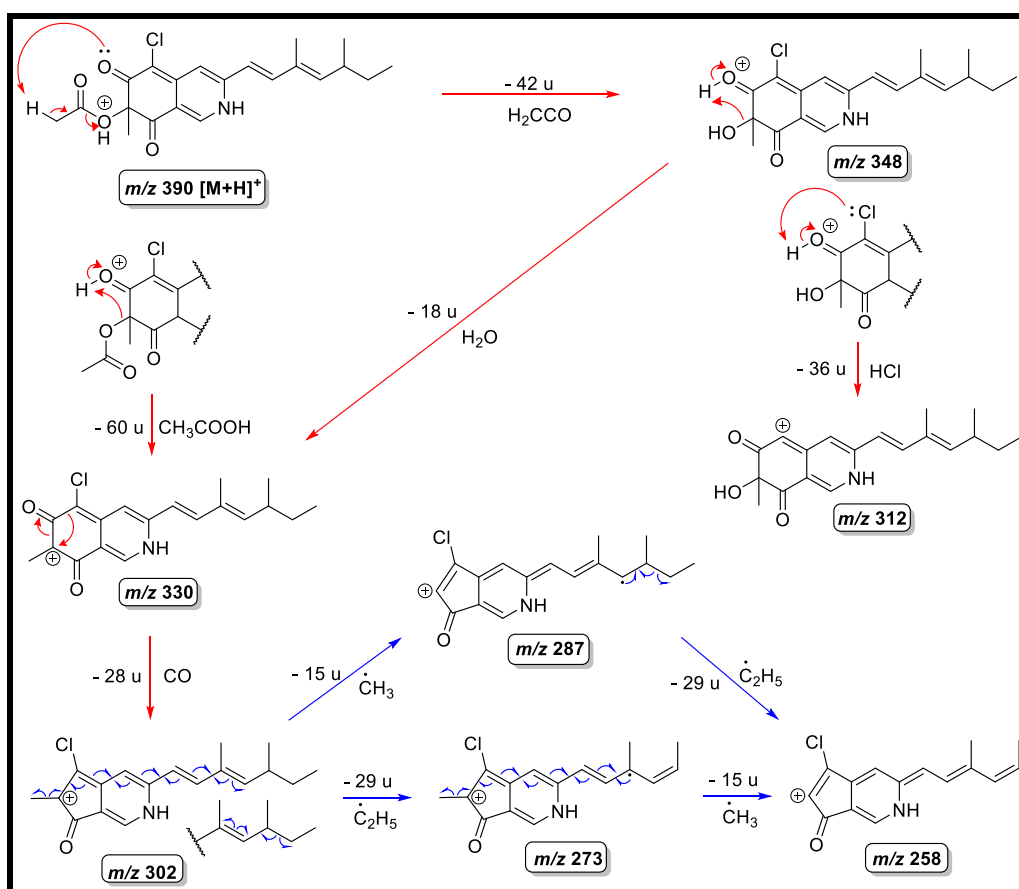


Figura 13. Proposta de mecanismo de fragmentação de esclerotioramina (144).

De forma semelhante à esclerotioramina, ocorre a fragmentação da isocromofilona VI (**134**). A diferença de massas entre ambas é de 45 u e se deve por uma substituição no grupo funcional amina, formando amina terciária pela incorporação de etanol na estrutura. O espectro de MS dessa molécula apresentou m/z 434,1732 para a fórmula $C_{23}H_{28}ClNO_5$ (-0,46 ppm) (**Figura 14-A**). Íons fragmentos característicos são observados no espectro de fragmentação (**Figura 14-B**). Desta forma, a fragmentação acontece pela perda inicial de ceteno ou ácido acético para formar os fragmentos m/z 392 e m/z 374, respectivamente. Este último também pode ser formado pela perda de água a partir do íon fragmento m/z 392 (m/z 392 $\rightarrow$ m/z 374). Há também perdas neutras características, pelos mesmos mecanismos discutidos acima para esclerotioramina. Tais perdas neutras são de HCl (m/z 392 $\rightarrow$ m/z 356) e CO (m/z 374 $\rightarrow$ m/z 346). Este último pode sofrer perda de enol (C_2H_2O , - 44 u, m/z 346 $\rightarrow$ m/z 302) por um mecanismo envolvendo os elétrons livres do nitrogênio. Há também perdas radiculares, radical etila (C_2H_5 , m/z 346 $\rightarrow$ m/z 317) e metila (CH_3 , m/z 317 $\rightarrow$ m/z 302) ou perda de metila (m/z 346 $\rightarrow$ m/z 331) e posterior perda de etila (m/z 331 $\rightarrow$ m/z 302) como apresentando na **Figura 15**.

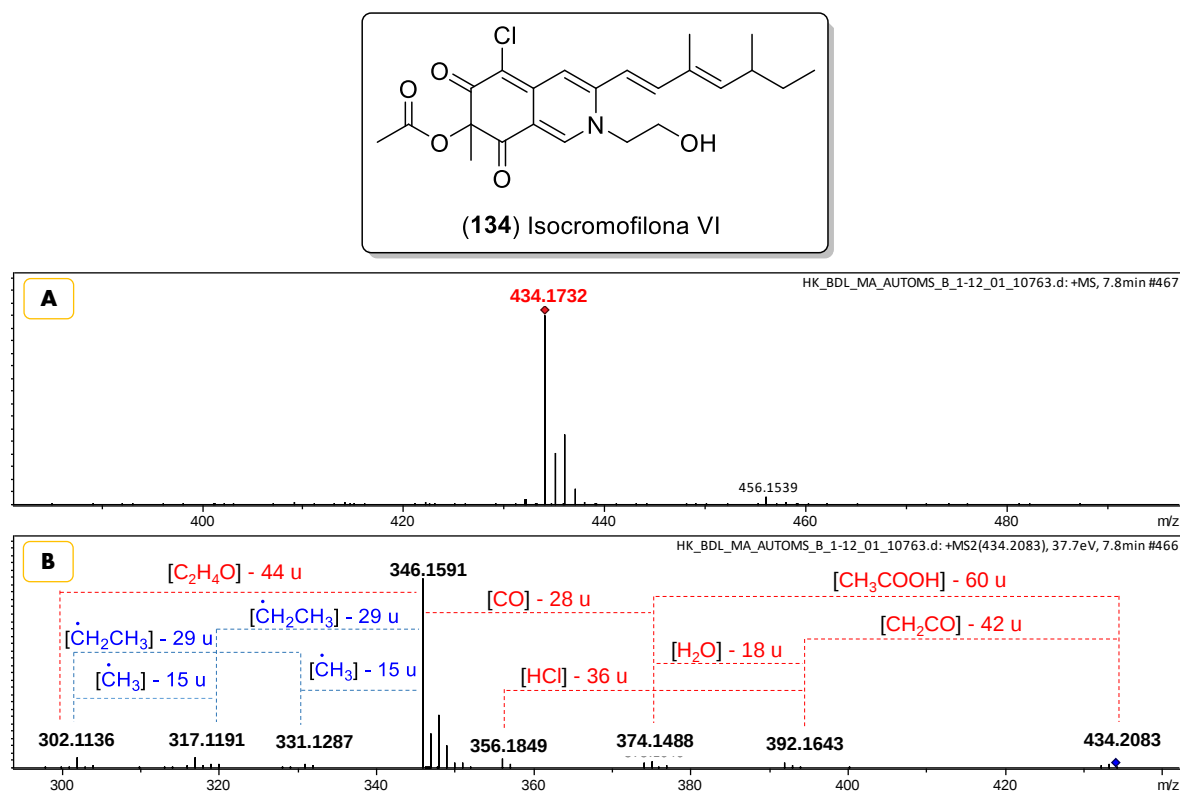


Figura 14. Espectro de MS (**A**) e MS/MS (**B**) de isocromofilona VI (**134**).

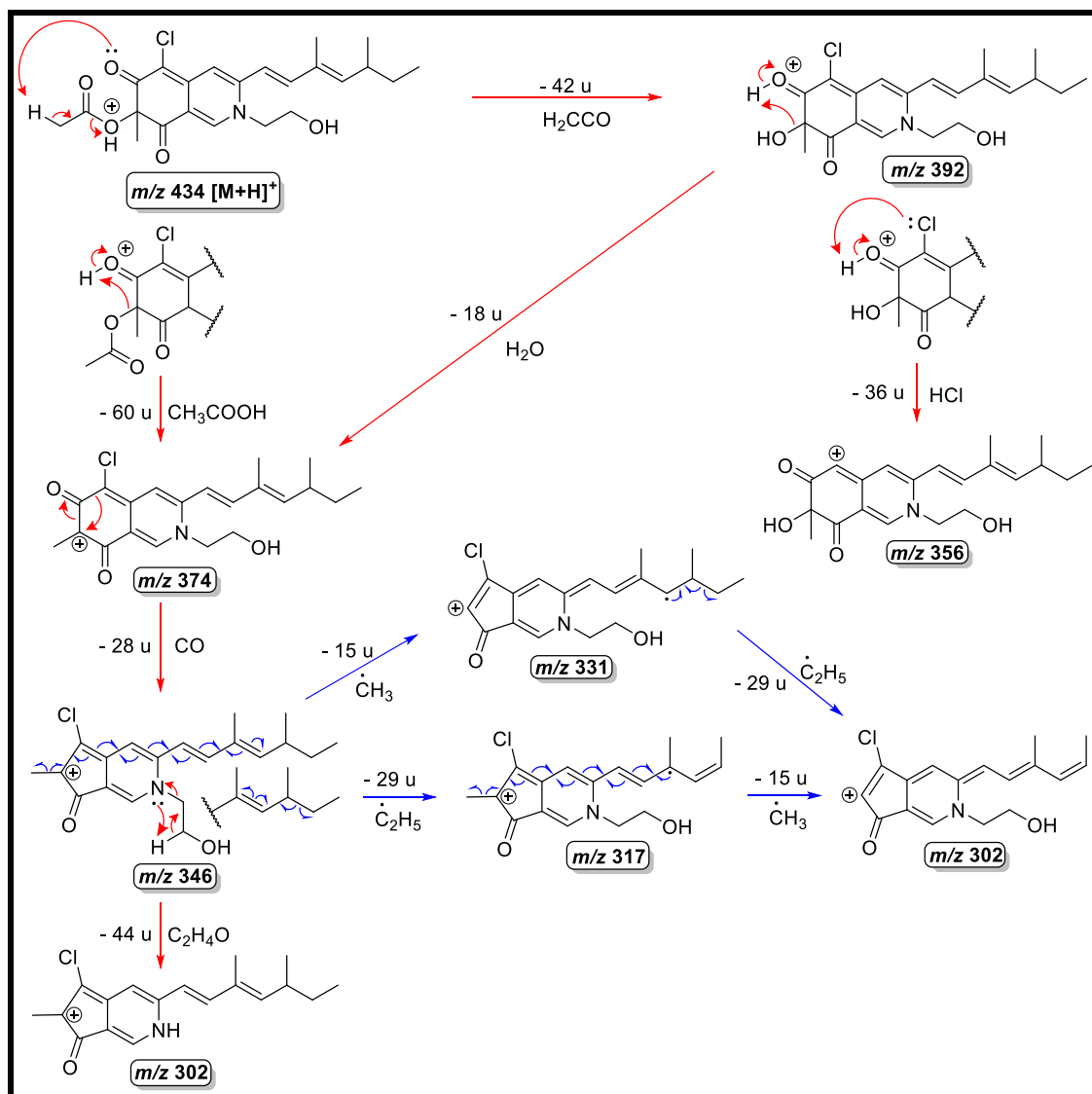


Figura 15. Proposta de mecanismo de fragmentação de isocromofilona VI (134).

O geumsanol A (35) ($C_{19}H_{26}O_6$, 0,28 ppm) (Figura 16-A), possui um esqueleto semelhante às *seeds*, mas contém modificações importantes na cadeia aberta e no anel quinona, como a presença de duas hidroxilas, uma ligada ao C-11 e outra em C-12, e uma redução da carbonila a álcool em C-8. Essa estrutura sofre uma fragmentação inicial diferente das *seeds*, mas ainda sofre perdas neutras de H_2O e CO . Inicialmente, há uma perda neutra de grupo aldeído ($C_5H_{10}O$, - 86 u), por heterólise da porção periférica da cadeia, originando o fragmento m/z 265. A partir deste, ocorre a perda característica de água e formação favorecida de cátion terciário em C-7 (m/z 265 $\rightarrow$ m/z 247). Adicionalmente, ocorrem perdas competitivas a partir de m/z 247. A primeira é a perda favorecida de CO para formação de cátion estabilizado por isomerização alílica (m/z 247 $\rightarrow$ m/z 219). A segunda, menos favorecida, acontece a partir de um rearranjo intramolecular para posterior saída de

água com formação de cátion vinílico (m/z 247 $\rightarrow$ m/z 229). Nas **Figuras 16-B e 17**, estão apresentados os íons produtos identificados e a rota de fragmentação, respectivamente.

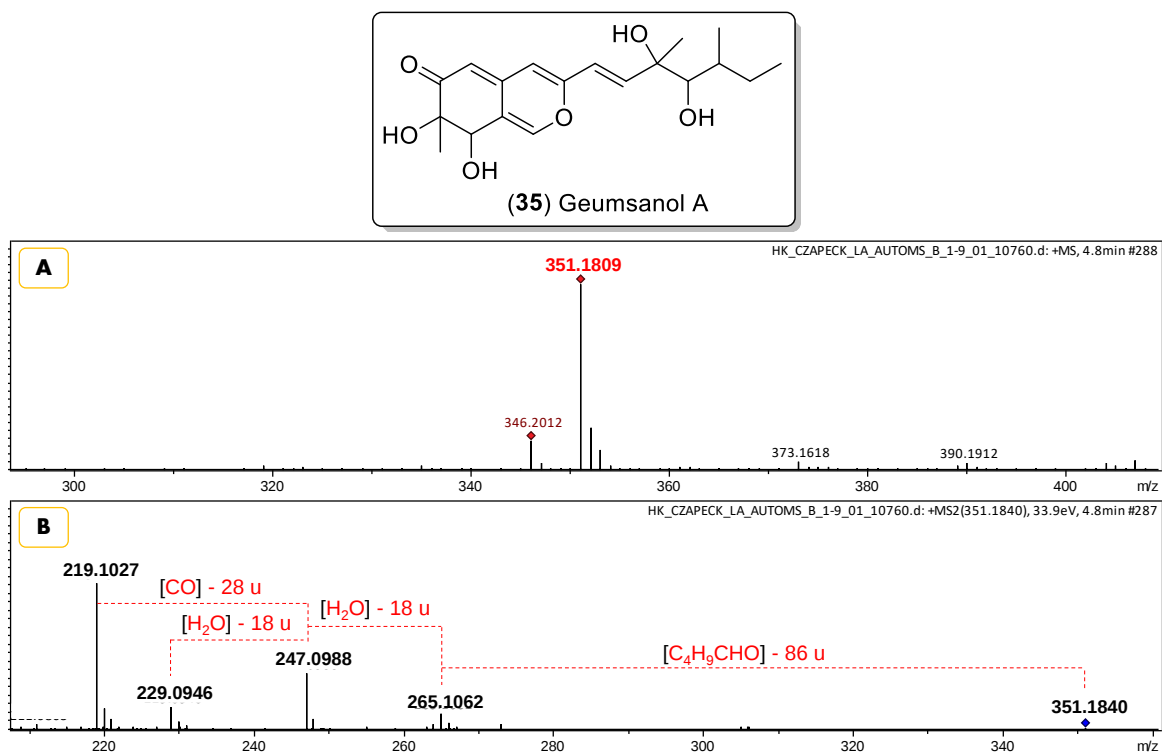


Figura 16. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de geumsanol A (35).

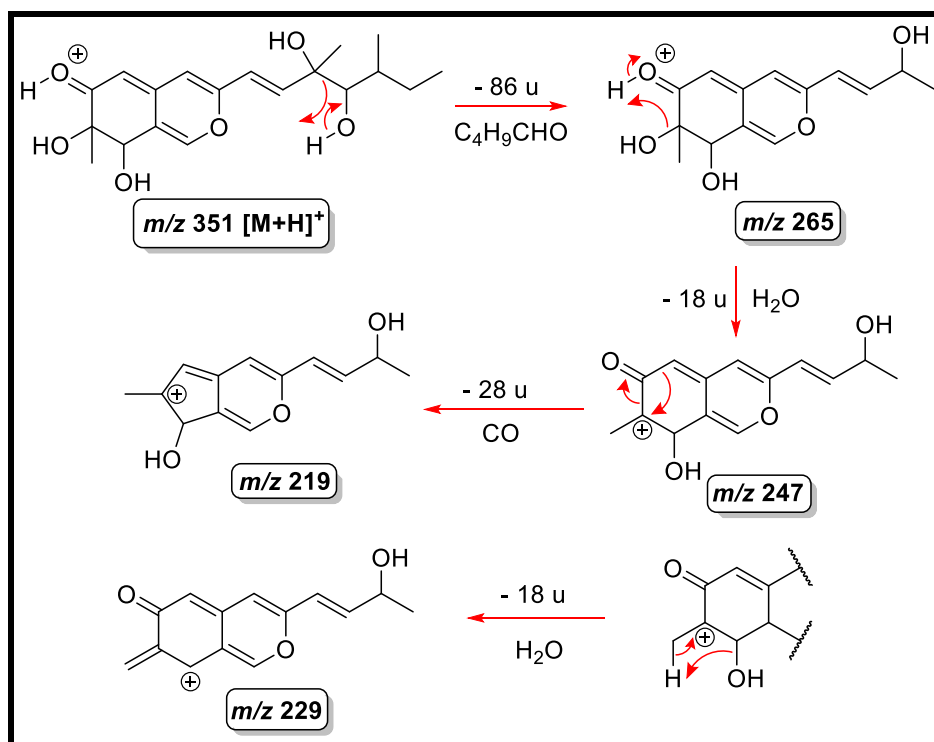


Figura 17. Proposta de mecanismo de fragmentação de geumsanol A (35).

A isocromofilona IX (**136**) apresentou em seu espectro de MS m/z 476,1848 para a fórmula $C_{25}H_{30}ClNO_6$ (1,68 ppm). Sua fragmentação ocorre de forma semelhante às perdas discutidas para escleritoramina e isocromofilona VI, e está apresentada nas **Figuras 18 e 19**.

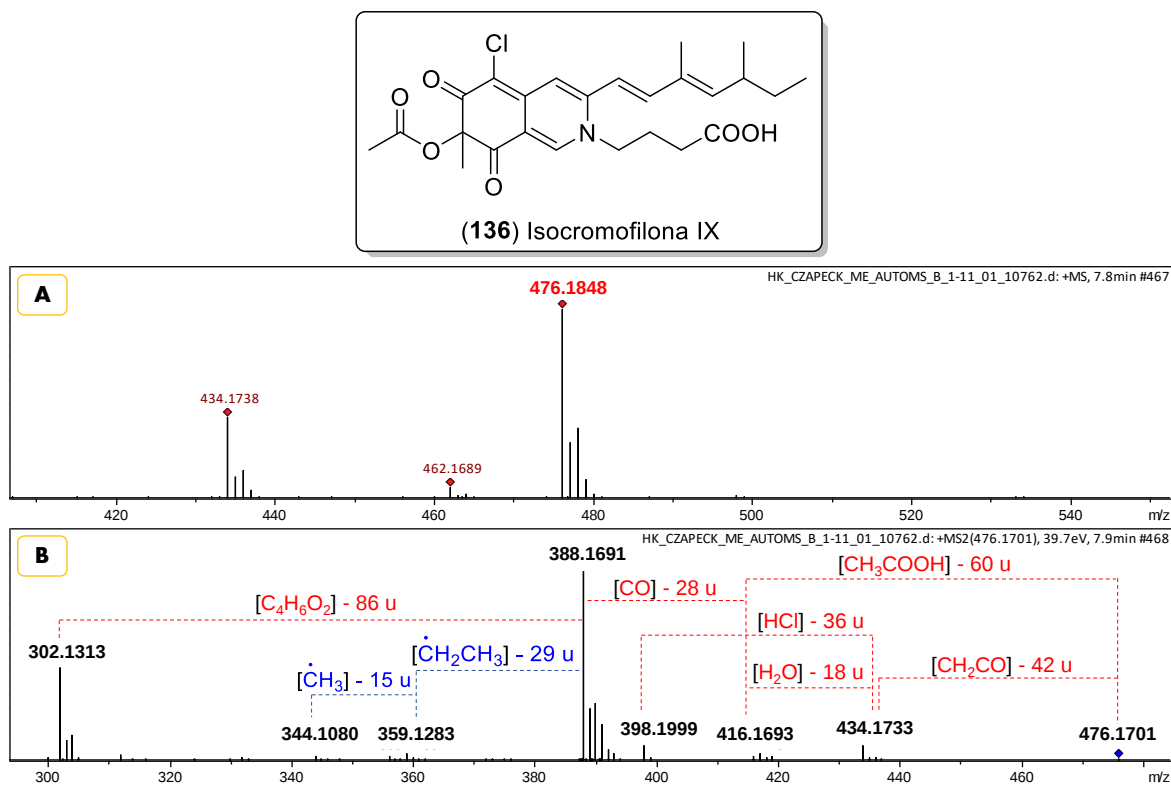


Figura 18. Espectro de MS (**A**) e MS/MS (**B**) de isocromofilona IX (**136**).

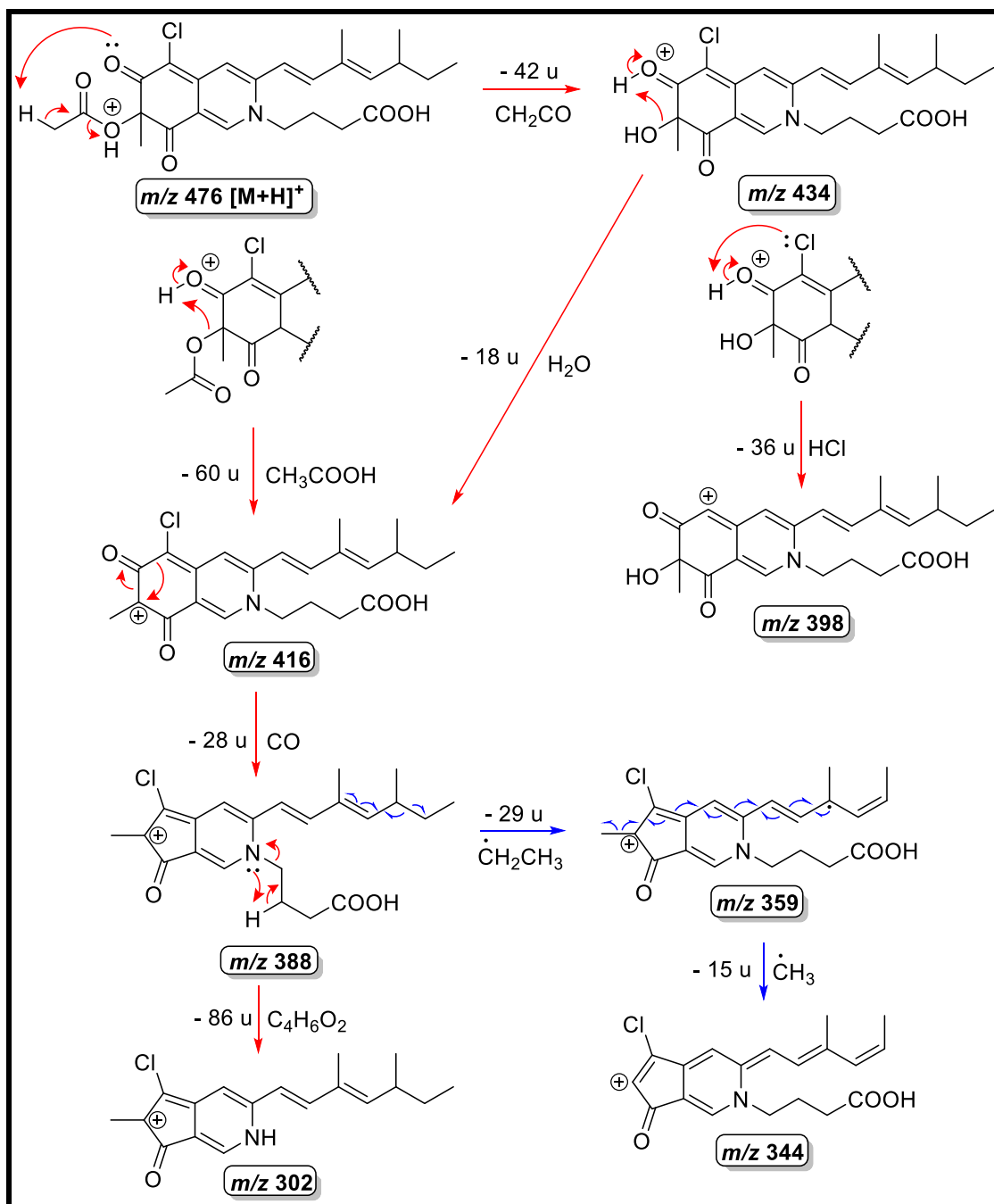


Figura 19. Proposta de mecanismo de fragmentação da isocromofilona IX (136).

A ocrefilona (192) também compartilha as mesmas perdas descritas para as moléculas citadas anteriormente. Seu espectro de MS (**Figura 20-A**) apresenta m/z 383,1855, com erro de -0,78 ppm, para a fórmula $C_{23}H_{26}O_5$. Observações no espectro dos íons produtos (**Figura 20-B**) indicam duas rotas iniciais competitivas de fragmentação. A primeira, menos favorecida, envolve a perda de radical etila em C-13, com formação de íon distônico estabilizado por isomerização alílica radicalar de m/z 354. A segunda rota é mais favorecida, com formação de m/z 339 a partir da perda de acetaldeído (C_2H_4O , -44 u). Todas

as perdas posteriores, seguindo a proposta de fragmentação, são perdas características citadas anteriormente (**Figura 21**).

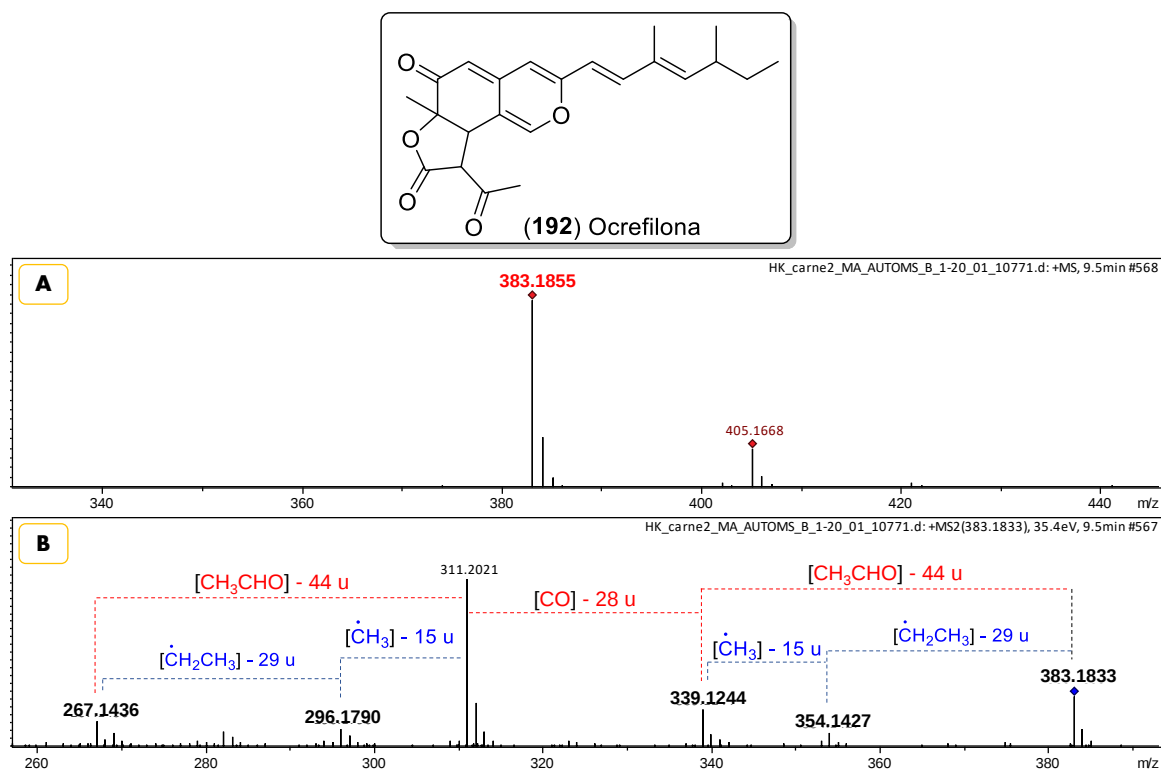


Figura 20. Espectro de MS (**A**) e MS/MS (**B**) de ocrefilona (**192**).

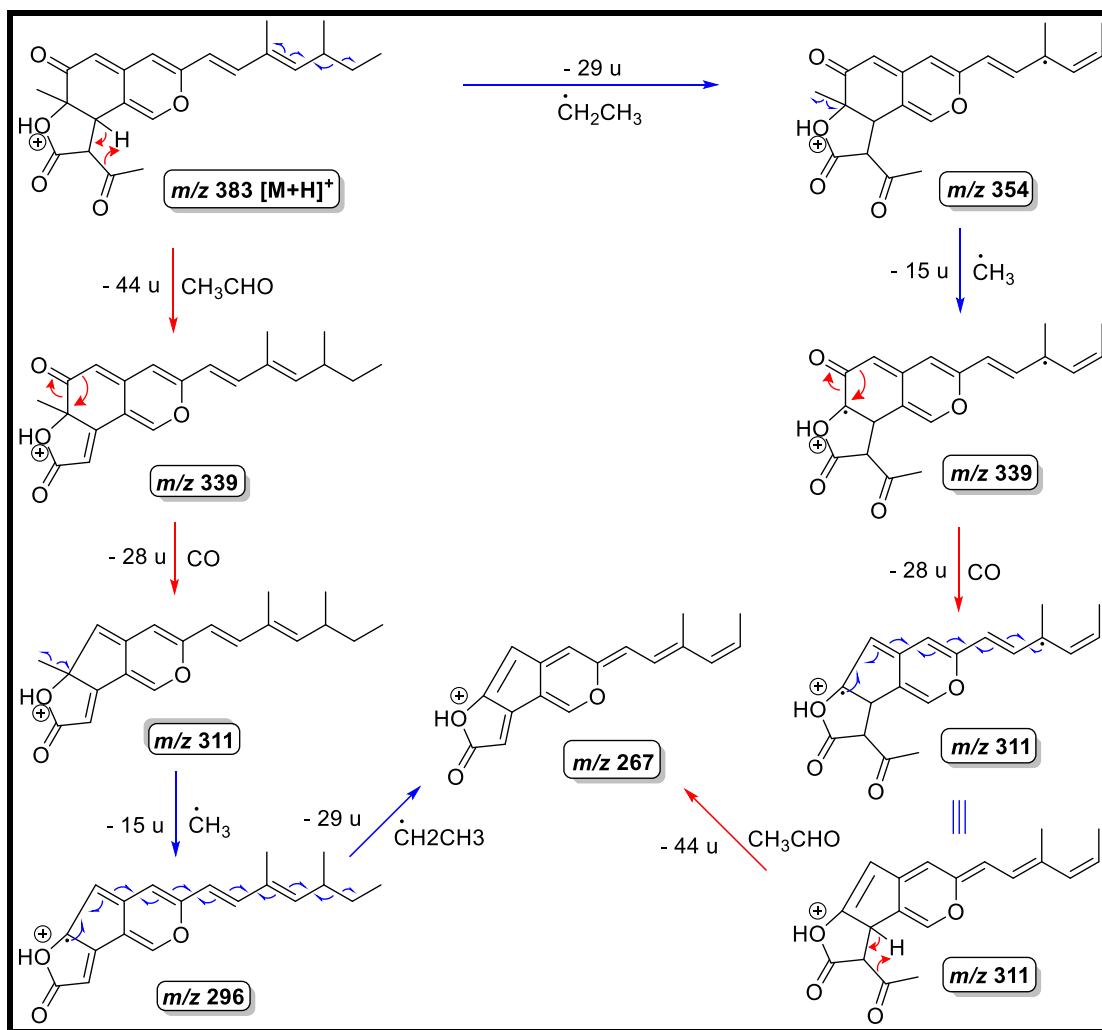


Figura 21. Proposta de mecanismo de fragmentação de ocrefilona (192).

A isocromofilona II (200) apresentou m/z 391,1677 em seu espectro de MS (**Figura 22-A**), consistente para a fórmula $C_{22}H_{27}ClO_4$ (0,26 ppm). Seu espectro de fragmentação (**Figura 22-B**) também possui fragmentos resultantes de perdas neutras de H_2O e CO e perdas radiculares. Uma segunda perda de CO se deve à presença de outro grupo carbonila na estrutura (m/z 316 $\rightarrow$ m/z 288). A rota de fragmentação está apresentada na **Figura 23**.

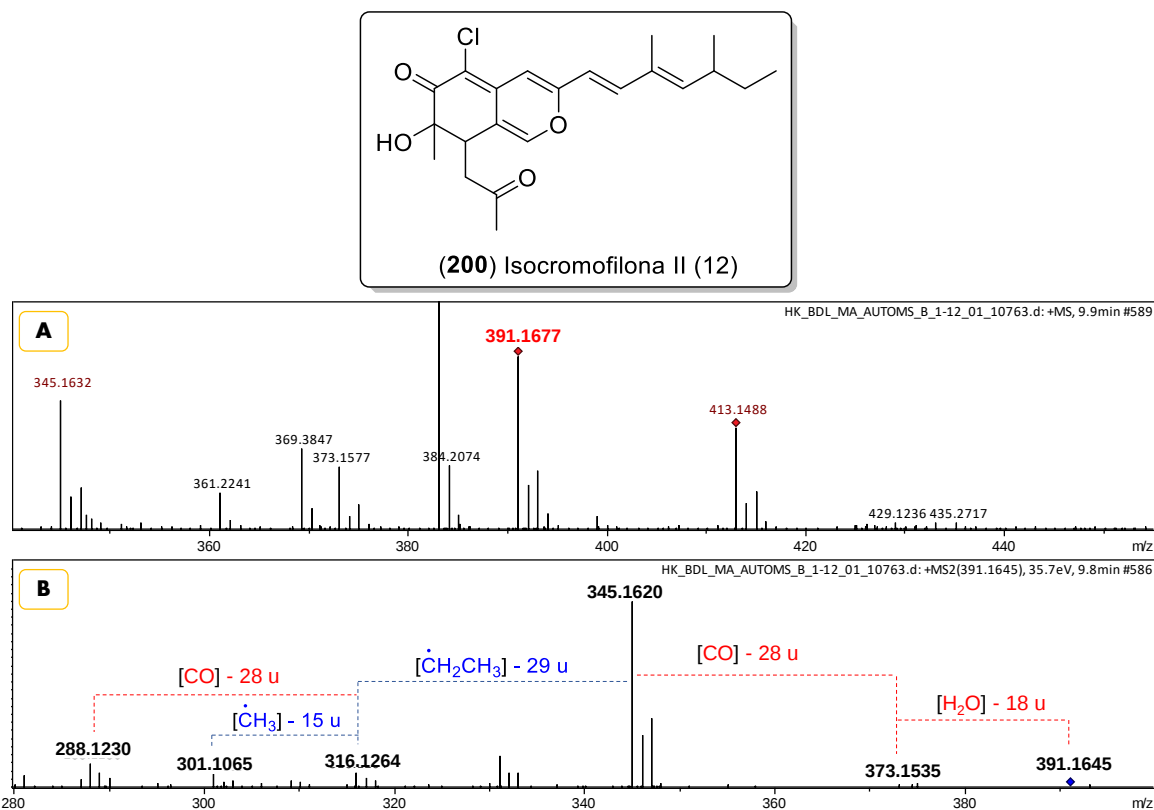


Figura 22. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de isocromofilona II (200).

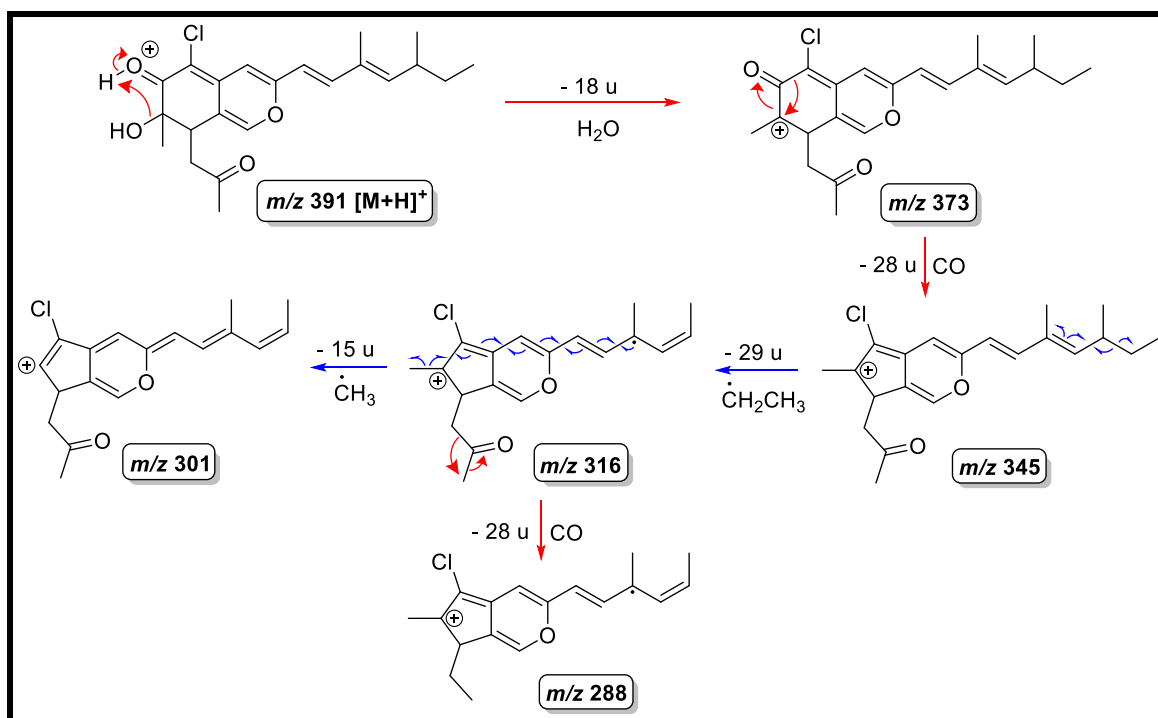


Figura 23. Proposta de mecanismo de fragmentação de isocromofilona II (200).

A esclerotiorina (204) apresentou em seu espectro de MS m/z 391,1328 (Figura 24-A) consistente com a fórmula $C_{21}H_{23}ClO_5$ (4,09 ppm). Em seu espectro de íons

fragmentos (**Figura 24-B**), apresentou padrões de perdas neutras e radiculares discutidas anteriormente.

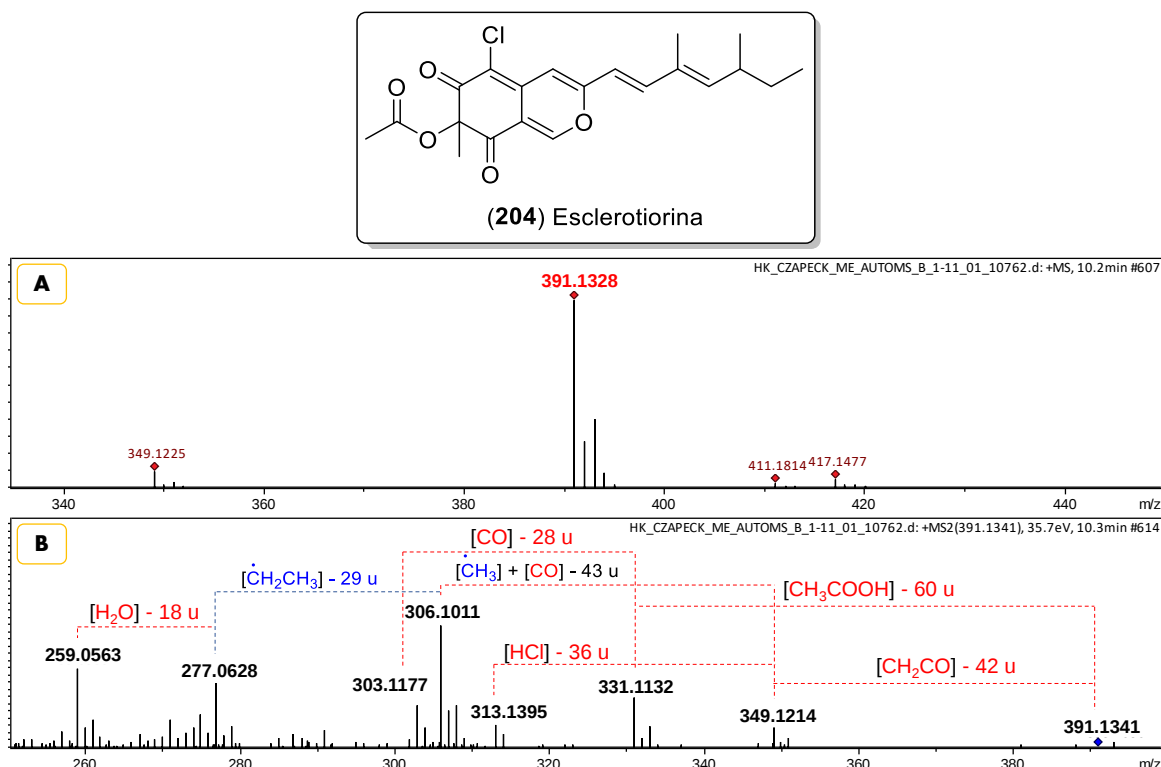


Figura 24. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de esclerotiorina (204).

A atlantinona (124), um meroterpenoide de rara ocorrência, também foi encontrada em três meios de cultivo (BDL, CZAPECK e ISP2). Em seu espectro de MS (**Figura 25-A**), apresentou m/z 443,2409 com erro de -5,64 ppm. Apesar do erro significativo, seu espectro de íons produtos (**Figura 25-B**) é consistente com a fórmula $C_{26}H_{34}O_6$. Sua rota de fragmentação (**Figura 26**) inicia com perda de metanol (CH_3OH , - 32 u) e formação do fragmento m/z 411. Este, por sua vez, sofre um rearranjo com abertura do heterociclo, captura de um próton do carbono adjacente e formação de uma ligação dupla carbono-carbono. A partir do fragmento m/z 411, pode haver três rotas de fragmentação para a formação do íon m/z 365. A primeira é a perda de H_2O da porção ácida da estrutura e formação do íon m/z 393 (m/z 411 $\rightarrow$ m/z 393). Este sofre perda de CO e forma o cátion terciário m/z 365 (m/z 393 $\rightarrow$ m/z 365). A segunda inicia com a perda de CO e formação do cátion terciário m/z 383 (m/z 411 $\rightarrow$ m/z 383), e, posteriormente, sofre perda de H_2O e forma o íon m/z 365 (m/z 383 $\rightarrow$ m/z 365). A terceira rota é a perda de ácido fórmico (CH_2O_2 , - 46 u) e formação do íon m/z 365 (m/z 411 $\rightarrow$ m/z 365). Em seguida, há perda de CO dirigida

por carga e formação do cátion terciário de m/z 337, que novamente sofre perda de CO, originando também o cátion terciário de m/z 309.

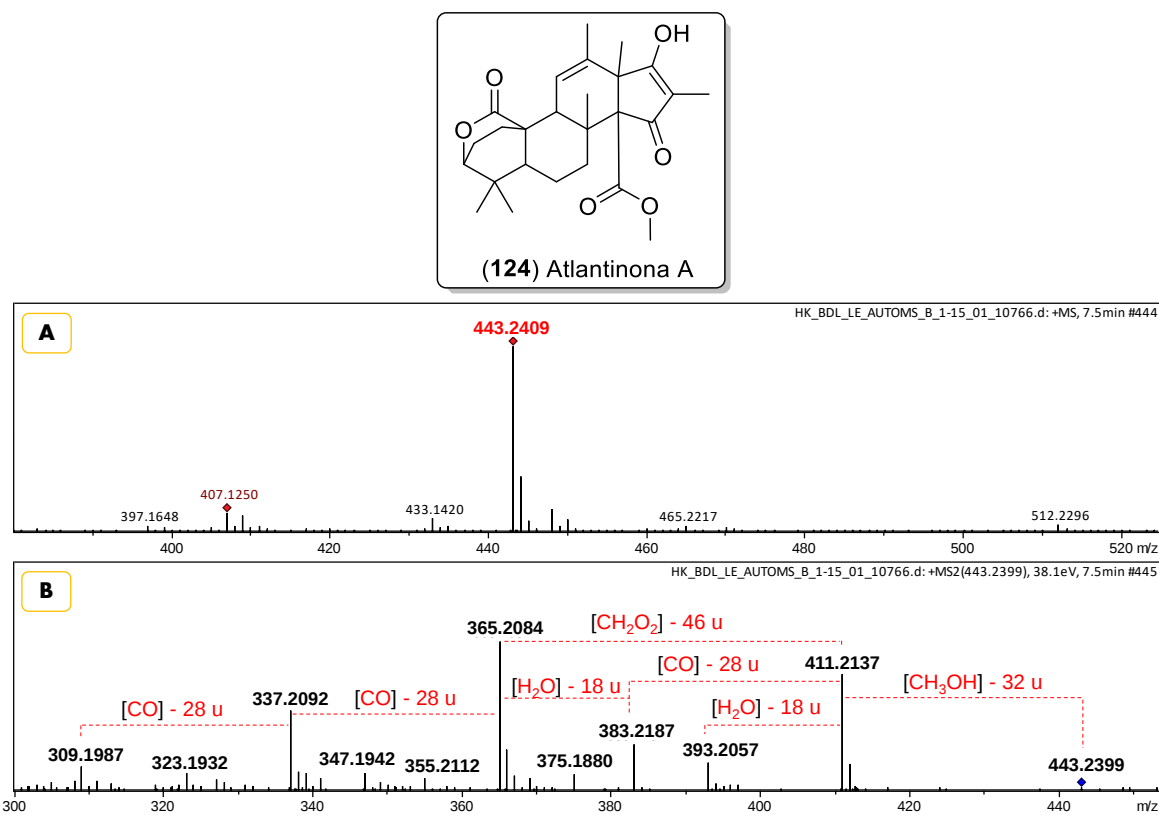


Figura 25. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de atlantinsona A (124).

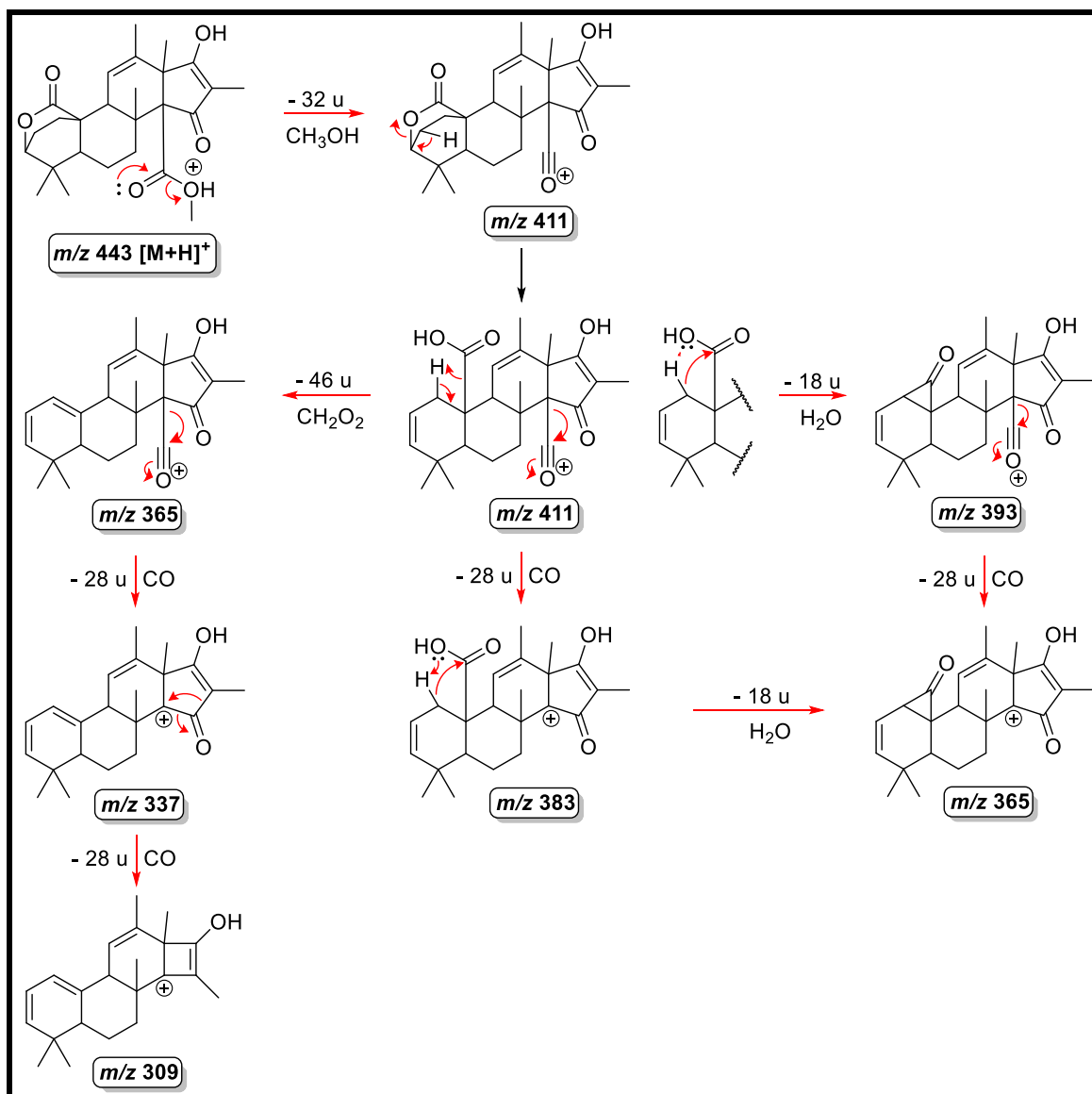


Figura 26. Proposta de mecanismo de fragmentação de atlantinona A (124).

Os análogos de azafilonas apresentam não só modificações na cadeia lateral, mas também, diversas modificações combinadas no mesmo arcabouço (**Figura 27**), como a presença de grupo acil, hidroxila ou metoxila em **R₁** e cetona ou hidroxila em **R₂**, anel lactona entre **R₁-R₂**, Cl ou H na posição **X**, O ou N funcionalizado na posição **Y**, hidroxila em **R₃** e **R₄** com ausência de ligação dupla entre **C11-C12**.

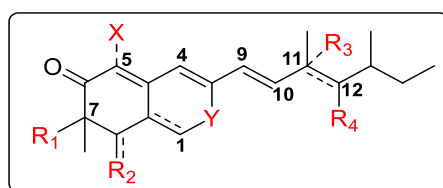


Figura 27. Estrutura geral das azafilonas anotadas.

Utilizando as redes moleculares, foram anotados três análogos a partir da esclerotioramina (**134**), um análogo não clorado **123** (m/z 356,1831 $[M+H]^+$, $C_{21}H_{25}NO_4$, cos 0,75; **Figura 28**); o análogo **140** (m/z 362,1507 $[M+H]^+$, $C_{20}H_{24}ClNO_3$, cos 0,75; **Figura 29**) com metoxila em **R**₁; e o análogo **166** (m/z 404,1610 $[M+H]^+$, $C_{22}H_{26}ClNO_4$, cos 0,85; **Figura 30**). O composto **123** compartilha perdas neutras comuns de 60, 42, 28 e 18 Da, correspondentes as perdas de CH_3COOH , CH_2CO , CO e H_2O , respectivamente, bem como perdas radiculares de 29 e 15 Da, correspondentes as perdas de radical etila e metila. O composto **140** compartilha perdas neutras de HCl e CO , e perdas de radical metila e etila. O composto **166** compartilha perdas neutras de H_2O , HCl e CO , além das perdas radiculares citadas acima.

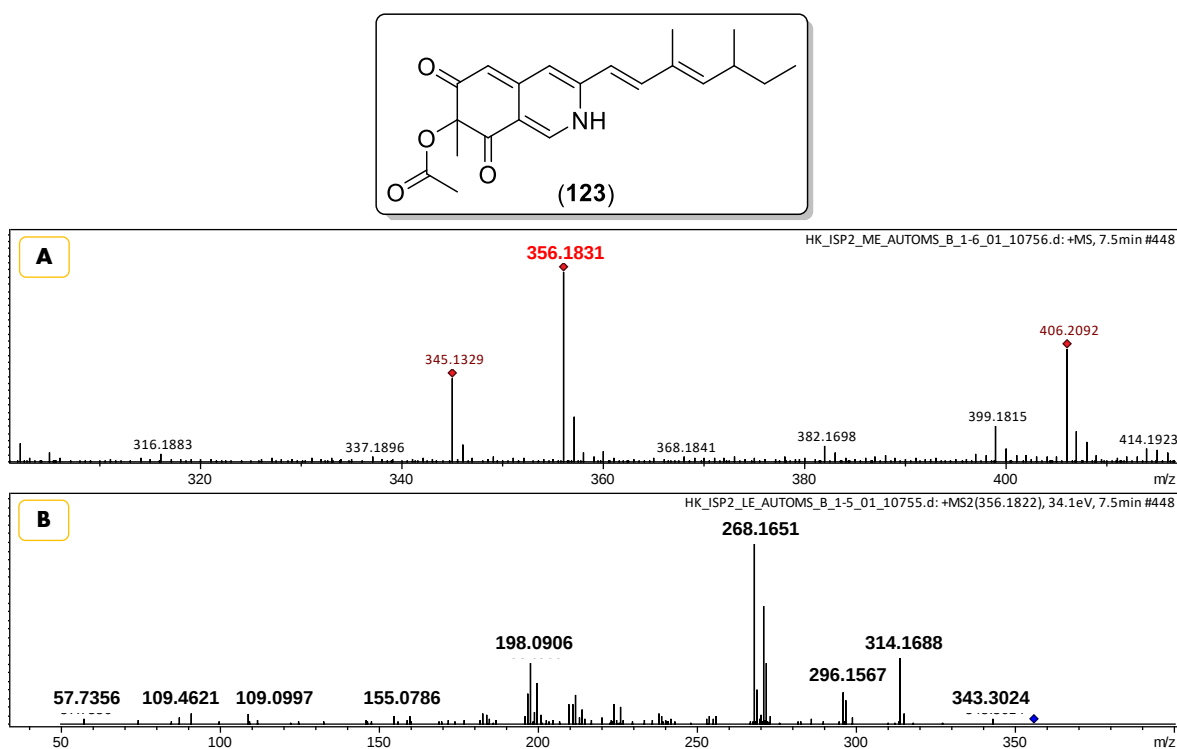


Figura 28. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (**123**).

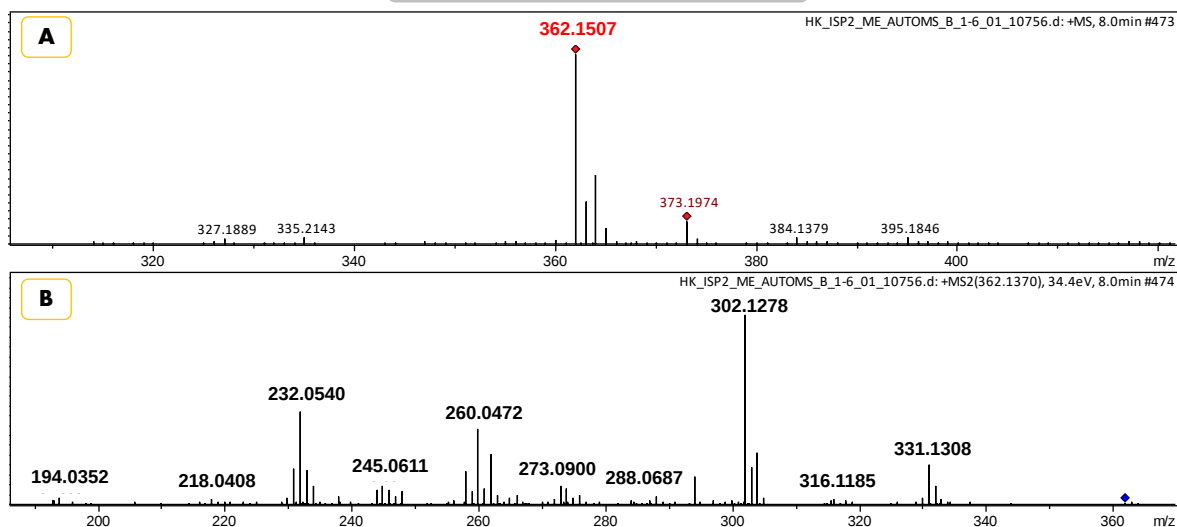


Figura 29. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (140).

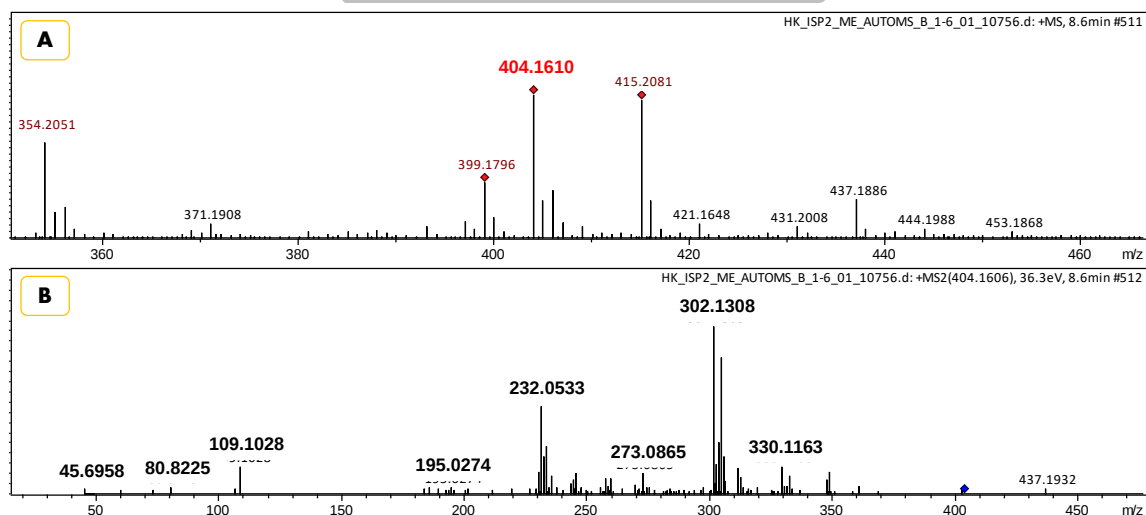
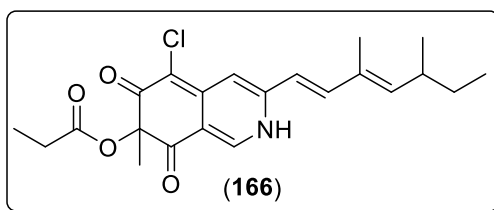


Figura 30. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (166).

A partir da isocromofilona VI (**134**) foram anotados os análogos **102** (m/z 506,1580 $[M+H]^+$, $C_{25}H_{28}ClNO_8$, cos 0,87; **Figura 31**); **113** (m/z 478,1602 $[M+H]^+$, $C_{24}H_{28}ClNO_7$, cos 0,87; **Figura 32**); **120** (m/z 448,1526 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{26}ClNO_6$, cos 0,87;

Figura 33); 132 (m/z 460,1533 $[M+H]^+$, $C_{24}H_{26}ClNO_6$, cos 0,82; **Figura 34); e 135** (m/z 462,1671 $[M+H]^+$, $C_{24}H_{28}ClNO_6$, cos 0,92; **Figura 35).** Todos são clorados e têm diferenças nos substituintes ligados ao nitrogênio do anel pirano. Compartilham entre si perdas neutras de 60, 42, 36, 28 e 18 Da, correspondentes às perdas de CH_3COOH , CH_2CO , HCl , CO e H_2O , respectivamente, e também perdas radiculares de 29 e 15 Da, correspondentes às perdas de radical etila e metila. O composto **105** (m/z 505,1722 $[M+H]^+$, $C_{25}H_{29}ClN_2O_7$, cos 0,80; **Figura 36)** foi anotado como análogo de **120**.

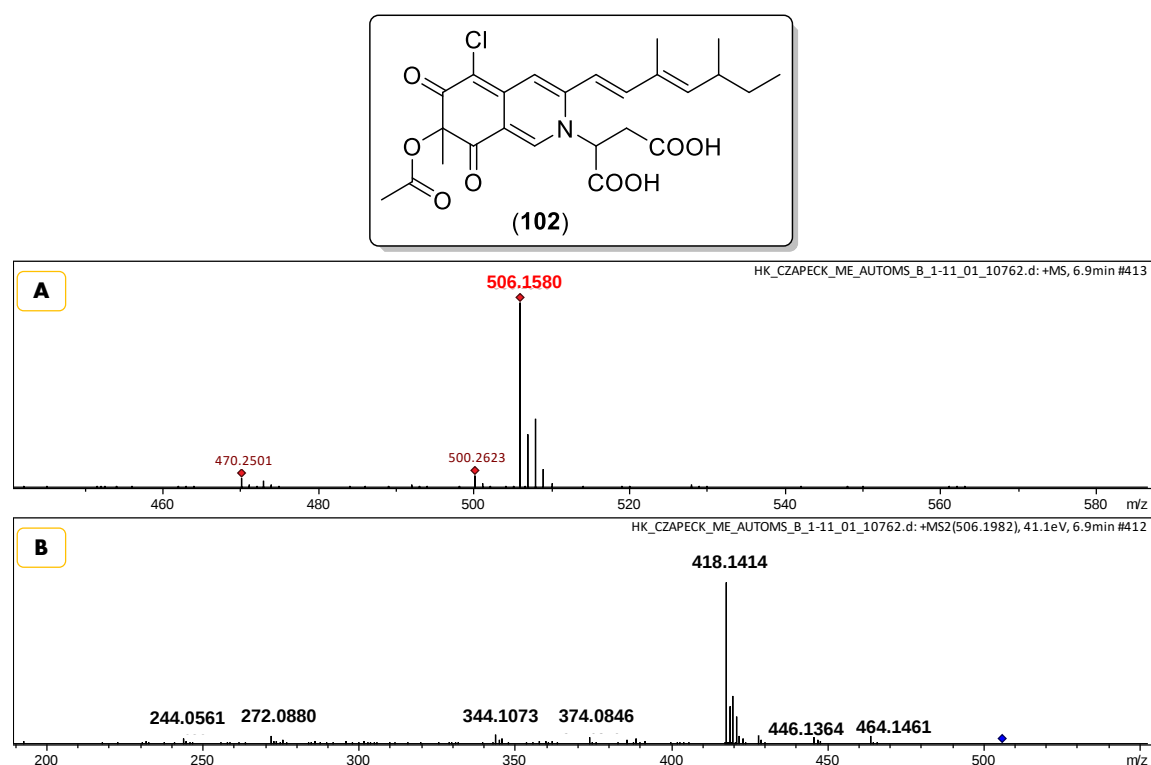


Figura 31. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (102).

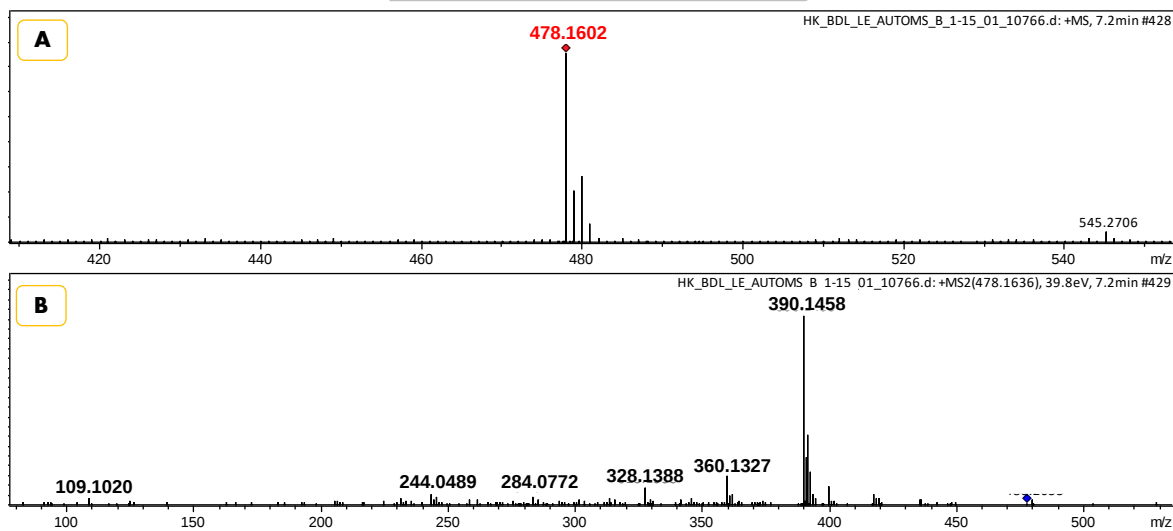
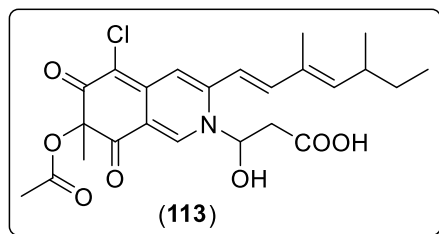


Figura 32. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (113).

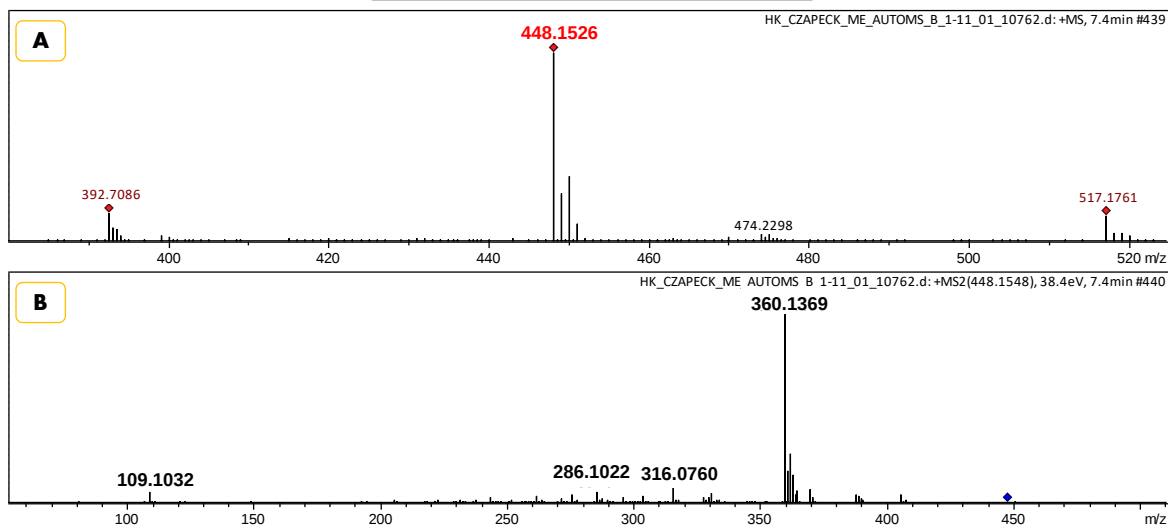
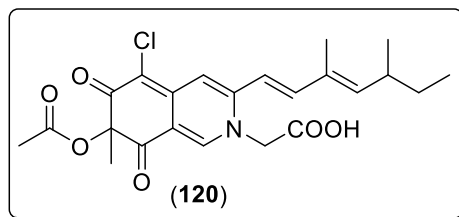


Figura 33. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (120).

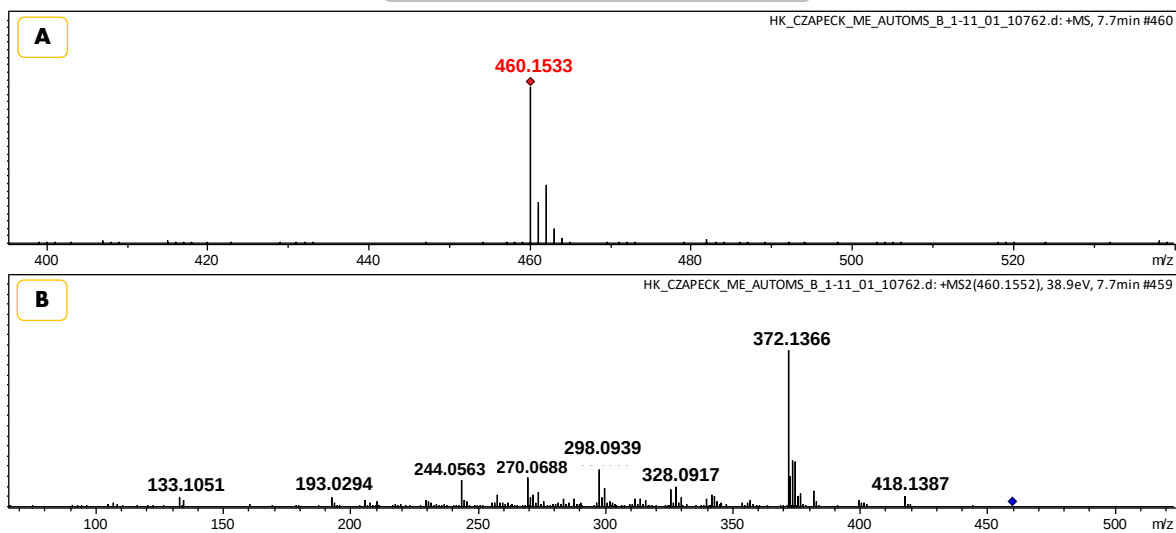
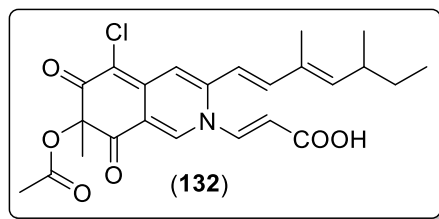


Figura 34. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (132).

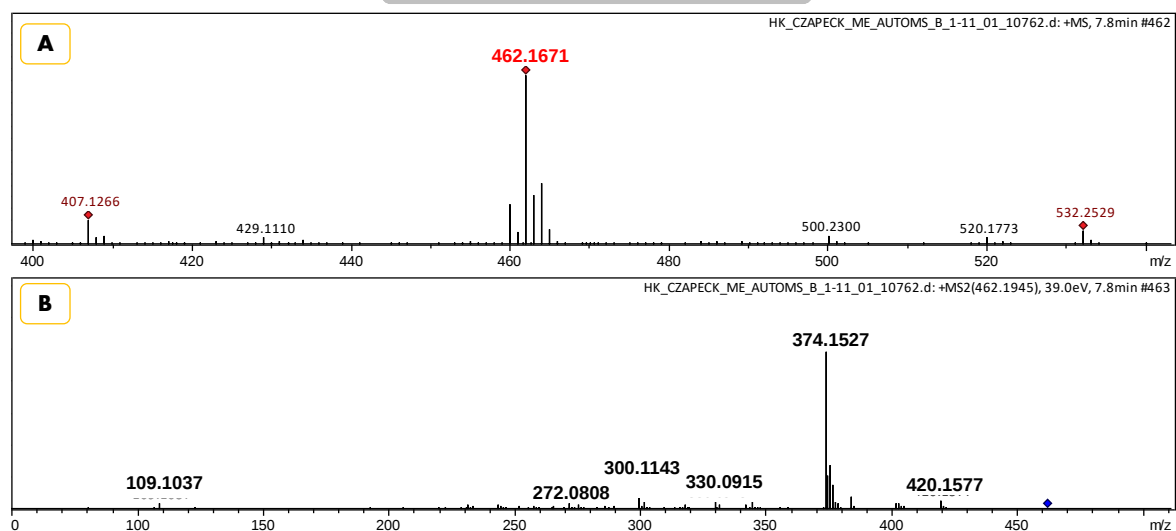
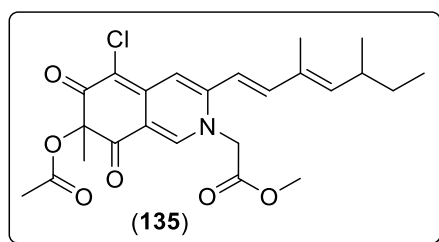


Figura 35. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (135).

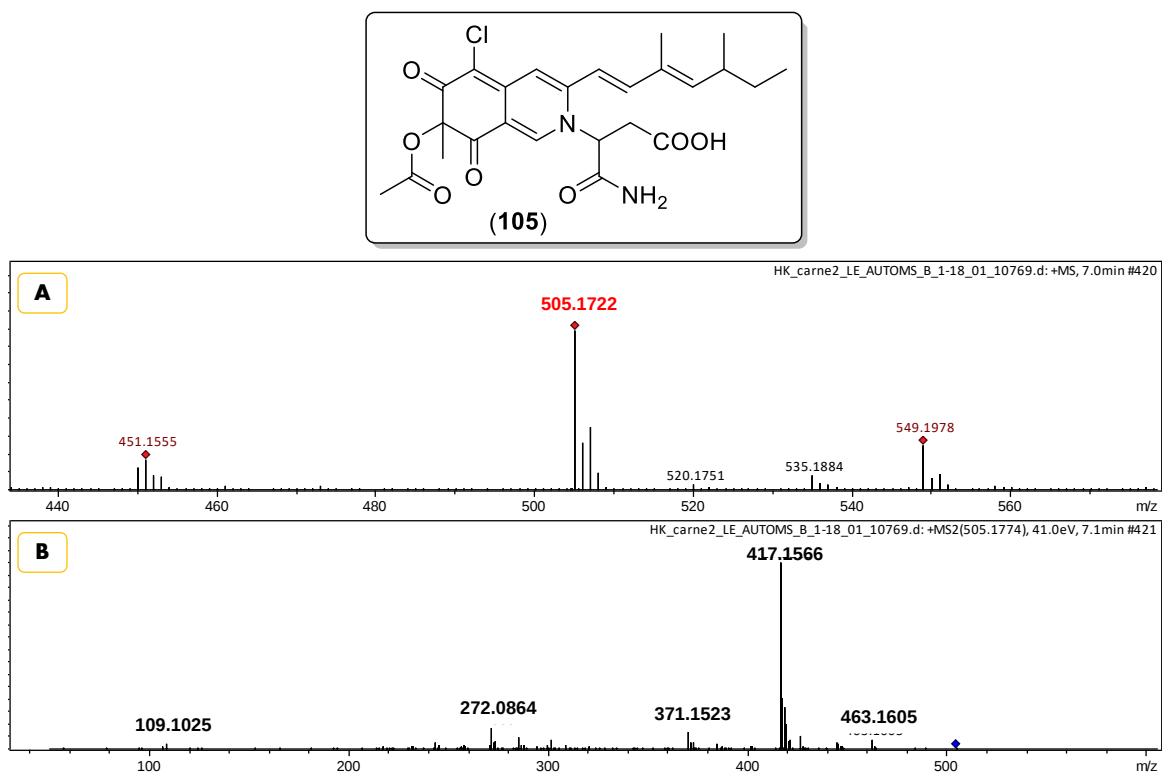


Figura 36. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (105).

Análogos de ocrefilona (**192**) também foram anotados. O composto **108** (m/z 399,1797 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{26}O_6$, cos 0,80; **Figura 37**); composto **199** (m/z 385,1985 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{28}O_5$, cos 0,67; **Figura 38**) e isotiorina (**201**) (m/z 381,1683 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{24}O_5$, cos 0,81; **Figura 39**). O composto 5-cloroisotiorina (**212**) (m/z 415,1329 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{23}ClO_5$, cos 0,81, **Figura 40**) foi anotado como análogo do composto **201**. Isocromofilona I (**205**) (m/z 417,1471 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{25}ClO_5$, cos 0,70; **Figura 41**) foi anotada como análogo de **212**.

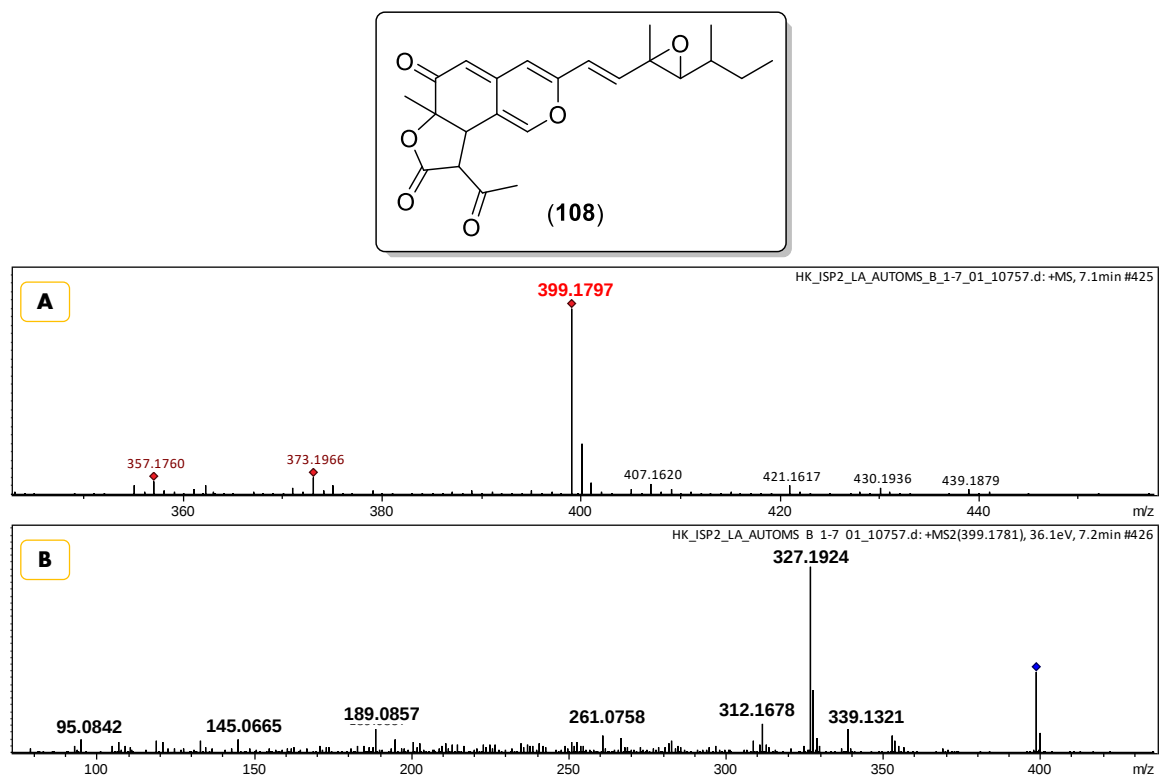


Figura 37. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (108).

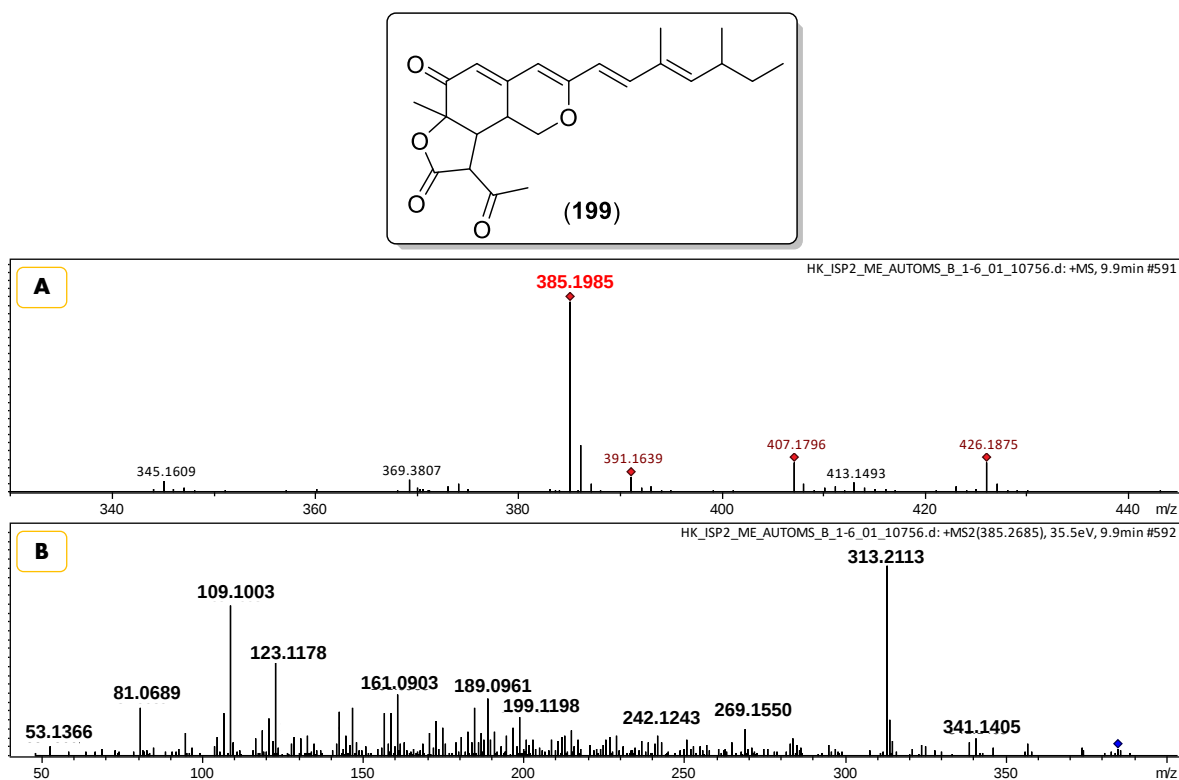


Figura 38. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (199).

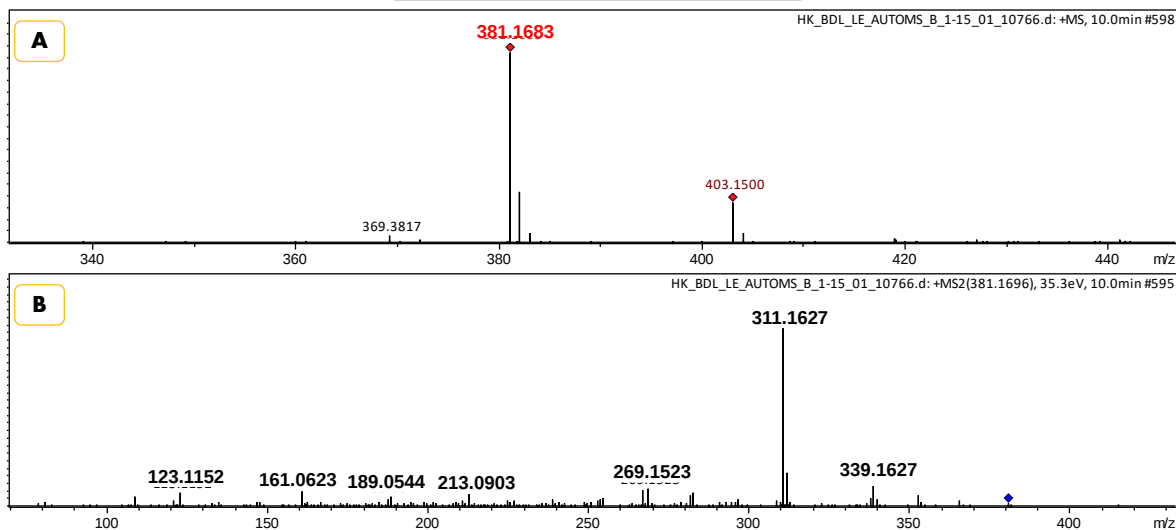
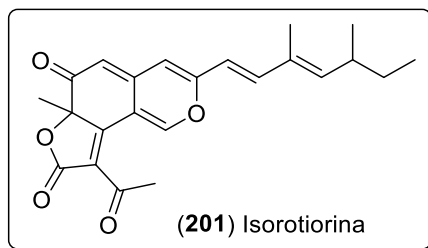


Figura 39. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de isotiorina (201).

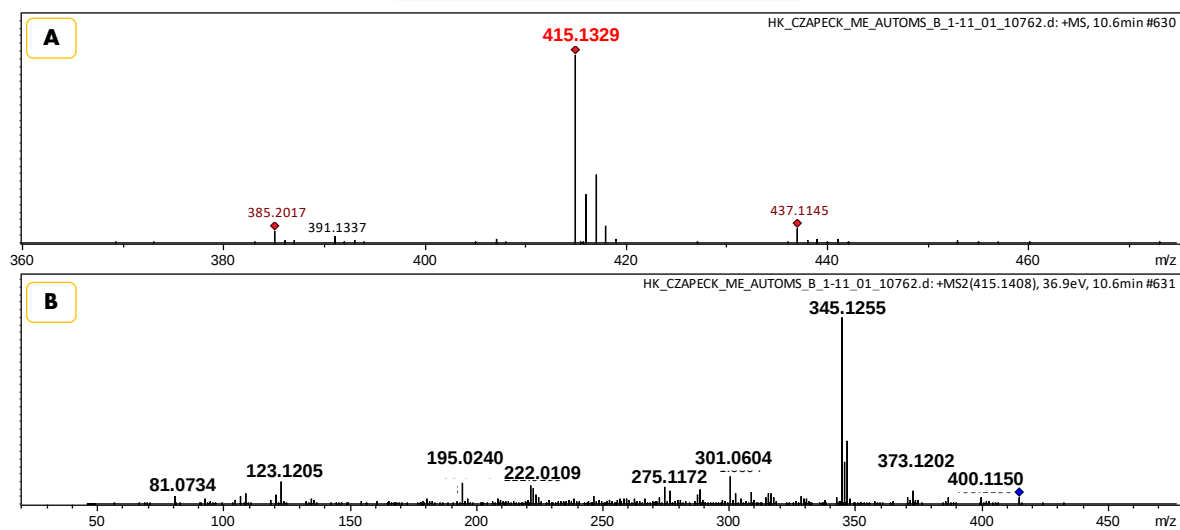
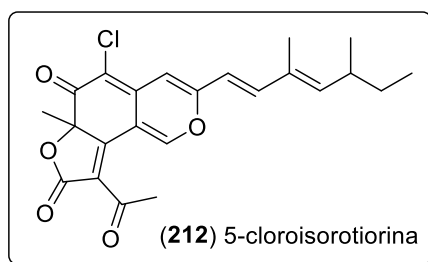


Figura 40. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de 5-cloroisorotiorina (212).

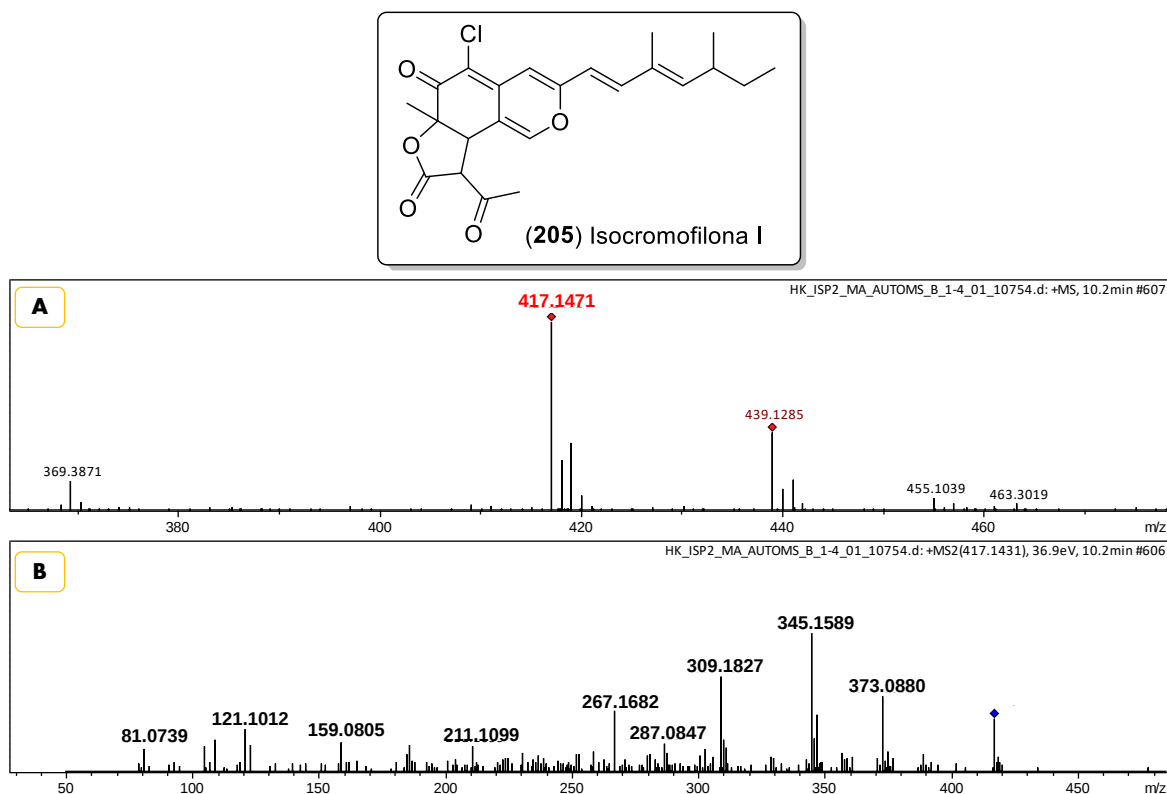


Figura 41. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de isocromofilona I (205).

A partir de isocromofilona IX (136) foram anotados os seguintes compostos, **110** (m/z 520,1744 $[M+H]^+$, $C_{26}H_{30}ClNO_8$, cos 0,93; **Figura 42**); penazafilona F (**141**) (m/z 490,2003 $[M+H]^+$, $C_{26}H_{32}ClNO_6$, cos 0,94; **Figura 43**) e penazafilona A (**182**) (m/z 504,2128 $[M+H]^+$, $C_{27}H_{34}ClNO_6$, cos 0,91; **Figura 44**).

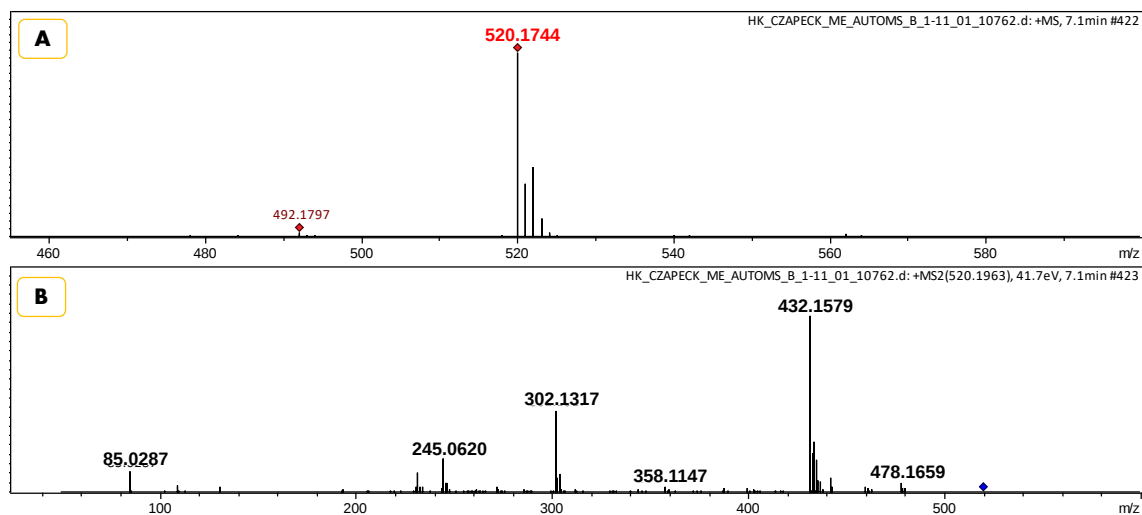
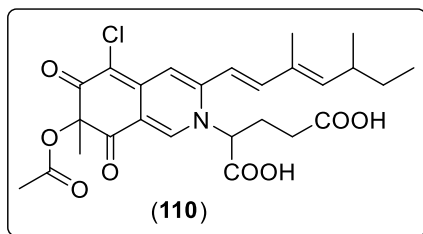


Figura 42. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (110).

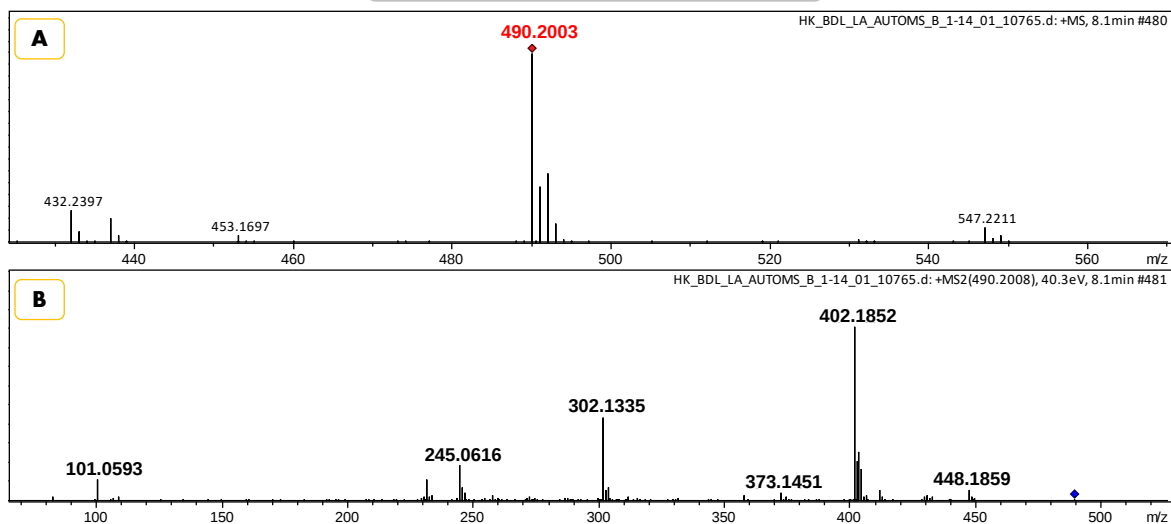
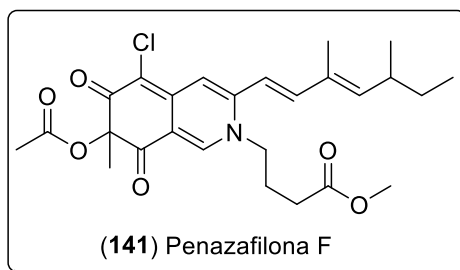


Figura 43. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de penazafilona F (141).

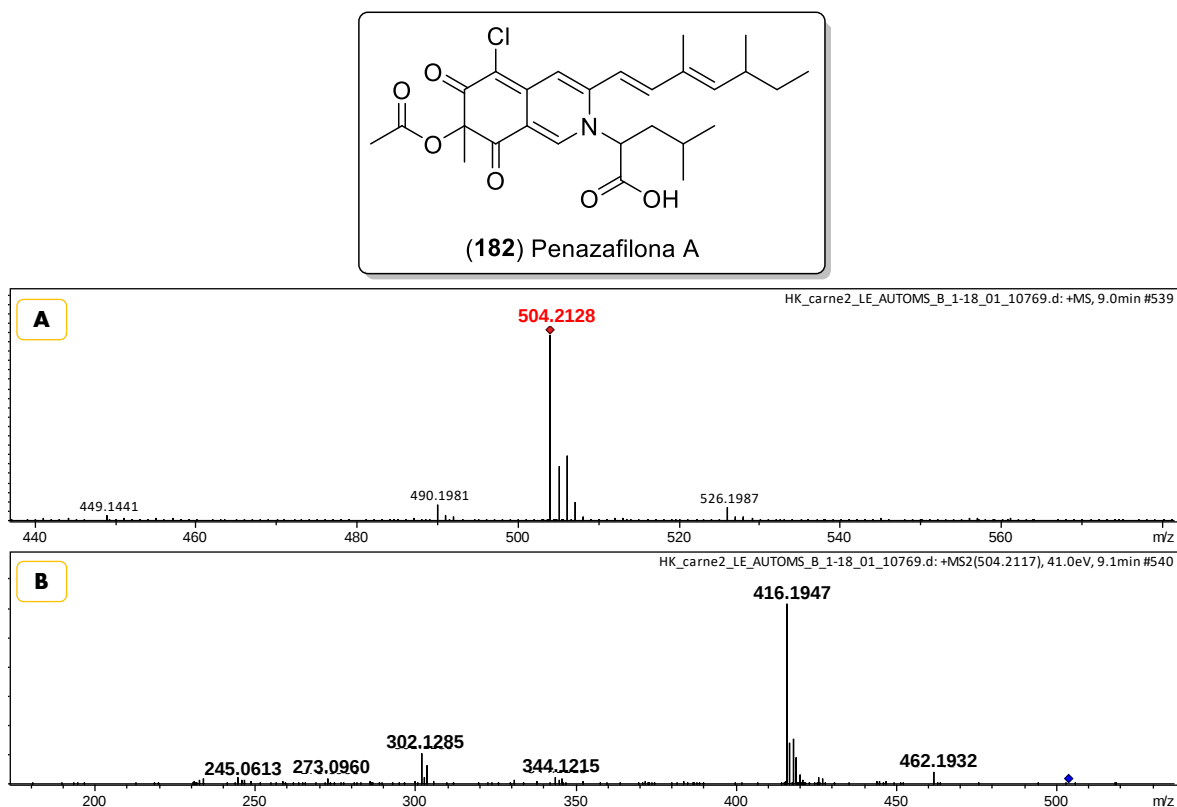


Figura 44. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de penazafilona A (182).

A partir de geumsanol A (35) foi anotado o composto **52** (m/z 391,2135 $[M+H]^+$, $C_{22}H_{30}O_6$, $\cos$ 0,74; **Figura 45**). Geumsanol B (75) (m/z 417,1915 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{28}O_7$, $\cos$ 0,76; **Figura 46**) foi anotado como análogo de 52.

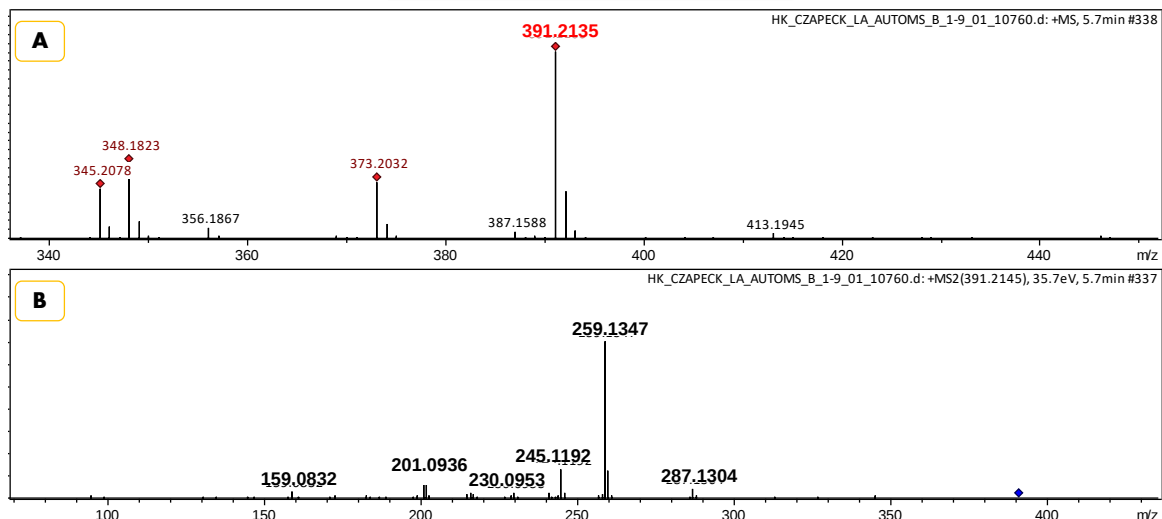
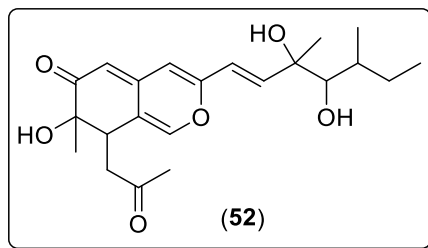


Figura 45. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (52).

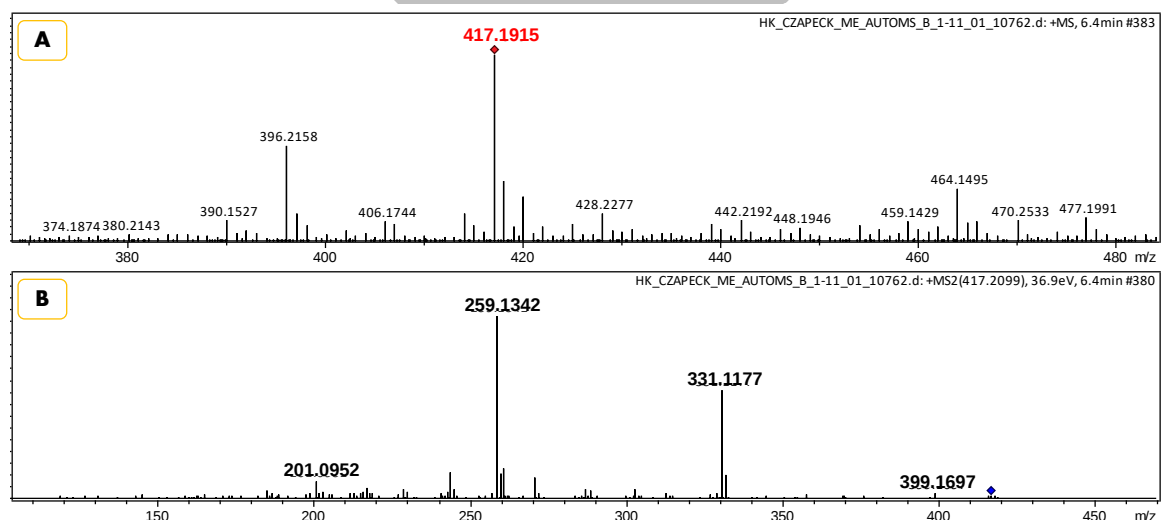
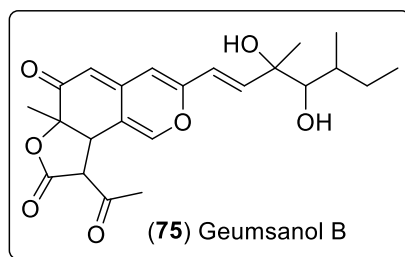


Figura 46. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de geumsanol B (75).

A partir da esclerotorina (**204**) foram anotados os análogos **183** (m/z 349,1239 $[M+H]^+$, $C_{19}H_{21}ClO_4$, cos 0,72; **Figura 47**) e **216** (m/z 419,1637 $[M+H]^+$, $C_{23}H_{27}ClO_5$, cos 0,66; **Figura 48**).

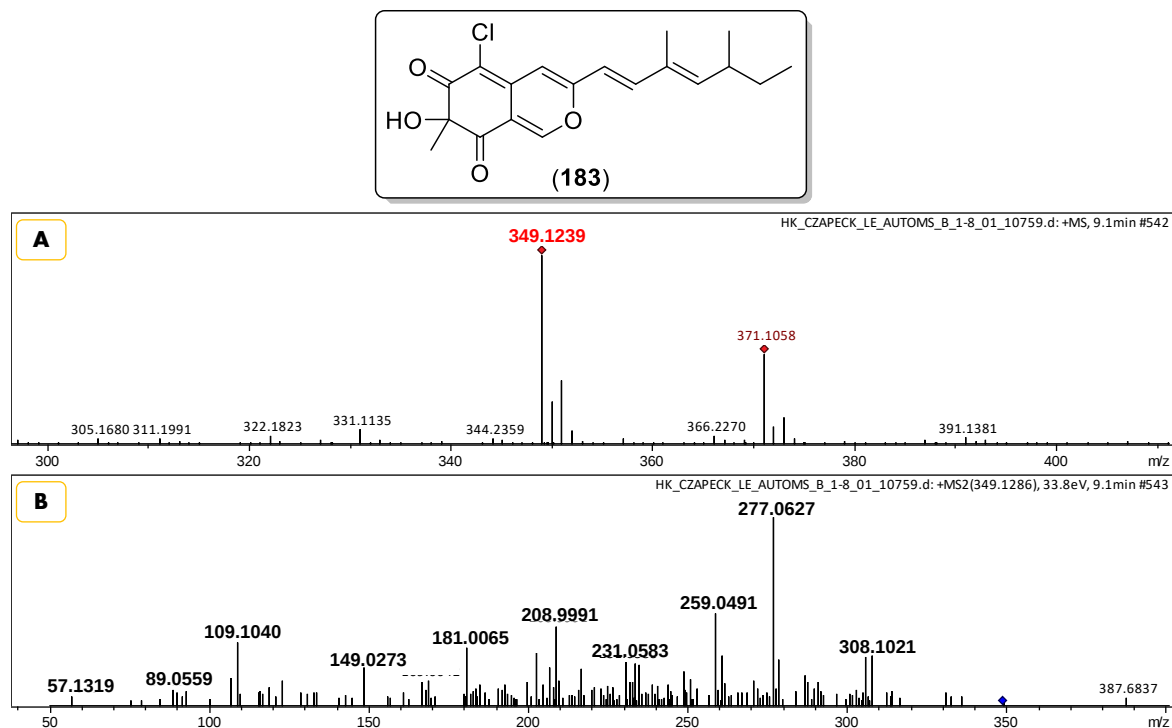


Figura 47. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (**183**).

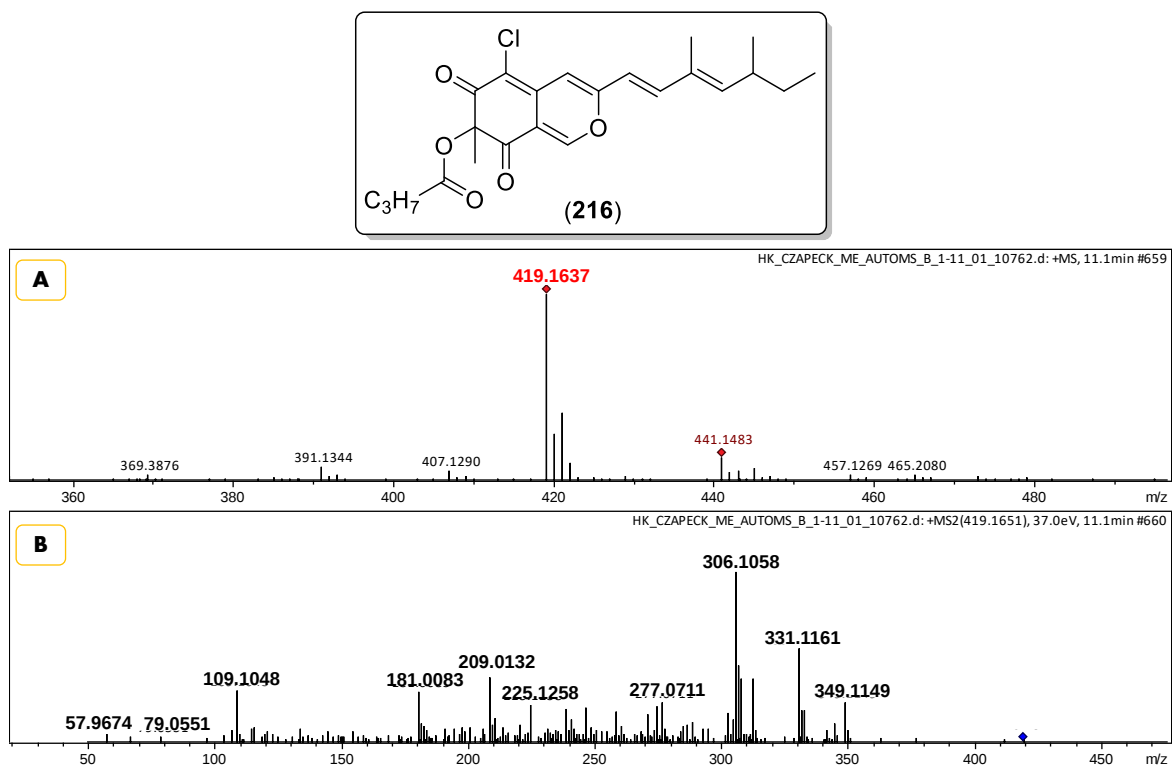


Figura 48. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (**216**).

Os compostos **70** (m/z 373,2027 $[M+H]^+$, $C_{22}H_{28}O_5$, cos 0,70; **Figura 49**) e **185** (m/z 357,2069 $[M+H]^+$, $C_{22}H_{28}O_4$, cos 0,79; **Figura 50**) foram anotados como análogos de isocromofilona II (**200**).

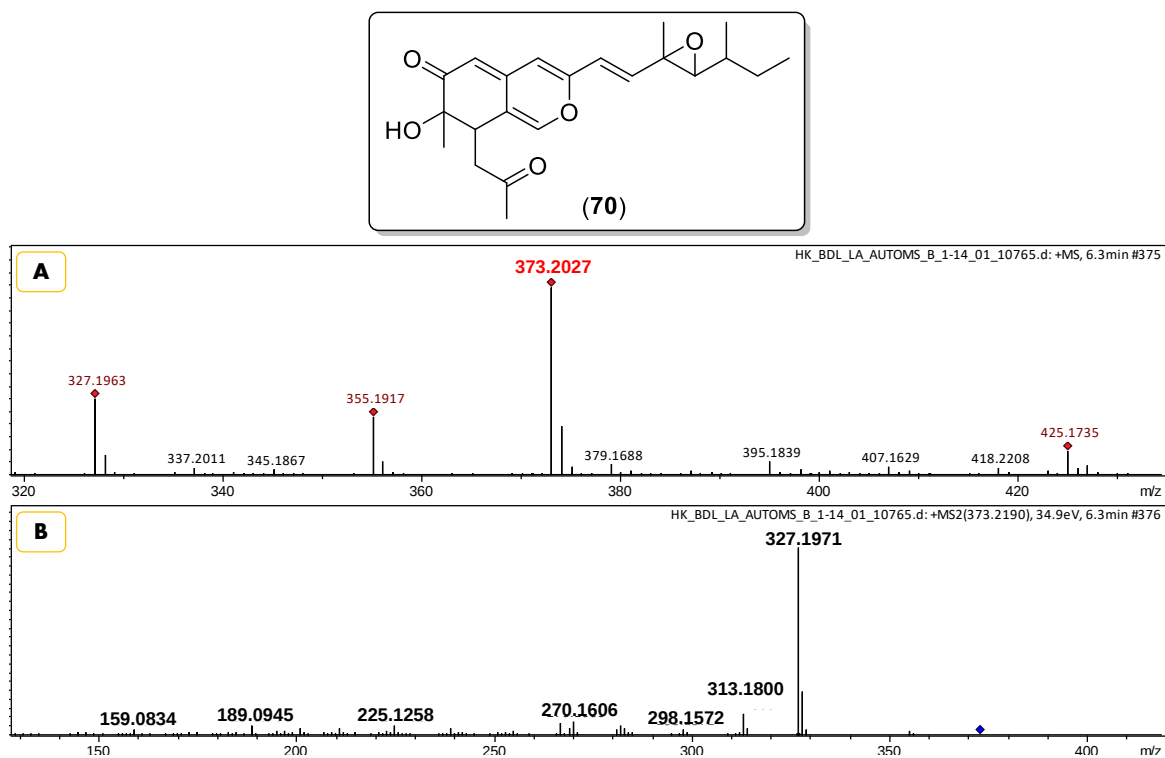


Figura 49. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (70).

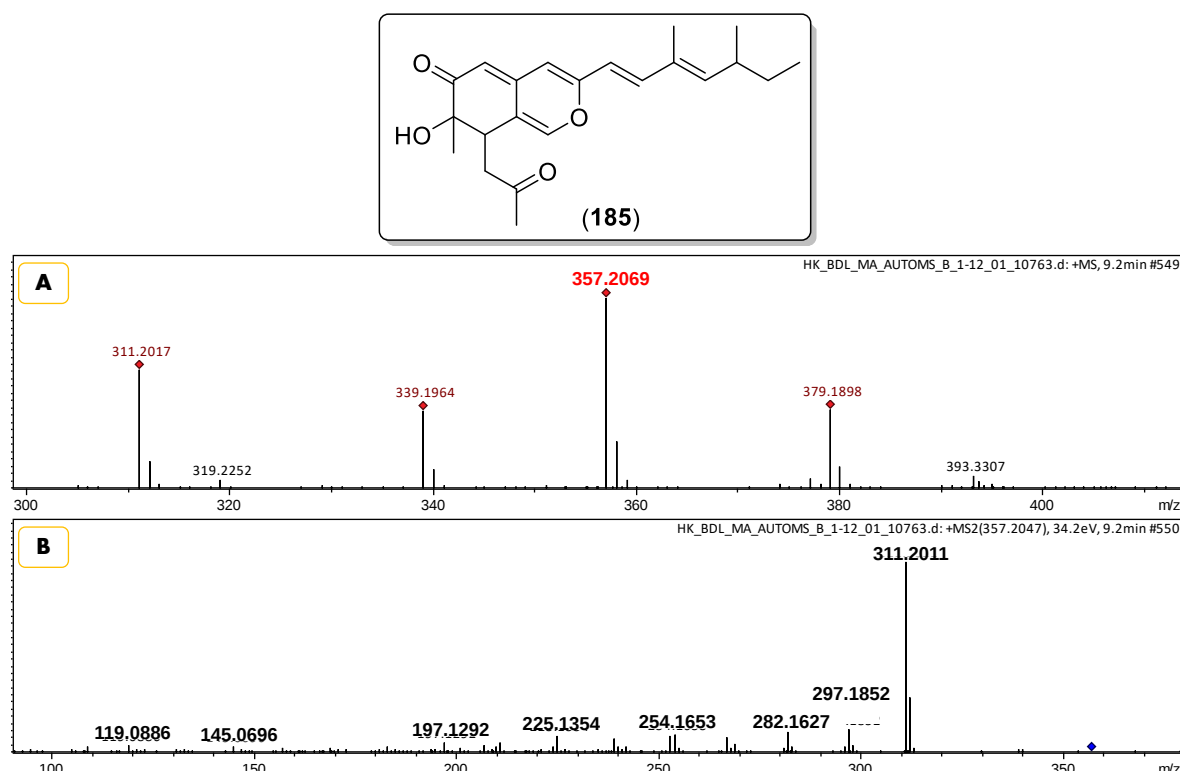


Figura 50. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (185).

Além dos compostos já citados, foram anotados os compostos **21** (m/z 350,1921 $[M+H]^+$, $C_{19}H_{27}NO_5$; **Figura 51**), Geumsanol C (**39**) (m/z 353,1958 $[M+H]^+$, $C_{19}H_{28}O_6$; **Figura 52**), **90** (m/z 519,1898 $[M+H]^+$, $C_{26}H_{31}ClN_2O_7$; **Figura 53**), 7-deacetilisocromofilona VI (**112**) (m/z 392,1627 $[M+H]^+$, $C_{21}H_{26}ClNO_4$; **Figura 54**), decloroisocromofilona III (**161**) (m/z 319,1890 $[M+H]^+$, $C_{19}H_{26}O_4$; **Figura 55**) e **177** (m/z 415,2126 $[M+H]^+$, $C_{24}H_{30}O_6$; **Figura 56**).

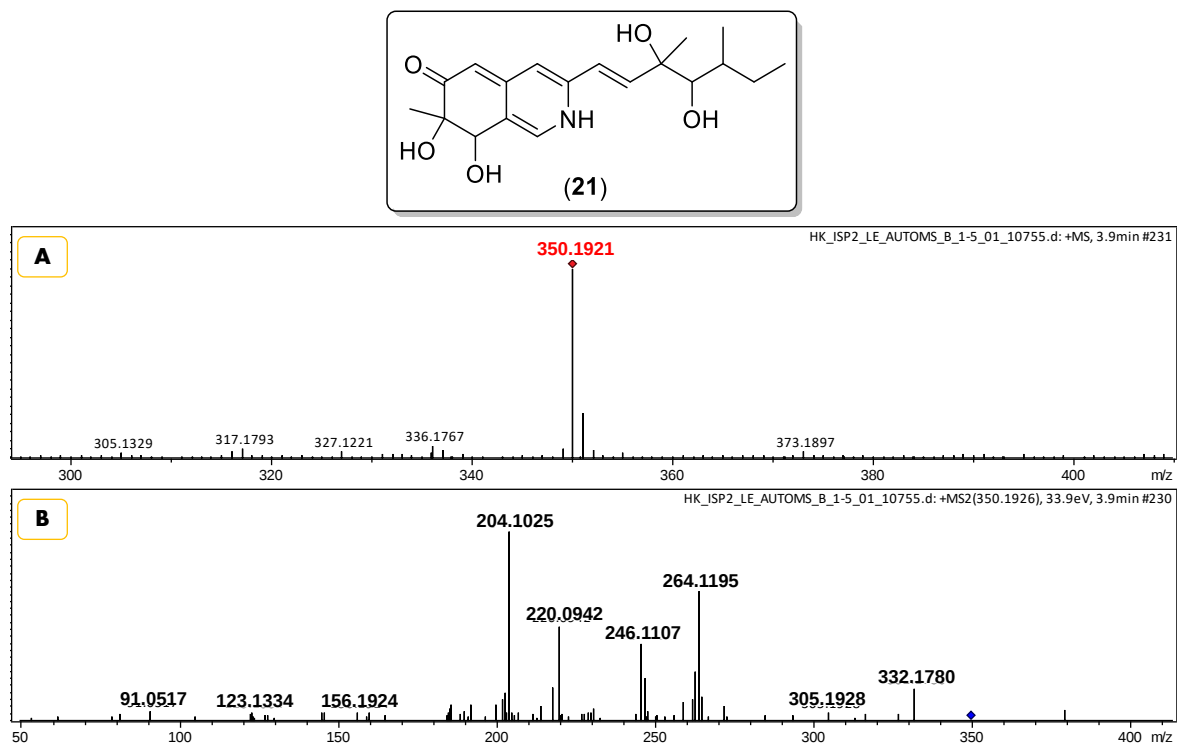


Figura 51. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (**21**).

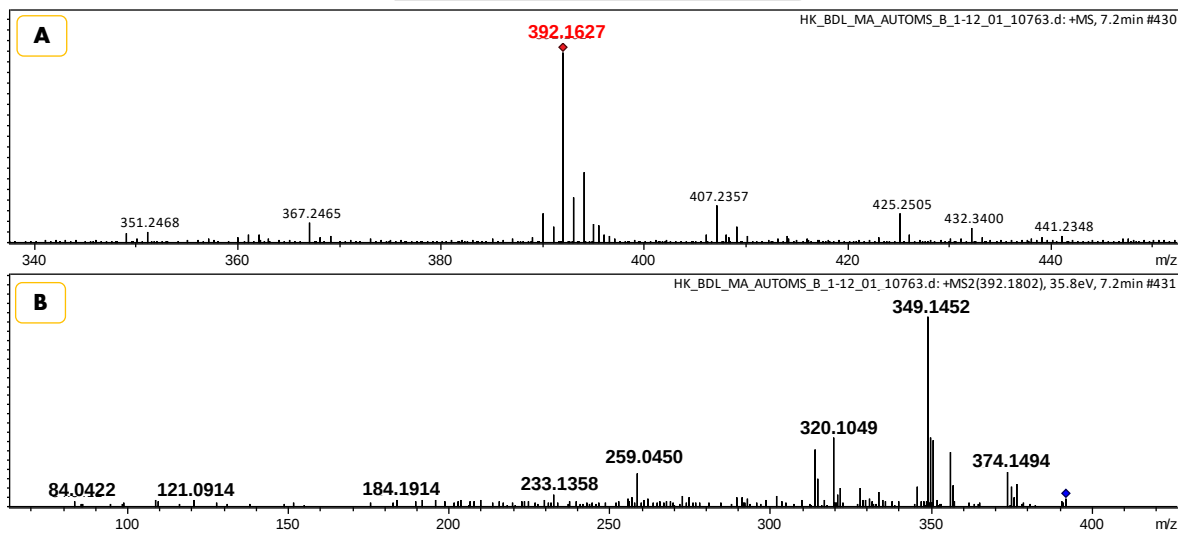
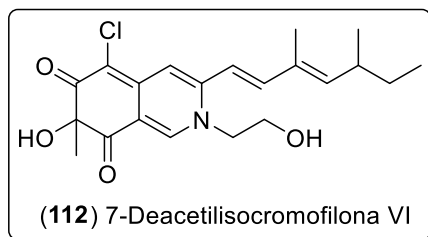


Figura 54. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de 7-deacetilisocromofilona VI (112).

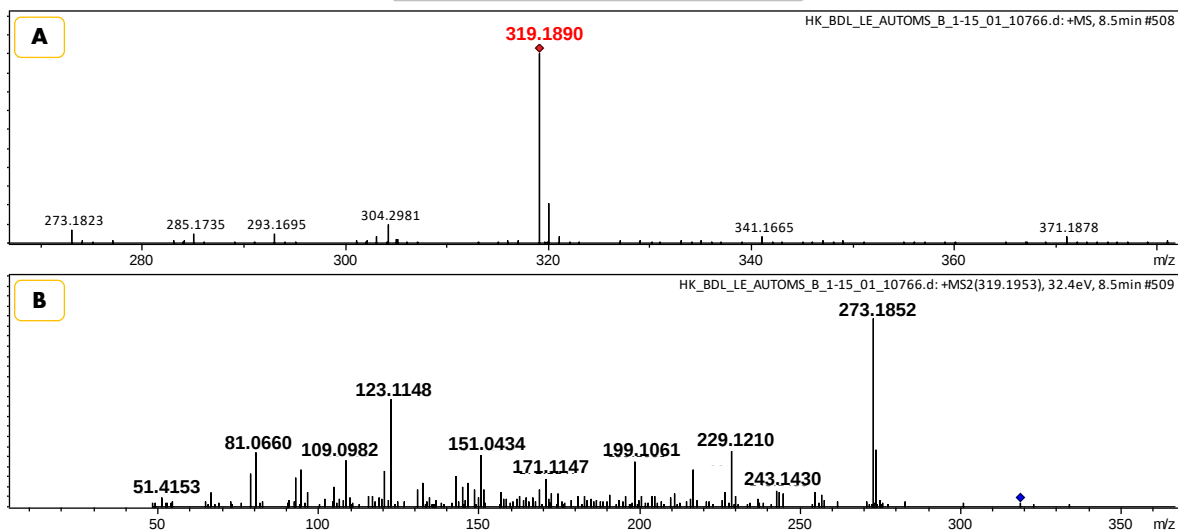
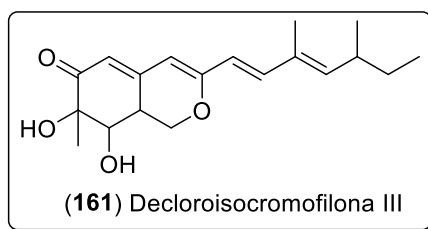


Figura 55. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) de decloroisocromofilona III (161).

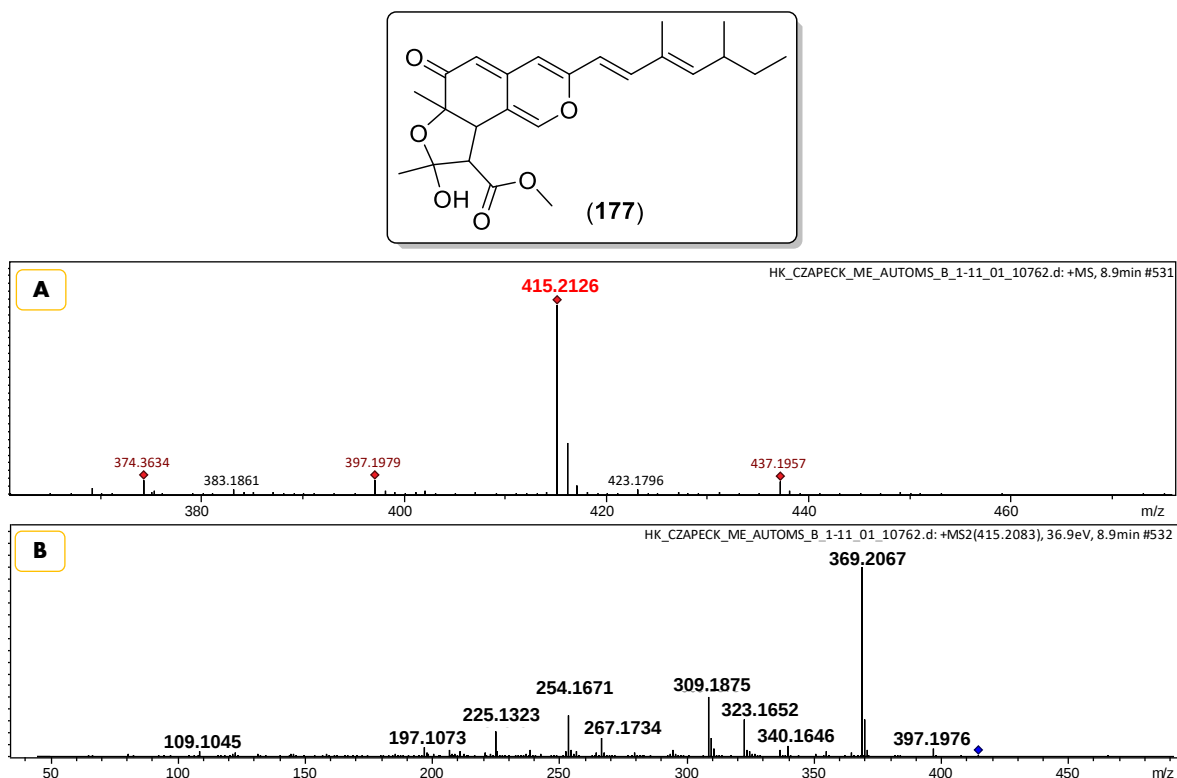


Figura 56. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) do composto (177).

Estas moléculas foram deduzidas a partir de comparação dos dados de fragmentação com a literatura, interpretação das redes moleculares mostradas a seguir e padrão de fragmentação citados anteriormente. Na rede apresentada onde foi identificada uma ou mais moléculas, foram chamados de grupos (A-F) e podem ser vistos na figura da visão geral da rede utilizada (**Figura 57**). O grupo A (**Figura 58**) contém, principalmente, análogos clorados e nitrogenados e o grupo B (**Figura 59**) contém análogos oxigenados com a presença ou ausência de cloro na estrutura. A partir das redes moleculares e análise da similaridade entre as moléculas pelo valor de cosseno, foi possível deduzir outros análogos como os apresentados na **Figura 60**.

Exemplos da aplicabilidade e eficiência das redes moleculares no direcionamento e posterior elucidação de novos compostos, podem ser vistos observando as moléculas vizinhas às *seeds* nas redes, com diferenças estruturais em algumas porções da cadeia, mas mantendo o seu anel bicíclico com presença de nitrogênio, e também, cloro, além de outras modificações já mencionadas.

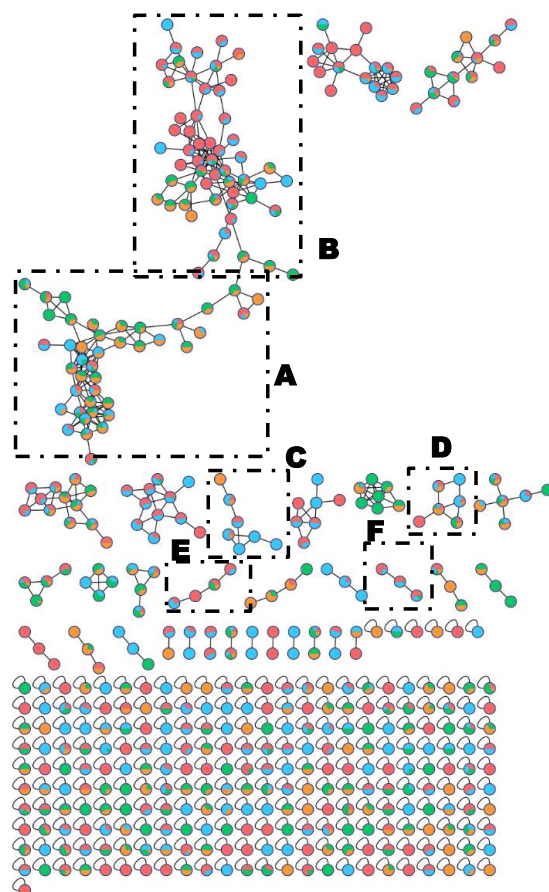


Figura 57. Rede molecular geral contendo os grupos anotados.

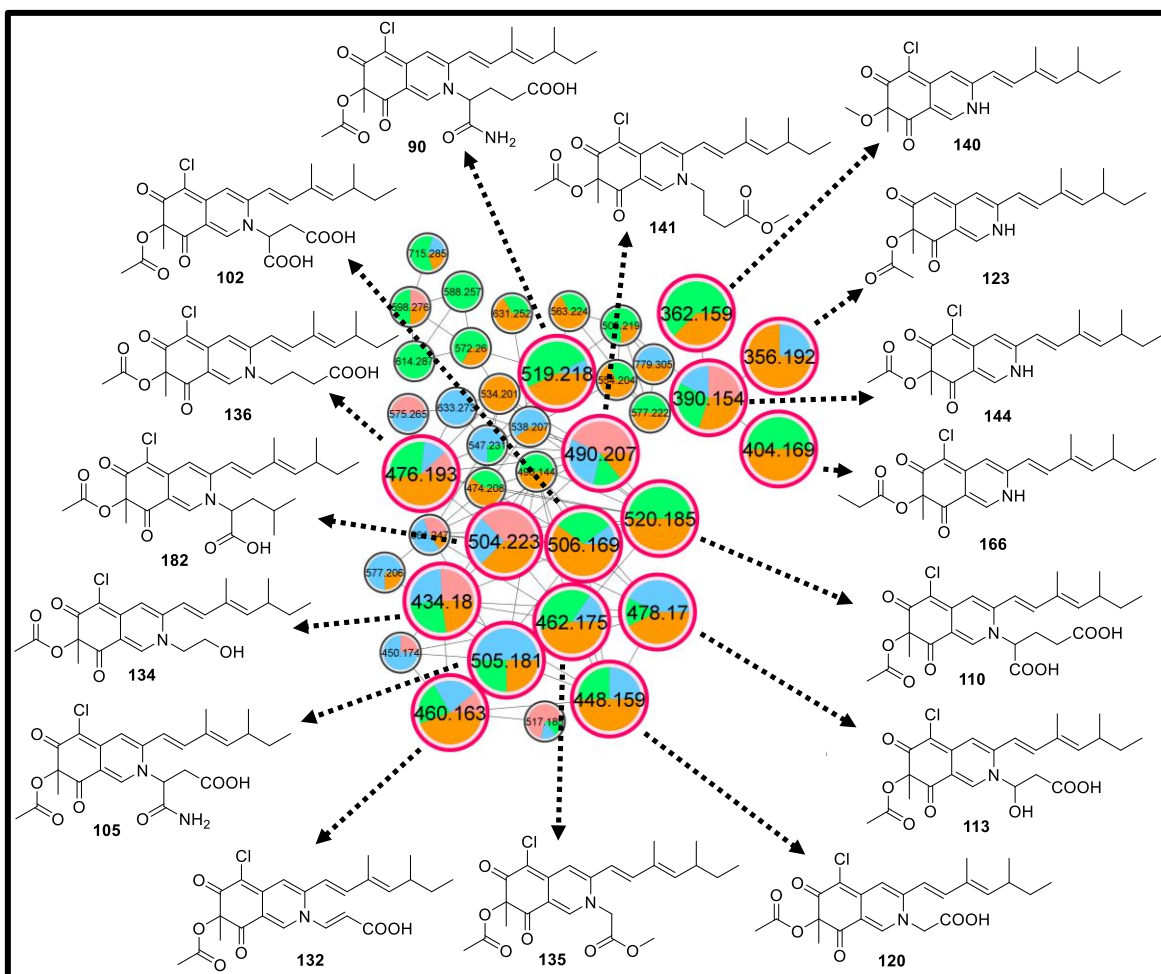


Figura 58. Grupo A. Azafilonas nitrogenadas com/sem cloro. Rosa (Líquido Agitado de todos os meios de cultivo); Azul (Líquido Estático de todos os meios de cultivo); Verde (Micélio Agitado de todos os meios de cultivo); Laranja (Micélio Estático de todos os meios de cultivo).

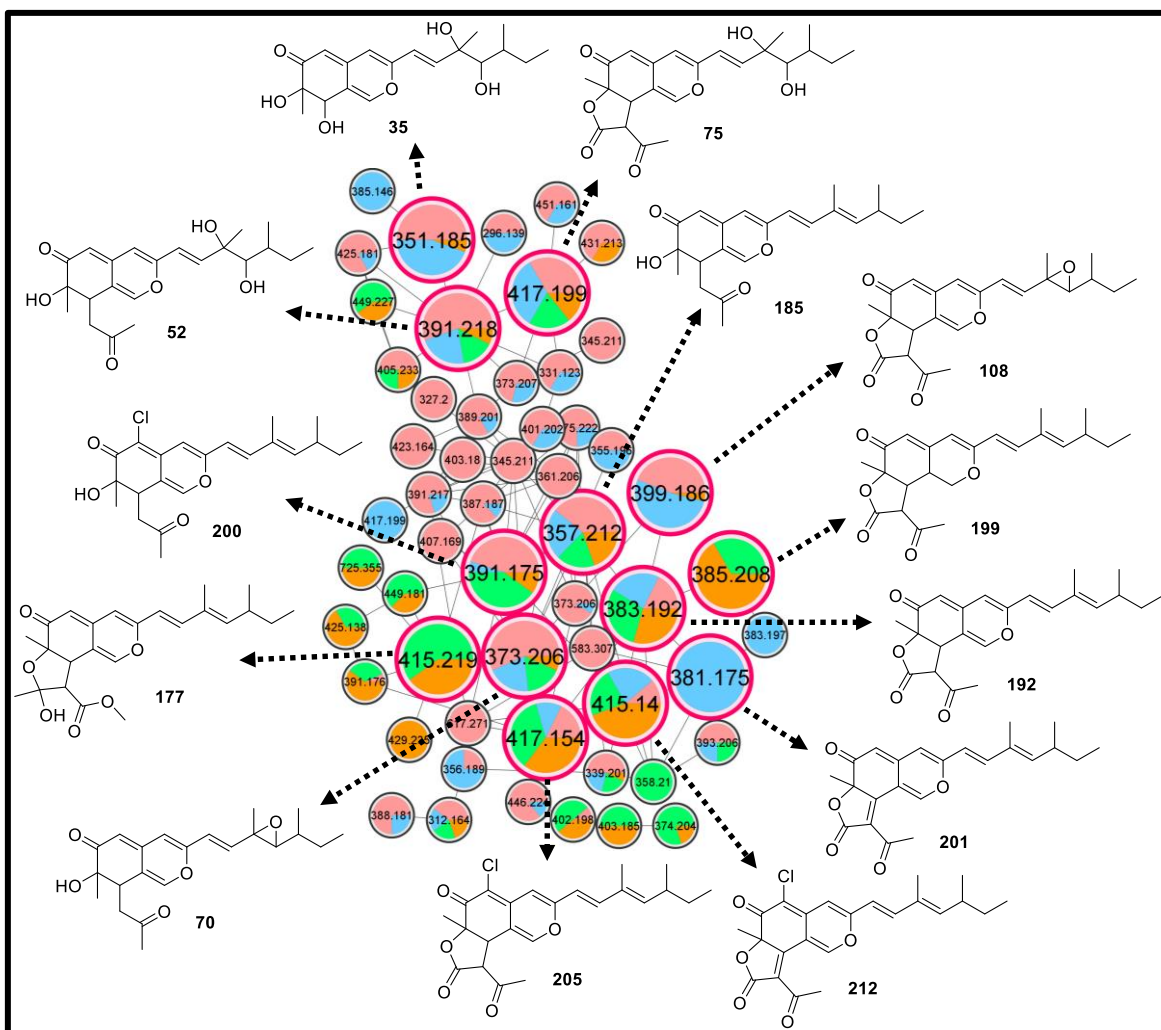


Figura 59. Grupo B. Azafilonas oxigenadas com/sem cloro. Rosa (Líquido Agitado de todos os meios de cultivo); Azul (Líquido Estático de todos os meios de cultivo); Verde (Micélio Agitado de todos os meios de cultivo); Laranja (Micélio Estático de todos os meios de cultivo).

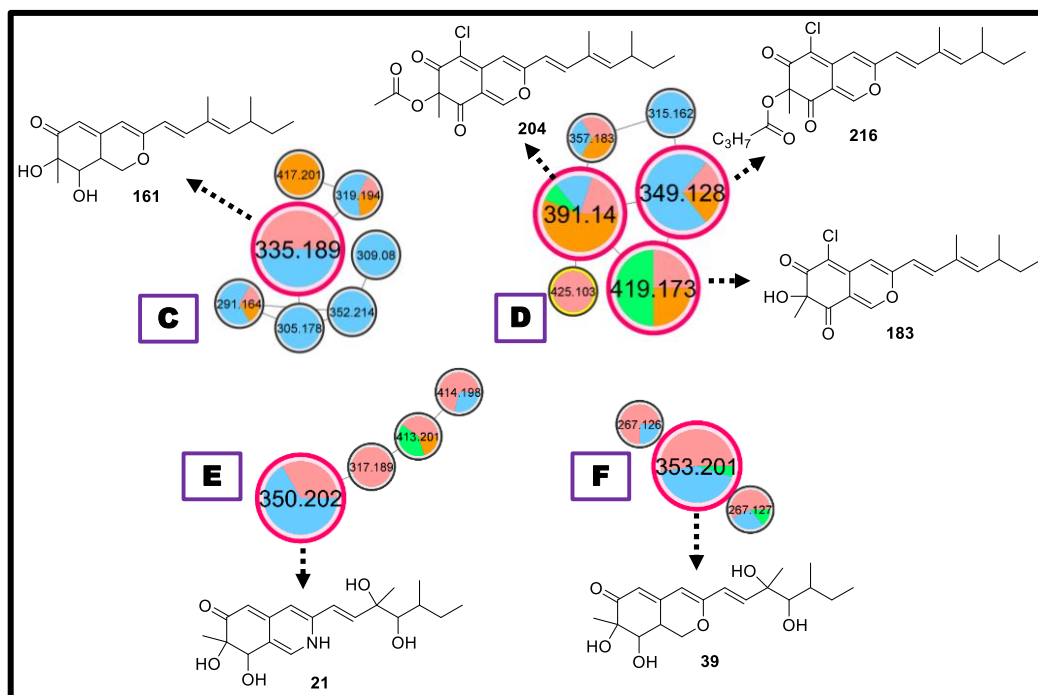


Figura 60. Grupos C-F. Rosa (Líquido Agitado de todos os meios de cultivo); Azul (Líquido Estático de todos os meios de cultivo); Verde (Micélio Agitado de todos os meios de cultivo); Laranja (Micélio Estático de todos os meios de cultivo).

Muitas atividades biológicas são conhecidas para algumas das moléculas aqui descritas, sendo a maioria isolada ou identificada em extratos de diferentes espécies de *Penicillium*, como pode ser visto na **Tabela 3**. Moléculas como geumsanol A-C e atlantinona A também foram isoladas de espécies de *Penicillium* (BORUTA et al., 2018; DALSGAARD et al., 2012; HEBRA et al., 2020; SON et al., 2016; WANG et al., 2018;), mas nenhuma bioatividade foi encontrada para as mesmas, havendo poucas pesquisas que envolvem seus estudos.

Tabela 3. Atividades biológicas encontradas para algumas moléculas.

Molécula	Fungo	Atividade biológica	Referências
7-deacetilisocromofilona VI (112)	<i>P. sclerotiorum</i> SNB-CN111	Antifúngica	(HEBRA et al., 2020)
	<i>P. multicolor</i> CM01	Antibacteriana	(HEMTASIN et al., 2016)
Isocromofilona VI (134)	<i>P. sclerotiorum</i> cib-411	Anti-inflamatória	(TANG et al., 2019)
	<i>Penicillium</i> sp. KCB11A109	Citotóxica	(SON et al., 2016)
	<i>Hypocrella</i> sp. WYTY-21		(GUO Q. et al., 2015)

Isocromofilona IX (138)	<i>Penicillium</i> sp.	Antibacteriana	(MICHAEL et al., 2003)
Penazafilona F (141) Penazafilona A (182)	<i>P. sclerotiorum</i> cib-411	Anti-inflamatória	(TANG et al., 2019)
Esclerotioramina (144)	<i>P. multicolor</i> CM01	Antibacteriana e antiprotzoária	(HEMTASIN et al., 2016)
	<i>P. sclerotiorum</i> SNB-CN111	Antifúngica	(HEBRA et al., 2020)
	<i>P. sclerotiorum</i> OUCMDZ-3839	Antiviral e inibição enzimática	(JIA et al., 2019)
	<i>P. mallochii</i> CCH01	Fitopatogênica e antibacteriana	(ZHANG et al., 2019)
	<i>Hypocrella</i> sp. WYTY-21	Citotóxica	(GUO Q. et al., 2015)
Ocrefilona (192)	<i>P. multicolor</i> CM01	Inibição enzimática	(HEMTASIN et al., 2016)
	-	Antiprotzoária	(IWATSUKI et al., 2010)
Isocromofilona II (200)	<i>P. multicolor</i> CM01	Inibição enzimática	(HEMTASIN et al., 2016)
	<i>P. multicolor</i> FO-2338	Antiviral	(MATSUZAKI et al., 1995, 1998; ÔMURA et al., 1993)
Isocromofilona I (205)	<i>P. sclerotiorum</i> OUCMDZ-3839	Inibição enzimática	(JIA et al., 2019)
	-	Antiparasitária e citotóxica	(IWATSUKI et al., 2010)
5-cloroisorotiorina (212)	<i>P. sclerotiorum</i> SNB-CN111	Antifúngica	(HEBRA et al., 2020)
	<i>P. multicolor</i> F1753	Anticâncer	(NAM et al., 2000)
	-	Anticâncer e antifúngica	(NEVES, 2016)
Esclerotiorina (204)	<i>P. frequentans</i>	Antibacteriana e inibição enzimática	(CHIDANANDA et al., 2006)
	<i>Penicillium</i> sp. ZJ27	Antibacteriana	(CHEN et al., 2017)
	<i>P. sclerotiorum</i>		(DASAGRANDE et al., 2020)
	<i>P. mallochii</i>	Antibacteriana e antioxidante	(DOS SANTOS et al., 2019)

<i>P. sclerotiorum</i>	Antibacteriana e antifúngica	(LUCAS et al., 2007)
<i>P. frequentans</i>	Antioxidante	(CHIDANANDA & SATTUR, 2007)

5.4 Análise metabólica das linhagens mutantes

A exploração dos cromatogramas das duas linhagens mutantes de *Penicillium* mostrou desvios metabólicos significativos, principalmente, na produção de policetídeos. Comparando os perfis metabólicos com a linhagem selvagem, os mutantes não apresentaram os picos cromatográficos referentes aos policetídeos aqui desreplicados, comprovando que os genes deletados são, de fato, responsáveis pela síntese de PKS interativa do tipo I envolvidas na produção de esclerotiorina e seus derivados, resultando como característica fenotípica a coloração branca (**Figura 61**), indicando que essas azafilonas são as responsáveis pela coloração amarela-laranja apresentada pela cultura da linhagem selvagem (SOUSA, 2021).

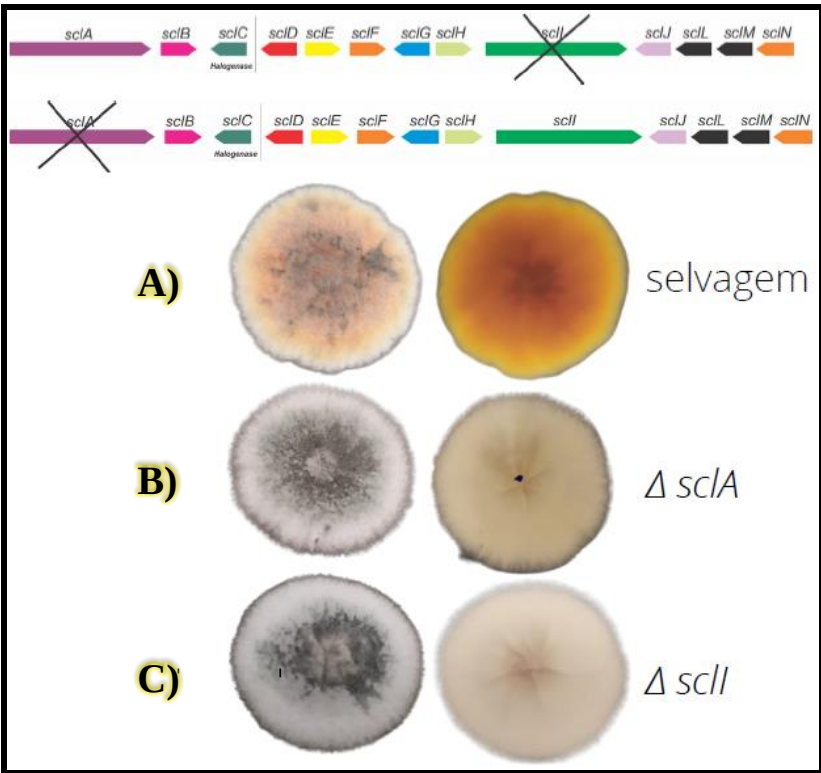


Figura 61. Característica fenotípica da linhagem selvagem de *Penicillium* sp. MMSRG-058 (A) e das linhagens mutantes (B e C).

Para obtenção do mutante de código (1_1_8_1-4_01_17754) (**Figura 62-B**), foi deletado o gene *sclA* que codifica a PKS altamente redutora (HR-PKS) e para o mutante

(2_1_6_B_1-7_17757) (**Figura 62-C**) foi deletado o gene *sclI* responsável pela síntese da PKS não redutora (NR-PKS). É possível observar que a deleção do gene *sclA* ou *sclI* resulta na ausência de policetídeos nos mutantes. Com isso, é possível afirmar que o *cluster* biossintético é responsável pela síntese de várias azafilonas, apresentando-se como *cluster* promíscuo, levando à uma variabilidade de policetídeos estruturalmente diversos por meio de mudanças constitucionais dos meios de cultivo, podendo ser alvo de estudos futuros para exploração biotecnológica através de manipulação externa ou por biologia molecular.

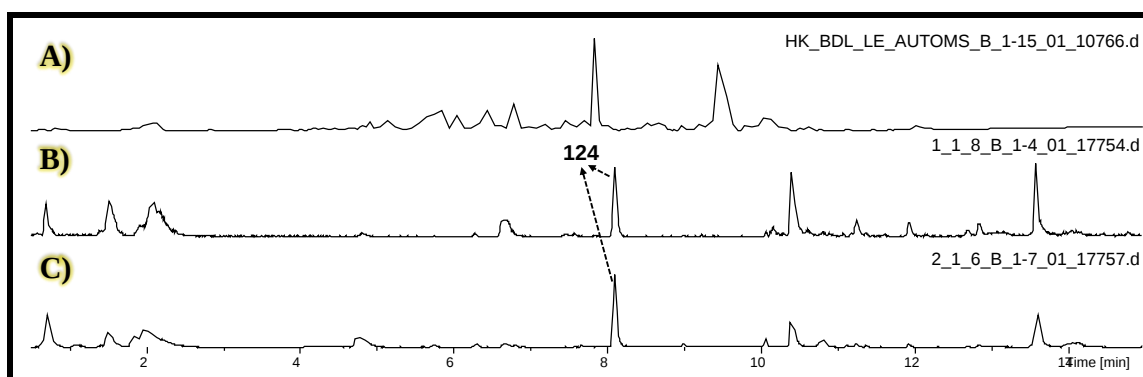


Figura 62. Perfil cromatográfico da linhagem selvagem (A) em comparação com as duas linhagens mutantes. B (1_1_8_1-4_01_17754), C (2_1_6_B_1-7_17757).

Também é possível afirmar que os genes deletados não estão relacionados com a biossíntese da atlantinona A (**124**), pois esta esteve presente nas linhagens selvagem e mutantes, sendo sua produção diretamente relacionada à constituição e condição do meio de cultivo. Como mencionado anteriormente, esse meroterpenoide já foi indentificado em algumas espécies de *Penicillium* e necessita de estudos aprofundados na identificação de possíveis bioatividades.

6. CONCLUSÃO

As mudanças de constituição e condição no cultivo de *Penicillium* sp. mostra uma variabilidade metabólica significativa, possibilitando estudos posteriores necessários para produção direcionada de compostos de interesse e exploração aprofundada de suas possíveis aplicações biotecnológicas.

Todas as moléculas anotadas estão relatadas na literatura, mostrando que o microrganismo estudado é produtor de moléculas com potenciais aplicações, incluindo a produção de pigmentos da classe dos policetídeos de interesse biotecnológico como, por exemplo, a esclerotiorina.

Penicillium sp. possui um *cluster* biossintético único capaz de produzir uma gama complexa de policetídeos pertencentes à subclasse das azafilonas.

A linhagem se mostra susceptível a mudanças oriundas de fatores externos e também da biologia molecular. Os genes deletados não estão envolvidos na biossíntese de ataltinona A, sendo sua produção limitada, a princípio, pela constituição do meio de cultivo.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, M. F.; KURTÁN, T.; MÁNDI, A.; MÜLLER, W. E.; FOUAD, M. A.; KAMEL, M. S.; LIU, Z.; EBRAHIM, W.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Induced secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* through bacterial co-culture and OSMAC approaches. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n. 27, p. 2647-2652, 2018.
- AI, H.-L.; ZHANG, L.-M.; CHEN, Y.-P.; ZI, S.-H.; XIANG, H.; ZHAO, D.-K.; SHEN, Y. Two new compounds from an endophytic fungus *Alternaria solani*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 14, n. 12, p. 1144-1148, 2012.
- ALFARO, C.; URIOS, A.; GONZÁLEZ, M. C.; MOYA, P.; BLANCO, M. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 539, n. 1-2, p. 187-194, 2003.
- AL-OLAYAN, E. M. Evaluation of pathogenicity of certain mitosporic ascomycete fungi to the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 17, n. 1, p. 97-100, 2013.
- ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; ZONNO, M. C.; EVIDENTE, A.; PENGUE, R.; FANTI, F.; POLONELLI, L. Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 8, p. 1131-1135, 2000.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ANTONELLI, A.; ZIZKA, A.; CARVALHO, F. A.; SCHARN, R.; BACON, C. D.; SILVESTRO, D.; CONDAMINE, F. L. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*115, v. 115, n. 23, p. 6043-6049, 2018.
- ATEBA, J. E.; TOGHUEO, R. M.; AWANTU, A. F.; MBA'NING, B. M.; GOHLKE, S.; SAHAL, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; TSANO, E.; BOYOM, F. F.; SEWALD, N.; LENTA, B. N. Antiplasmodial properties and cytotoxicity of endophytic fungi from *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). *Journal of Fungi*, v. 4, n. 2, p. 70, 2018.
- BAKTASH, A.; TERVEER, E. M.; ZWITTINK, R. D.; HORNUNG, B. V. H.; CORVER, J.; KUIJPER, E. J.; SMITS, W. K. Mechanistic insights in the success of fecal microbiota transplants for the treatment of *Clostridium difficile* infections. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1242, 2018.
- BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINE, A.; AUGUSTO, F.; FILL, T. P. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. *Química Nova*, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019.
- BILLS, G. F.; PLATAS, G.; OVERY, D. P.; COLLADO, J.; FILLOLA, A.; JIMÉNEZ, M. R.; MARTÍN, J.; DEL VAL, A. G.; VICENTE, F.; TORMO, J. R.; PELÁEZ, F.; CALATI, K.; HARRIS, G.; PARISH, C.; XU, D.; ROEMER, T. Discovery of the parnafungins,

antifungal metabolites that inhibit mRNA polyadenylation, from the *Fusarium larvarum* complex and other Hypocrealean fungi. *Mycologia*, v. 101, n. 4, p. 449-472, 2009.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

BOLZANI, V. S.; VALLI, M. P.; VIEGAS, M. C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry*, v. 13, n. 12, p. 1137-1163, 2009.

BORUTA, T.; PRZERYWACZ, P.; RYNGAJLLO, M.; BIZUKOJC, M. Bioprocess-related, morphological and bioinformatic perspectives on the biosynthesis of secondary metabolites produced by *Penicillium solitum*. *Process Biochemistry*, v. 68, p. 12-21, 2018.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Product Reports*, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

CAI, R.; WU, Y.; CHEN, S.; CUI, H.; LIU, Z.; LI, C.; SHE, Z. Peniisocoumarins A-J: isocoumarins from *Penicillium commune* QQF-3, an endophytic fungus of the mangrove plant *Kandelia candel*. *Journal Natural Products*, v. 81, n. 6, p. 1376-1383, 2018.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHEN, C.; TAO, H.; CHEN, W.; YANG, B.; ZHOU, X.; LUO, X.; LIU, Y. Recent advances in the chemistry and biology of azaphilones. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 10, n. 17, p. 10197-10220, 2020.

CHEN, D.; MA, S.; HE, L.; YUAN, P.; SHE, Z.; LU, Y. Sclerotiorin inhibits protein kinase G from *Mycobacterium tuberculosis* and impairs mycobacterial growth in macrophages. *Tuberculosis*, v. 103, p. 37-43, 2017.

CHENG, J.-S.; LIANG, Y.-Q.; DING, M.-Z.; CUI, S.-F.; LV, X.-M.; YUAN, Y.-J. Metabolic analysis reveals the amino acid responses of *Streptomyces lydicus* to pitching ratios during improving streptolydigin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 13, p. 5943-5954, 2013.

CHIDANANDA, C.; RAO, L. J. M.; SATTUR, A. P. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 20, p. 1633-1636, 2006.

CHIDANANDA, C.; SATTUR, A. P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 8, p. 2879-2883, 2007.

DALSGAARD, P. W.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. Ø.; ZIDORN, C.; FRISVAD, J. C.; CHRISTOPHERSEN, C.; LARSEN, T. O. Atlantinone A, a meroterpenoid produced by *Penicillium ribeum* and several cheese associated *Penicillium* species. *Metabolites*, v. 2, n. 1, p. 214-220, 2012.

DASAGRANDE, C.; PANDITH, A.; IMRAN, K. Sclerotiorin: a novel azaphilone with demonstrated membrane targeting and DNA binding activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, v. 48, n. 4, p. 429-438, 2020.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 41, n. 2, p. 185-201, 2014.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DOS SANTOS, P. O.; FERRAZ, C. G.; RIBEIRO, P. R.; MIRANDA, F. M.; DA SILVA, F.; DE SOUZA, J. T.; ROQUE, M. R. A.; SOARES, A. C. F. Antioxidant and antibacterial activities of the chlorine pigment sclerotiorin from *Penicillium mallochii* and its chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 86, p. 103915, 2019.

DU, L.; LI, D.; ZHU, T.; CAI, S.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. New alkaloids and diterpenes from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp. *Tetrahedron*, v. 65, n. 5, p. 1033-1039, 2009.

EL HAJJ ASSAF, C.; ZETINA-SERRANO, C.; TAHTAH, N.; KHOURY, A. E.; ATOUI, A.; OSWALD, I. P.; PUEL, O.; LORBER, S. Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 24, p. 9462, 2020.

FAO, Global Forest Resources Assessment 2020-Key findings. Rome, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.4060/ca8753en>>, acessado em 15 abril 2021.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>, acessado em 17 de abril 2021.

FORZZA, R. C. org., et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Vol. 1, Rio de Janeiro, 2010. 871 p.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 49, n. 1, p. 1-174, 2004.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, v. 49, p. 201-241, 2004.

GAO, J.-M.; YANG, S.-X.; QIN, J.-C. Azaphilones: chemistry and biology. *Chemical Reviews*, v. 113, n. 7, p. 4755-4811, 2013.

GASHGARI, R.; GHERBAWY, Y.; AMEEN, F.; ALSHARARI, S. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 9, n. 1, 2016.

GRAVES, K. D.; MILLER, P. M. Behavioral medicine in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Behavior Modification*, v. 27, n. 1, p. 3-25, 2003.

GUO, B.; DAI, J.-R.; NG, S.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTÉ, B. K. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 5, p. 602-604, 2000.

GUO, Q.; DONG, L.; ZANG, X.; GU, Z.; HE, X.; YAO, L.; CAO, L.; QIU, J.; GUAN, X. A new azaphilone from the entomopathogenic fungus *Hypocrella* sp. *Natural Product Research*, v. 29, n. 21, p. 2000-2006, 2015.

GUO, W.; PENG, J.; ZHU, T.; GU, Q.; KEYZERS, R. A.; LI, D. Sorbicillamines A–E, nitrogen-containing sorbicillinoids from the deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp. F23–2. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 11, p. 2106-2112, 2013.

GUO, W.; ZHANG, Z.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Penicyclones A–E, antibacterial polyketides from the deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Journal of Natural Products*, v. 78, n. 11, p. 2699-2703, 2015.

HARPER, J. K.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; ARIF, A.; GRANT, D. M.; PORCO, J.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HAUTBERGUE, T.; JAMIN, E. L.; COSTANTINO, R.; TADRIST, S.; MENEGHETTI, L.; TABET, J.-C.; PUEL, O. Combination of isotope labeling and molecular networking of tandem mass spectrometry data to reveal 69 unknown metabolites produced by *Penicillium nordicum*. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 19, p. 12191-12202, 2019.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017.

HEBRA, T.; ELIE, N.; POYER, S.; ELSLANDE, E. V.; TOUBOUL, D.; EPARVIER, V. Dereplication, annotation, and characterization of 74 potential antimicrobial metabolites from *Penicillium Sclerotiorum* using t-SNE molecular networks. *Metabolites*, v. 11, n. 7, p. 444, 2021.

HEBRA, T.; EPARVIER, V.; TOUBOUL, D. Atmospheric pressure photoionization versus electrospray for the dereplication of highly conjugated natural products using molecular networks. *Journal of Chromatography A*, v. 1630, p. 461533, 2020.

HEMPHILL, C. F. P.; SUREECHATCHAIYAN, P.; KASSACK, M. U.; ORFALI, R. S.; LIN, W.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *The Journal of Antibiotics*, v. 70, n. 6, p. 726-732, 2017.

HEMTASIN, C.; KANOKMEDHAKUL, S.; MOOSOPHON, P.; SOYTONG, K.; KANOKMEDHAKUL, K. Bioactive azaphilones from the fungus *Penicillium multicolor* CM01. *Phytochemistry Letters*, v. 16, p. 56-60, 2016.

HOANG, T. P. T.; ROULLIER, C.; BOUMARD, M.-C.; ROBIOU DU PONT, T.; NAZIH, H.; GALLARD, J.-F.; POUCHUS, Y. F.; BENIDDIR, M. A.; GROVEL, O. Metabolomics-driven discovery of meroterpenoids from a mussel-derived *Penicillium ubiquestum*. *Journal of Natural Products*, v. 81, n. 11, p. 2501-2511, 2018.

HOU, X.-M.; LI, Y.-Y.; SHI, Y.-W.; FANG, Y.-W.; CHAO, R.; GU, Y.-C.; SHAO, C.-L. Integrating molecular networking and ¹H NMR to target the isolation of chrysogeamides from a library of marine-derived *Penicillium* fungi. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 84, n. 3, p. 1228-1237, 2019.

HU, Y.; ZHANG, J.; LIU, D.; GUO, J.; LIU, T.; XIN, Z. Pencitrin and pencitrinol, two new citrinin derivatives from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* salicorn 46. *Phytochemistry Letters*, v. 22, p. 229-234, 2017.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Biodiversidade brasileira. Agência IBGE notícias, 2019. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br>>, acessado em 16 de abril de 2021.

IOCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. *Natural Product Reports*, v. 31, n. 5, p. 646-675, 2014.

IWATSUKI, M.; OTOGURO, K.; ISHIYAMA, A.; NAMATAME, M.; NISHIHARA-TUKASHIMA, A.; HASHIDA, J.; NAKASHIMA, T.; MASUMA, R.; TAKAHASHI, Y.; YAMADA, H.; ŌMURA, S. In vitro antitrypanosomal activity of 12 low-molecular-weight antibiotics and observations of structure/activity relationships. *The Journal of Antibiotics*, v. 63, n. 10, p. 619-622, 2010.

JIA, Q.; DU, Y.; WANG, C.; WANG, Y.; ZHU, T.; ZHU, W. Azaphilones from the marine sponge-derived fungus *Penicillium sclerotiorum* OUCMDZ-3839. *Marine drugs*, v. 17, n. 5, p. 260, 2019.

KANOKMEDHAKUL, K.; KANOKMEDHAKUL, S.; SUWANNATRAI, R.; SOYTONG, K.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Bioactive meroterpenoids and alkaloids from the fungus *Eurotium chevalieri*. *Tetrahedron*, v. 67, n. 30, p. 5461-5468, 2011.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KETTERING, M.; VALDIVIA, C.; STERNER, O.; ANKE, H.; THINES, E. Heptemerones A-G, seven novel diterpenoids from *Coprinus heptemerus*: producing organism, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 6, p. 390-396, 2005.

KIM, H. Y.; HEO, D. Y.; PARK, H. M.; SINGH, D.; LEE, C. H. Metabolomic and transcriptomic comparison of solid-state and submerged fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS One*, v. 11, n. 2, p. e0149012, 2016.

KIM, H. Y.; PARK, H. M.; LEE, C. H. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 90, n. 3, p. 327-335, 2012.

KIM, W. K.; SANG, H. K.; WOO, S. K.; PARK, M. S.; PAUL, N. C.; YU, S. H. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycobiology*, v. 35, n. 4, p. 180-185, 2007.

KRUG, D.; ZUREK, G.; REVERMANN, O.; VOS, M.; VELICER, G. J.; MÜLLER, R. Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 10, p. 3058-3068, 2008.

- KUHNERT, E.; LI, Y.; LAN, N.; YUE, Q.; CHEN, L.; COX, R. J.; BILLS, G. F. Enfumafungin synthase represents a novel lineage of fungal triterpene cyclases. *Environmental Microbiology*, v. 20, n. 9, p. 3325-3342, 2018.
- KURIAKOSE, G. C.; LAKSHMANAN, M. D.; BP, A.; RS, H. K.; TH, A. K.; ANANTHASWAMY, K. C. J. Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 105, p. 1062-1071, 2018.
- LAZARUS, H.; MILLER, M. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *Journal of Blood Medicine*, v. 7, p. 73, 2016.
- LI, C.; HE, H.; WANG, J.; LIU, H.; WANG, H.; ZHU, Y.; XIANG, W. Characterization of a LAL-type regulator NemR in nemadectin biosynthesis and its application for increasing nemadectin production in *Streptomyces cyaneogriseus*. *Science China Life Sciences*, v. 62, n. 3, p. 394-405, 2019.
- LIU, W.-C.; YANG, F.; ZHANG, R.; SHI, X.; LU, X.-H.; LUAN, Y.-S.; XIU, Z.-L.; DONG, Y.-S. Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method. *Phytochemistry Letters*, v. 18, p. 157-161, 2016.
- LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 785-789, 2007.
- MA, G.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; LI, Z.; PASCO, D. S.; KHAN, I. A. Antimicrobial and antileishmanial activities of hypocrellins A and B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 11, p. 4450-4452, 2004.
- MAIA, L. C.; JÚNIOR, A. A. C.; CAVALCANTI, L. H.; GUGLIOTTA, A. M.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SANTIAGO, A. L. M. A.; CÁCERES, M. E. S.; GILBERTONI, T. B.; APTROOT, A.; GIACHINI, A. J.; SOARES, A. M. S.; SILVA, A. C. G.; MAGNAGO, A. C.; GOTO, B. T.; LIRA, C. R. S.; MONTOYA, C. A. S.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SILVA, D. K. A.; SOARES, D. J.; REZENDE, D. H. C.; LUZ, E. D. M. N.; GUMBOSKI, E. L.; WARTCHOW, F.; KARSTEDT, F.; FREIRE, F. M.; COUTINHO, F. P.; MELO, G. S. N.; SOTÃO, H. M. P.; BASEIA, I. G.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, J. J. S.; SOUZA, J. F.; BEZERRA, J. L.; NETA, L. S. A.; PFENNING, L. H.; GUSMÃO, L. F. P.; NEVES, M. A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M. C. W.; PULGARÍN, M. P.; JUNIOR, N. M.; MEDEIROS, P. S.; FRIEDRICH, R. C. S.; CHIKOWSKI, R. S.; PIRES, R. M.; MELO, R. F.; SILVEIRA, R. M. B.; URREA-VALENCIA, S.; CORTEZ, V. G.; SILVA, V. F. Diversity of Brazilian fungi. *Rodriguésia*, v. 66, p. 1033-1045, 2015.
- MATSUZAKI, K.; IKEDA, H.; MASUMA, R.; TANAKA, H.; OMURA, S. Isochromophilones I and II, novel inhibitors against gp120-CD4 binding produced by *Penidllium multicolor* FO-2338 I. Screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, n. 7, p. 703-707, 1995.
- MATSUZAKI, K.; TAHARA, H.; INOKOSHI, J.; TANAKA, H.; MASUMA, R.; OMURA, S. New brominated and halogen-less derivatives and structure-activity relationship of

azaphilones inhibiting gp120-CD4 binding. *The Journal of Antibiotics*, v. 51, n. 11, p. 1004-1011, 1998.

MEDEIROS, L. S. Prospecção química do metabolismo de fungos endofíticos isolados de maçã (*Malus domestica*) e goiaba (*Psidium guajava*). Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade federal de São Carlos (UFSCar), Brasil, 2014.

MENG, L.-H.; LI, X.-M.; LIU, Y.; XU, G.-M.; WANG, B.-G. Antimicrobial alkaloids produced by the mangrove endophyte *Penicillium brocae* MA-231 using the OSMAC approach. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 7, n. 87, p. 55026-55033, 2017.

MICHAEL, A. P.; GRACE, E. J.; KOTIW, M.; BARROW, R. A. Isochromophilone IX, a novel GABA-containing metabolite isolated from a cultured fungus, *Penicillium* sp. *Australian Journal of Chemistry*, v. 56, n. 1, p. 13-15, 2003.

MISHRA, V. K.; SINGH, G.; PASSARI, A. K.; YADAV, M. K.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. P. Distribution and antimicrobial potential of endophytic fungi associated with ethnomedicinal plant *Melastoma malabathricum* L. *Journal of Environmental Biology*, v. 37, n. 2, p. 229, 2016.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. 5º relatório nacional para a convenção sobre a diversidade biológica. Brasília - DF, 2016. 240 p.

MO, T.-X.; HUANG, X.-S.; ZHANG, W.-X.; SCHÄBERLE, T. F.; QIN, J.-K.; ZHOU, D.-X.; QIN, X.-Y.; XU, Z.-L.; LI, J.; YANG, R.-Y. A series of meroterpenoids with rearranged skeletons from an endophytic fungus *Penicillium* sp. GDGJ-285. *Organic Chemistry Frontiers*, v. 8, n. 10, p. 2232-2241, 2021.

MORALES-OYERVIDES, L.; RUIZ-SÁNCHEZ, J. P.; OLIVEIRA, J. C.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; GIUFFRIDA, D.; MONTAÑEZ, J. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review. *Biotechnology Advances*, p. 107601, 2020.

NAM, J. Y.; SON, K. H.; KIM, H. K.; HAN, M. Y.; KIM, S. U.; CHOI, J. D.; KWON, B. M. Sclerotiorin and isochromophilone IV: inhibitors of Grb2-Shc interaction, isolated from *Penicillium multicolor* F1753. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 544-546, 2000.

NEVES, M. R. P. Produção de colorantes e atividade biológica de esclerotiorina. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2016.

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*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICOLETTI, R.; TRINCONE, A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Marine drugs*, v. 14, n. 2, p. 37, 2016.

NIU, G.; ZHENG, J.; TAN, H. Biosynthesis and combinatorial biosynthesis of antifungal nucleoside antibiotics. *Science China Life Sciences*, v. 60, n. 9, p. 939-947, 2017.

ŌMURA, S.; TANAKA, H.; MATSUZAKI, K.; IKEDA, H.; MASUMA, R. Isochromophilones I and II, novel inhibitors against gp120-CD4 binding from *Penicillium* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 46, n. 12, p. 1908-1911, 1993.

ÖZKAYA, F. C.; EBRAHIM, W.; EL-NEKETI, M.; TANRIKUL, T. T.; KALSCHUEER, R.; MÜLLER, W. E.; GUO, Z.; ZOU, K.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach. *Fitoterapia*, v. 131, p. 9-14, 2018.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: a literature review. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 294, 2019.

PANDIT, S. G.; PUTTANANJAIH, M. H.; HAROHALLY, N. V.; DHALE, M. A. Functional attributes of a new molecule-2-hydroxymethyl-benzoic acid 2'-hydroxy-tetradecyl ester isolated from *Talaromyces purpureogenus* CFRM02. *Food Chemistry*, v. 255, p. 89-96, 2018.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007.

PAVESI, C.; FLON, V.; MANN, S.; LELEU, S.; PRADO, S.; FRANCK, X. Biosynthesis of azaphilones: a review. *Natural Product Reports*, v. 38, p. 1058-1071, 2021.

PELÁEZ, F.; CABELLO, A.; PLATAS, G.; DÍEZ, M. T.; DEL VAL, A. G.; BASILIO, A.; MARTÁN, I.; VICENTE, F.; BILLS, G. F.; GIACOBBE, R. A.; SCHWARTZ, R. E.; ONISHI, J. C.; MEINZ, M. S.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; URTZ, M. B. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, n. 3, p. 333-343, 2000.

PITT, J. I. *PENICILLIUM/Penicillium* and *Talaromyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 6-13, 2014.

PORTACCIO, E. Evidence-based assessment of potential use of fingolimod in treatment of relapsing multiple sclerosis. *Core Evidence*, v. 6, p. 13, 2011.

RIVERA, K. G.; DÍAZ, J.; CHAVARRÍA-DÍAZ, F.; GARCIA, M.; URB, M.; THORN, R. G.; LOUIS-SEIZE, G.; JANSEN, D. H.; SEIFERT, K. A. *Penicillium mallochii* and *P. guanacastense*, two new species isolated from Costa Rican caterpillars. *Mycotaxon*, v. 119, n. 1, p. 315-328, 2012.

RIVERA, K. G.; SEIFERT, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Studies in Mycology*, v. 70, n. 1, p. 139-158, 2011.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2009.

SATO, S. Microbial production and control of cellular growth under high dissolved oxygen concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 70, n. 4, p. 293-293, 1990.

SEGRS, K.; DECLERCK, S.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V.; EECKHAUT, A. V. Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, v. 11, n. 24, p. 2297-2318, 2019.

SHAH, S. G.; SHIER, W. T.; TAHIR, N.; HAMEED, A.; AHMAD, S.; ALI, N. *Penicillium verruculosum* SG: a source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines. *Archives of Microbiology*, v. 196, n. 4, p. 267-278, 2014.

SHIBNEV, V. A.; MISHIN, D. V.; GARAEV, T. M.; FINOGENOVA, N. P.; BOTIKOV, A. G.; DERYABIN, P. G. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 151, n. 5, p. 612, 2011.

SI, Y.; TANG, M.; LIN, S.; CHEN, G.; FENG, Q.; WANG, Y.; HUA, H.; BAI, J.; WANG, H.; PEI, Y. (2018). Cytotoxic cytochalasins from *Aspergillus flavipes* PJ03-11 by OSMAC method. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n. 18, p. 1767-1771, 2018.

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 2087, 2017.

SON, S.; KO, S.-K.; KIM, J. W.; LEE, J. K.; JANG, M.; RYOO, I.-J.; HWANG, G. J.; KWON, M. C.; SHIN, K.-S.; FUTAMURA, Y.; HONG, Y.-S.; OH, H.; KIM, B. Y.; UEKI, M.; TAKAHASHI, S.; OSADA, H.; JANG, J.-H.; AHN, J. S. Structures and biological activities of azaphilones produced by *Penicillium* sp. KCB11A109 from a ginseng field. *Phytochemistry*, v. 122, p. 154-164, 2016.

SOUSA, T. F. Análise *in silico* e funcional do *cluster* gênico biossintético de esclerotiorina e derivados em *Penicillium* sp. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, 2021.

SOUZA, M. P. Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2012.

STADLER, M.; ANKE, H.; DEKERMENDJIAN, K.; REISS, R.; STERNER, O.; WITT, R. Novel bioactive azaphilones from fruit bodies and mycelial cultures of the Ascomycete *Bulgaria inquinans* (FR.). *Natural Product Letters*, v. 7, n. 1, p. 7-14, 1995.

STADLER, M.; KELLER, N. P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research*, v. 112, p. 127-130, 2008.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; Chau, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002.

TANG, J.-L.; ZHOU, Z.-Y.; YANG, T.; YAO, C.; WU, L.-W.; LI, G.-Y. Azaphilone alkaloids with anti-inflammatory activity from fungus *Penicillium sclerotiorum* cib-411. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 8, p. 2175-2182, 2019.

TER STEEGE, H.; MOTA DE OLIVEIRA, S.; PITMAN, N. C. A.; SABATIER, D.; ANTONELLI, A.; ANDINO, J. E. G.; AYMARD, G. A.; SALOMÃO, R. P. Towards a dynamic list of Amazonian tree species. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2019.

TOGHUEO, R. M. K.; BOYOM, F. F. Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants-A systematic review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101430, 2019.

TOGHUEO, R. M. K.; BOYOM, F. F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, v. 10, n. 3, p. 1-35, 2020.

VIEIRA, R.; DE SOUSA, K. A.; MONTEIRO, A. F.; PINTO, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Induction of metabolic variability of the endophytic fungus *Xylaria* sp. by OSMAC approach and experimental design. *Archives of Microbiology*, p. 1-8, 2021.

VINAYAVEKHIN, N.; SAGHATELIAN, A. Untargeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, p. 1-24, 2010.

WANG, L.-W.; XU, B.-G.; WANG, J.-Y.; SU, Z.-Z.; LIN, F.-C.; ZHANG, C.-L.; KUBICEK, C. P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. *Applied microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WANG, C.-Y.; HAO, J.-D.; NING, X.-Y.; WU, J.-S.; ZHAO, D.-L.; KONG, C.-J.; SHAO, C.-L.; WANG, C.-Y. Penicilazaphilones D and E: two new azaphilones from a sponge-derived strain of the fungus *Penicillium sclerotiorum*. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 8, n. 8, p. 4348-4353, 2018.

WEI, L. X.; ZHANG, H. X.; TAN, J. L.; CHU, Y. S.; LI, N.; XUE, H. X.; ZHANG, K. Q. Arthrotrisin A–C, oligosporins from the nematode-trapping fungus *Arthrotrix oligospora*. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 1526-1530, 2011.

WU, Y. Y.; ZHANG, T. Y.; ZHANG, M. Y.; CHENG, J.; ZHANG, Y. X. An endophytic fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, v. 128, p. 265-271, 2018.

XIE, C.-L.; LIU, Q.; HE, Z.-H.; GAI, Y.-B.; ZOU, Z.-B.; SHAO, Z.-Z.; LIU, G.-M.; CHEN, H.-F.; YANG, X.-W. Discovery of andrastones from the deep-sea-derived *Penicillium allii-sativi* MCCC 3A00580 by OSMAC strategy. *Bioorganic Chemistry*, v. 108, p. 104671, 2021.

XIE, C.-L.; XIA, J.-M.; LIN, T.; LIN, Y.-J.; LIN, Y.-K.; XIA, M.-L.; CHEN, H.-F.; LUO, Z.-H.; SHAO, Z.-Z.; YANG, X.-W. Andrastone A from the deep-sea-derived fungus *Penicillium allii-sativi* acts as an inducer of Caspase and RXR α -dependent apoptosis. *Frontiers in chemistry*, v. 7, p. 692, 2019.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, V.; SANGWAN, P.; MISHRA, S.; PANJIAR, N.; SAXENA, A. K. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, Elsevier, p. 3-18, 2018.

YAMAMOTO, T.; IZUMI, N.; UI, H.; SUEKI, A.; MASUMA, R.; NONAKA, K.; SHIOMI, K. Wickerols A and B: novel anti-influenza virus diterpenes produced by *Trichoderma atroviride* FKI-3849. *Tetrahedron*, v. 68, n. 45, p. 9267-9271, 2012.

YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 914, p. 17-34, 2016.

YIN, S.; WANG, X.; SHI, M.; YUAN, F.; WANG, H.; JIA, X.; YUAN, F.; SUN, J.; LIU, T.; YANG, K.; ZHANG, Y.; FAN, K.; LI, Z. Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus*. *Science China Life Sciences*, v. 60, n. 9, p. 992-999, 2017.

YU, J.-Y.; SHI, T.; ZHOU, Y.; XU, Y.; ZHAO, D.-L.; WANG, C.-Y. Naphthalene derivatives and halogenate quinoline from the coral-derived fungus *Trichoderma harzianum* (XS-20090075) through OSMAC approach. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 23, n. 3, p. 250-257, 2021.

YU, X.; GAO, Y.; FRANK, M.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; MÜLLER, W. E. G.; KALSCHUEER, R.; GUO, Z.; ZOU, K.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Induction of ambuic acid derivatives by the endophytic fungus *Pestalotiopsis lespedezae* through an OSMAC approach. *Tetrahedron*, v. 79, p. 131-876, 2021.

ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; AL-OTHMAN, M. R.; ALAFEEFY, A. M.; EL-MELIGY, R. M. Biological activity of fungal secondary metabolites. *International Journal of Chemical and Applied Biological Sciences*, v. 1, n. 1, p. 14-22, 2014.

ZAIN, M. E.; RAZAK, A. A.; EL-SHEIKH, H. H.; SOLIMAN, H. G.; KHALIL, A. M. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 5, p. 280-286, 2009.

ZHANG, B.; WANG, K. B.; WANG, W.; BI, S. F.; MEI, Y. N.; DENG, X. Z.; GE, H. M. Discovery, biosynthesis, and heterologous production of streptoseomycin, an anti-microaerophilic bacteria macrodilactone. *Organic Letters*, v. 20, n. 10, p. 2967-2971, 2018.

ZHANG, S.; FANG, H.; YIN, C.; WEI, C.; HU, J.; ZHANG, Y. Antimicrobial metabolites produced by *Penicillium mallochii* CCH01 isolated from the gut of *Ectropis oblique*, cultivated in the presence of a histone deacetylase inhibitor. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 2186, 2019.