



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Investigação do potencial antimicrobiano e químico de *Penicillium*
spp aquático da Amazônia

Manaus – AM

2022

Paulo Alexandre Lima Santiago

Investigação do potencial antimicrobiano e químico de *Penicillium*
spp aquático da Amazônia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de doutor em Química na área de concentração Química Orgânica.

Orientador(a): Prof(a). Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
(DQ/UFAM)

Co-orientador(a): Prof(a). Dra. Priscila Ferreira de Aquino
(FioCruz/AM)

Manaus – AM

2022

Ficha Catalográfica

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

S235i Santiago, Paulo Alexandre Lima
Investigação do potencial antimicrobiano e químico de *Penicillium* spp aquático da Amazônia / Paulo Alexandre Lima Santiago . 2022
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientadora: Priscila Ferreira de Aquino
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Penicillium* spp. 2. Metabólitos secundários. 3. Antimicrobiano.
4. Citrinina. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RESUMO

Os fungos do gênero *Penicillium* produzem metabólitos secundários que são utilizados como modelo para a síntese e desenvolvimento de antibióticos como a penicilina, penicilina V, ampicilina, amoxilina e griseofulvina. A produção de tais compostos pode ser explorada através de alterações em parâmetros físicos e químicos do cultivo. Essas alterações estimulam rotas biossintéticas silenciadas e isso aumenta a diversidade de compostos bioativos produzidos pelo fungo. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é investigar o perfil metabolômico e o potencial biológico de quatro espécies do gênero *Penicillium* isolados no Amazonas. As linhagens estudadas nesse trabalho estão depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), e foram reativadas em meio BDA por sete dias. Para a produção dos extratos, utilizou-se uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^{-6} UFC/mL. Inoculou-se 50 µL desta suspensão em erlenmeyers contendo 300 mL dos meios BDL, SB, YES e ISP₂. O experimento foi realizado em triplicata, em modo estático, incubado à 28 °C por 15 dias. Passado esse período, o caldo fermentado foi extraído com acetato de etila e o micélio com metanol. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos contra os patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos das linhagens *P. purpurogenum* em ISP₂, SB e YES contra *Candida albicans*, apresentaram concentração inibitória mínima de 500 µg/mL, 31,25 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente. No teste contra *Candida tropicalis* e *Staphylococcus aureus*, a CIM para os extratos de *P. purpurogenum* cultivados em SB foi de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente. Outros resultados relevantes foram os observados para os extratos de *P. oxalicum* e *P. citrinum* cultivados em BDL e SB com CIM de 250 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente. Devido ao bom desempenho dos extratos de *P. purpurogenum*, *P. oxalicum* e *P. citrinum* em SB, realizou-se um cultivo em larga escala seguido de extração do caldo e fracionamento em sílica C18 com gradiente de MeOH/H₂O de 10%, 50% e 100%. Este procedimento, levou ao isolamento de duas substâncias não descritas em *P. purpurogenum*, cujas estruturas foram determinadas por métodos espectroscópicos como RMN de 1D (1H RMN e 13C RMN) e 2D (HMBC e HSQC), HRMS e MS/MS. As substâncias isoladas foram identificadas como dois derivados da citrinina, dihidrocitrinina (1) e 1-metildihidrocitrinina (2). As demais substâncias presentes nas frações de *P. purpurogenum*, *P. oxalicum* e *P. citrinum* foram caracterizados por LC-MS/MS e quando possível HRMS. Os compostos caracterizados pertencem a classe dos terpenos, policetídeos, oleamidas, benzofenonas e alcaloides revelando com isso o potencial dos *Penicillium* spp para obtenção de compostos com elevada importância química e biotecnológica.

Palavras-chave: *Penicillium* spp, metabólitos secundários e antimicrobiano.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Penicillium* produce secondary metabolites used as a model for synthesizing and developing antibiotics such as penicillin, penicillin V, ampicillin, amoxicillin, and griseofulvin. The production of such compounds can be explored through changes in the physical and chemical parameters of the crop. These changes stimulate silenced biosynthetic pathways, increasing the diversity of bioactive compounds produced by the fungus. Therefore, the present study aims to investigate the metabolomic profile and biological potential of four species of *Penicillium* isolated in the Amazon. The strains studied in this work were deposited in the Collection of Fungi from the Amazon (CFAM) of the Instituto Leônidas and Maria Deane (ILMD). They were reactivated in PDA medium for seven days. A spore suspension was used at a concentration of 1×10^{-6} CFU/mL to produce extracts. 50 μ L of this suspension was inoculated into erlenmeyer containing 300 mL of BDL, SB, YES, and ISP2 media. The experiment was carried out in triplicate, in static mode, and incubated at 28 °C for 15 days. After this period, the fermented broth was extracted with ethyl acetate and the mycelium with methanol. The extracts' minimum inhibitory concentration (MIC) against the pathogens *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus* were determined. The extracts of *P. purpurogenum* strains in ISP2, SB, and YES against *Candida albicans* showed a minimum inhibitory concentration of 500 μ g.mL⁻¹, 31.25 μ g.mL⁻¹, and 62.5 μ g.mL⁻¹, respectively. In the test against *Candida tropicalis* and *Staphylococcus aureus*, the MIC for *P. purpurogenum* extracts grown in SB was 250 μ g.mL⁻¹ and 125 μ g.mL⁻¹, respectively. Other relevant results were observed for extracts of *P. oxalicum* and *P. citrinum* cultivated in BDL and SB with MIC of 250 μ g.mL⁻¹ and 62.5 μ g.mL⁻¹, respectively. Due to the good performance of *P. purpurogenum*, *P. oxalicum*, and *P. citrinum* extracts in SB, large-scale cultivation was carried out, followed by broth extraction and fractionation on C18 silica with a MeOH/H₂O gradient of 10%, 50 %, and 100%. This procedure led to the isolation of two undescribed substances in *P. purpurogenum*, whose structures were determined by spectroscopic methods such as 1D NMR (1H NMR and 13C NMR) and 2D NMR (HMBC and HSQC), HRMS and MS/MS. The isolated substances were identified as two citrinin derivatives, dihydrocitrinin (1) and 1-methyldihydrocitrinin (2). The other substances present in the fractions of *P. purpurogenum*, *P. oxalicum*, and *P. citrinum* were characterized by LC-MS/MS and, when possible, HRMS. The compounds characterized belong to the class of terpenes, polyketides, oleamides, benzophenones, and alkaloids, thus revealing the potential of *Penicillium* spp to obtain compounds with high chemical and biotechnological importance.

Keywords: *Penicillium* spp, secondary metabolites and antimicrobial.

Lista de Figuras

Figura 1: Extensão territorial da Amazônia brasileira.	3
Figura 2: Decomposição da matéria orgânica realizada por fungo.	5
Figura 3: Desenvolvimento das hifas e suas características das hifas.....	6
Figura 4: Representantes das principais classes químicas encontradas nos fungos. (a) policetídeos – Aflatoxina B1, (b) Alcaloide - Ergotamina, (c) Terpeno – Micotoxina T2 e (d) peptídeo não ribossomal – Penicilina G.....	8
Figura 5: Bioativos obtidos a partir de fungos.	9
Figura 6: Antibiose entre um fungo e uma bactéria em placa de petri.	10
Figura 7: Espécies do gênero <i>Penicillium</i> descritas por Link (a) – Micromorfologia de <i>Penicillium</i> sp. (b) – <i>P. candidum</i> , (c) - <i>P. glaucum</i> e (d) - <i>P. expansum</i>	13
Figura 8: Fito-hormônios de plantas.....	13
Figura 9: <i>P. chrysogenum</i> produtor de Penicilina G.	14
Figura 10: Derivados da Penicilina G.	15
Figura 11: Metabólitos secundários de <i>P. chrysogenum</i>	16
Figura 12: Culturas de <i>P. purpurogenum</i> em diferentes condições. Em A – Meio de cultura YES com crescimento por 7 dias e em B – Meio de cultura BDA com crescimento por 6 dias (MAPARI, et al., 2009) modificado.	16
Figura 13: Pigmentos de <i>P. purpurogenum</i>	17
Figura 14: Compostos isolados de <i>P. purpurogenum</i>	18
Figura 15: Terpenos isolados de <i>P. purpurogenum</i>	18
Figura 16: Compostos isolados de <i>P. purpurogenum</i> com atividade bactericida	19
Figura 17: Estrutura das Penicimutamidas (LI, et al., 2016) modificado.	20
Figura 18: Derivados do ácido secalônico.....	21
Figura 19: Compostos isolados de <i>P. oxalicum</i>	22
Figura 20: Metabólito de <i>P. citreonigrum</i>	23
Figura 21: Variedade de compostos obtidos de <i>P. citreonigrum</i>	24
Figura 22: Metabólitos secundários obtidos do <i>P. citrinum</i>	25
Figura 23: Bioativos de <i>P. citrinum</i> de importância biotecnológica.....	26
Figura 24: Metabólitos de <i>P. citrinum</i> com atividade bactericida.....	27
Figura 25: Diagrama ilustrativo de um HPLC Kenneth, R. (2018) modificado..	29
Figura 26: Diagrama de um sistema CL-MS.	30
Figura 27: Esquema de uma interface ESI Gates, P (2020) modificado.	31
Figura 28: Esquema de uma interface APCI Gates, P (2020) modificado.....	32
Figura 29: Cultivo do fungo e filtração a vácuo.	36
Figura 30: Obtenção dos extratos metanólicos	36
Figura 31: Obtenção dos extratos em acetato.....	37
Figura 32: Concentrações obtidas a partir das sucessivas diluições.	40
Figura 33: Procedimento de fracionamento dos extratos de <i>Penicillium</i> spp ...	77
Figura 34: A - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 401. B - Oflobolina C.	78
Figura 35: A – Espectro de MS/MS ESI(+) íon <i>m/z</i> 379; B – Cromatograma $\lambda=254$ nm. C – Estrutura da Penicitrona B.	79

Figura 36: A – Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 563; B ₁ – Dioleamida; B ₂ – Oleamida.....	80
Figura 37: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 223; B – 3-[2(R)-hidroxibutil]-7-hidroxiftalida.....	81
Figura 38: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 501; B – Perinadina A.	82
Figura 39: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 375; B – Análogo da perinadina A.....	82
Figura 40: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 434; B – dicitrinina D.	83
Figura 41: Espectros de Massas (A-C) dos íons MS/MS ESI(+) m/z 245, 253 e 317. Estruturas da uridina, milanserina B e benzofenona, A1-C1 respectivamente.	84
Figura 42: Espectros de Massas (A-C) dos íons MS/MS ESI(+) m/z 197, 211 e 261. Estruturas da L-prolina-L-valina, L-leucina-L-prolina e L-fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina, A1-C1 respectivamente.....	85
Figura 43: Espectros de Massas do íon MS/MS ESI(+) m/z 434. B- Meleagrina.	86
Figura 44: A - Espectros de Massas do íon MS/MS ESI(+) m/z 420. A1 - Roquefortina I. B – Roquefortina C. B1 - Roquefortina C.....	86
Figura 45: Estrutura da citrinina	100
Figura 46: A - Espectro de MS/MS ESI [M-H] ⁻ do íon m/z 251. B – Proposta de fragmentação do íon m/z 251.....	104
Figura 47: Estrutura química da dihidrocitrina.	106
Figura 48: Espectro de MS/MS ESI [M-H] ⁻ do íon m/z 265. B – Proposta de fragmentação do íon m/z 265.....	107
Figura 49: Estrutura química da 1-metil-dihidrocitrina.	108

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fungos como fonte de metabólitos secundários	10
Tabela 2: Códigos de coleção e de trabalho das linhagens de <i>Penicillium</i> spp.	35
Tabela 3: Extratos obtidos e fungos testados	38
Tabela 8: Valores de CIM dos extratos de <i>P. purpurogenum</i> frente à diferentes patógenos.....	103
Tabela 9: Dados referentes aos espectros de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (300 MHz) da Dihidrocitrina (Composto1) em MeOD.	105
Tabela 10: Dados referentes aos espectros de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (300 MHz) da 1-Metildihidrocitrina (Composto2) em MeOD.	107

Sumário

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas	8
1 Introdução.....	1
2 Referência bibliográfica.....	3
2. 1 <i>Amazônia brasileira e sua biodiversidade</i>	3
3 Fungos	4
3.1 <i>Fungos como fonte de metabólitos secundários</i>	6
3.2.1 <i>Substâncias bioativas de obtidas de P. chrysogenum</i>	14
3.2.2 <i>Substâncias bioativas de P. purpurogenum</i>	16
3.2.3 <i>Substâncias bioativas de Penicillium oxalicum.....</i>	20
3.2.4 <i>Substâncias Bioativas de Penicillium citreonigrum.....</i>	22
3.2.5 <i>Substâncias Bioativas de Penicillium citrinum.....</i>	24
4 Técnicas analíticas empregadas na identificação de metabólitos secundários	27
4.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	27
4.2 <i>Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.....</i>	29
5 Objetivo geral	34
5.1 <i>Objetivos específicos</i>	34
6 Metodologia geral.....	35
6. 1 <i>Obtenção e reativação das linhagens</i>	35
6.2 <i>Obtenção dos extratos fúngicos</i>	35
6.3 <i>Preparo dos inóculos e amostras para avaliação do potencial antimicrobiano</i>	37
6.4 <i>Concentração inibitória mínima- CIM</i>	39
6.5 <i>Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE-DAD</i>	40
6.6 <i>Cromatografia em coluna – CC</i>	40
6.7 <i>Análises de ultra fast liquid chromatography acoplada ao espectrômetro de massas – UFLC-MS/MS.....</i>	40
6.8 <i>Isolamento dos compostos de interesse por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa.....</i>	41
7. Referências bibliográficas.....	42

Capítulo I.....	58
Resumo.....	59
Abstract.....	60
Resumen.....	60
1 Introdução	60
1.1 Microrganismos: importância e relação com metabólitos secundários.....	60
1.2 Fungos do gênero <i>Penicillium</i> spp como fontes de metabólitos secundários	61
2. Metodologia.....	62
2.1 Reativação das linhagens fúngicas	62
2.2 Cultivo em escala laboratorial e obtenção dos extratos	63
2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM.....	63
3 Resultados e Discussão	64
3. 1 Rendimento dos extratos.....	64
3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos extratos de <i>Penicillium</i> spp	64
3.2.1 <i>Penicillium oxalicum</i>	64
3.2.2 <i>Penicillium citrinum</i>	65
3.2.3 <i>Penicillium citreonigrum</i>	66
4. Considerações Finais.....	67
Agradecimentos	67
Referências	68
Capítulo II.....	72
Resumo.....	73
1 Introdução	74
2. Metodologia.....	75
2.1 Procedimentos gerais.....	75
2.2 Linhagens fúngicas e cultivo em escala laborarorial	75
2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antimicrobiana dos extratos	75
2.4 Semi-purificação das amostras e análises de UFLC-MS/MS.....	76
3 Resultados e Discussão	76
3.1 Rendimento dos extratos e CIM	76
3.2 Caracterização dos compostos químicos dos extratos de <i>Penicillium</i> spp. 77	

3.2.1 <i>Rendimento das frações</i>	77
3.2.2 <i>Penicillium purpurogenum</i>	77
3.2.3 <i>Penicillium citrinum</i>	81
3.2.4 <i>Penicillium oxalicum</i>	85
4. Considerações Finais	87
Agradecimentos	87
Referências	88
Capítulo III	96
RESUMO.....	99
1. Introdução	99
2. Materiais e métodos	101
2.1 <i>Procedimentos experimentais gerais</i>	101
2.2 <i>Reativação da linhagem fúngica</i>	101
2.3 <i>Obtenção dos extratos e determinação da concentração inibitória mínima – CIM</i>	102
2.4 <i>Extração em escala ampliada e isolamento dos compostos 1 e 2</i>	102
3. Resultados e discussão.....	103
3.1 <i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos extratos de P. purpurogenum</i>	103
3.2 <i>Determinação estrutural</i>	104
4. Conclusão	109
5. Referências	110
6 Material suplementar	114

1 Introdução

Os microrganismos pertencem a um grupo heterogêneo de seres que vivem de forma independente ou em comunidades e encontram-se amplamente distribuídos em diversos tipos de ecossistemas (CARDOSO e ANDREOTE, 2016). Dentre estes seres, os fungos e as bactérias são aqueles que através de reações químicas de decomposição, participam da manutenção de diversos processos ecológicos. Logo, apresentam um papel fundamental na ciclagem dos nutrientes em ecossistemas aquáticos e terrestres (THOMAZ, 2009).

Conforme exposto, os fungos são fundamentais para o equilíbrio ambiental, mas, vale destacar que estes organismos podem estabelecer relações mutualísticas com plantas e com outros organismos. Essas relações são vantajosas pois auxiliam na adaptação das espécies ao ambiente, promovem a tolerância contra fatores de estresse, aumentam a resistência ao ataque de insetos e reduzem a ocorrência de doenças (ZHANG, SONG e TAN, 2006; MADIGAN et al., 2016).

Estes benefícios são possíveis pois, os fungos apresentam a capacidade de produzir compostos com elevada diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade de ligação com receptores celulares (MOLINARI, 2009; GUIMARÃES, 2010). Esses compostos são denominados metabólitos secundários e incluem compostos das classes alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glicosídeos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, metabólitos alifáticos e lactonas (SUDHA, 2016). Vários desses compostos apresentam propriedades biológicas tais como anticâncer, inseticida e antimicrobiana (PICHERSKY e GANG, 2000; BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Quando se trata de moléculas com potencial antimicrobiano, o *Penicillium chrysogenum*, antes conhecido como *P. notatum*, é o mais conhecido. A literatura relata que desta espécie foi isolada a Penicilina G, metabólito secundário com a maior atividade antimicrobiana e única penicilina natural utilizada clinicamente (CALIXTO e CAVALHEIRO, 2012; HOUBRAKEN, FRISVAD, e SAMSON, 2011).

Tendo em vista o potencial para a produção de moléculas com potencial antimicrobiano de *Penicillium* spp., o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano de quatro linhagens cultivadas em diferentes meios, bem como caracterizar seus constituintes químicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) HRMS e RMN.

2 Revisão Bibliográfica

2. 1 *Amazônia brasileira e sua biodiversidade*

Como conceito geográfico, a bacia amazônica pode ser tratada como um território de dimensões continentais com aproximadamente 6,9 milhões km² distribuídos entre nove países sendo eles o Brasil com 58,4% do território total, Peru com 12,8%, Bolívia com 7,7%, Colômbia com 7,1%, Venezuela com 6,1%, Guiana com 3,1%, Suriname com 2,5%, Guiana Francesa com 1,4% e Equador com 1% (FONSECA, 2011; SILVA, 2013; COCA-CASTRO, *et al.*, 2013).

Nela está contida a floresta amazônica, uma região que apresenta um clima quente e úmido que se justifica pela existência do fenômeno da transpiração, eliminação de água para a atmosfera. A umidade da região pode chegar à 88% em épocas de chuva e mesmo em estações de seca os índices podem chegar à 77%. Com relação à pluviosidade, a região apresenta chuvas de 1500 mm a 3000 mm todos os anos (FEARNSTIDE, 2003; PEIXOTO, UNTERSTELL e FREIRE, 2010; ALVARES *et al.*, 2013).

A chamada Amazônia brasileira abrange os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins. Juntos esses estados compreendem a 60% do território nacional, conforme pode ser observado na Figura1, que é o equivalente a cinco milhões de quilômetros quadrados, 11mil km de fronteiras internacionais com 12 milhões de hectares de várzeas e 25 mil km de rios navegáveis (HIGUCHI, 2004; BENCHIMOL, 2010).



Figura 1: Extensão territorial da Amazônia brasileira.
Fonte: www.orthoptera.com.br

Dentre as principais atividades ambientais realizadas pela floresta amazônica se mostram as mais importantes a sua capacidade de capturar o carbono presente na atmosfera e armazená-lo nas estruturas das plantas,

realização da manutenção do equilíbrio ecológico através do ciclo da chuva e de outros ciclos biogeoquímicos (FEARNSIDE, 2003; DIAS, 2008; AMAZONAS. GOVERNO DO ESTADO, 2009). Qualquer quebra nessa dinâmica ambiental acarretaria na alteração do clima no Brasil e de todo o planeta.

Com relação à biodiversidade da região, a cada dez espécies de vegetais ou animais conhecidas no mundo, ao menos uma vive na floresta amazônica, constituindo assim uma grande biodiversidade. Tratando-se de fauna, não há consenso com relação a quantidade de espécies, porém, o valor médio que a região abriga é de 2,5 milhões de insetos, 311 mamíferos, 1.300 aves, 273 répteis, 232 anfíbios e 1800 peixes continentais e aproximadamente 128.840 espécies de invertebrados (LEWINSOHN e PRADO, 2005; DA SILVA, RYLANDS e DA FONSECA, 2005; SUBIRÁ, GALVÃO e DE CARVALHO, 2018).

Com relação à flora da Amazônia brasileira, a totalidade de espécies permanece indeterminada, contudo, a estimativa é se possa encontrar na região cerca de 40000 espécies de plantas sendo 2500 de grande porte e mais de 30000 plantas de médio e pequeno porte. Vale ressaltar aproximadamente 2000 de plantas da região são utilizadas como alimento, na medicina popular e na produção de óleos, graxas, ceras dentre outros produtos que beneficiam a população (WRIGHT, 2002; EMBRAPA, 2014).

Em meio a toda essa biodiversidade, a Amazônia brasileira apresenta um potencial inexplorado quando se trata de fungos e sua importância se dá pela possibilidade de se obter substância bioativas de importância ambiental, acadêmica e comercial (DE OLIVEIRA, et al., 2019). Segundo Capelari (1996) a diversidade de fungos era estimada em 2500 espécies. Atualmente a quantidade de espécies no Brasil é de 5720 sendo 1301 espécies somente na região Amazônica. Os números mostram que os estudos avançaram, porém, é importante ampliar o conhecimento sobre a diversidade de fungos na região (FLORA DO BRASIL, 2020).

3 Fungos

Atualmente são estimadas que 3,8 milhões de espécies pertençam ao Reino Fungi em escala global. Estes organismos são classificados como seres eucariontes, devido à presença da carioteca, heterotróficos, pois, obtêm seu

alimento a partir de uma fonte externa, apresentam a quitina como principal constituinte da sua parede celular (HAWKSWORTH e LÜCKING, 2017; AZEVEDO e BARATA, 2018).

A maioria dos fungos são microscópicos e vivem em ambientes terrestres e aquáticos. Os que habitam no solo desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica através da digestão enzimática, desta forma macromoléculas como os polissacarídeos e proteínas contidas no substrato em decomposição, são quebradas em compostos mais simples e servem de nutrientes que podem beneficiar outros organismos (Figura 2) (SOTÃO, de CAMPOS e COSTA, 2004; MADIGAN, et al., 2016).

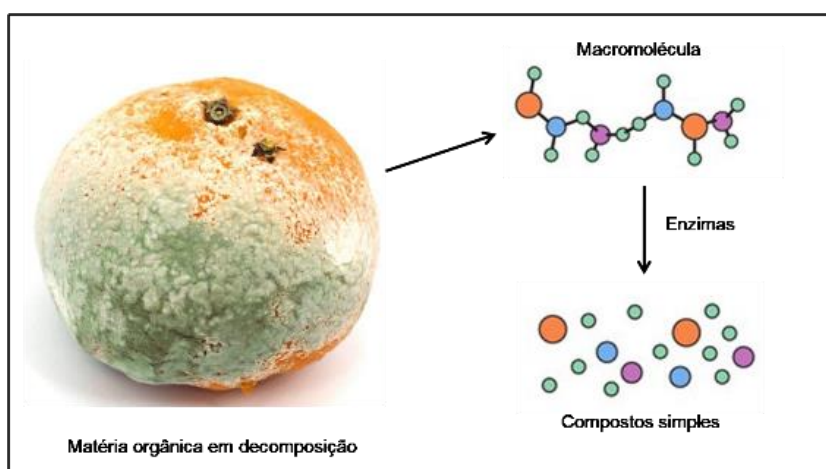


Figura 2: Decomposição da matéria orgânica realizada por fungo.
Fonte: Autor.

Das possíveis relações ecológicas que os membros deste grupo podem estabelecer, destacam-se o parasitismo, que afeta principalmente as plantas, mas podem afetar os animais de maneira geral, e as associações simbióticas que auxiliam diversas plantas na obtenção de minerais advindos do solo. É importante ressaltar que os fungos são amplamente utilizados pelos seres humanos em processos fermentativos e na obtenção de compostos bioativos (CAVALCANTE, CAMPOS e de LIMA, 2021).

A maioria dos fungos é pluricelular, desta maneira formam longos filamentos denominados hifas. De acordo com figura 3, as hifas se desenvolvem a partir de esporos sendo elas paredes celulares tubulares que envolvem a membrana plasmática. As hifas podem ser classificadas em septadas, quando apresentam septos verticais ao longo da sua estrutura e em hifas cenocíticas, caso não contenham septos (MADIGAN, et al., 2016).

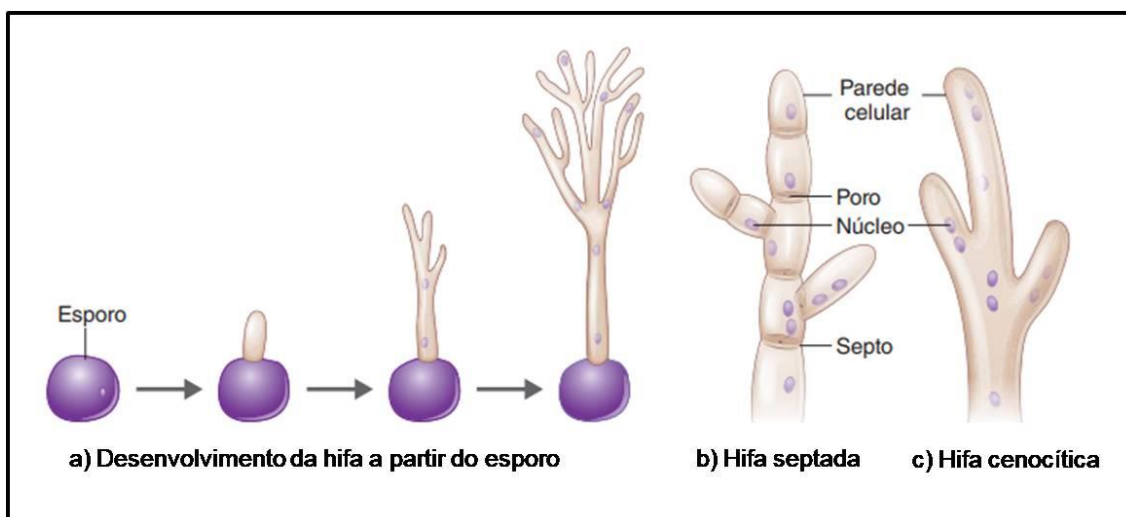


Figura 5: Desenvolvimento das hifas e suas características das hifas. (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017 modificado)

Fungos reproduzem-se de forma assexuada e sexuada. A reprodução assexuada ocorre pela disseminação e crescimento de filamentos de hifas e produção assexuada de conídios. Quando os esporos assexuados se desenvolvem dão origem a um indivíduo geneticamente igual ao parental. Na reprodução sexuada, ocorrem eventos como a plasmogamia e cariogamia de duas linhagens opostas de uma mesma espécie de fungo (MADIGAN, et al., 2016).

3.1 Fungos como fonte de metabólitos secundários

De acordo com as informações exploradas até o momento os fungos são fundamentais para o equilíbrio ambiental através da ciclagem de nutrientes. Contribuem com as plantas através de relações mutualísticas oferecendo vantagens como adaptação ao ambiente, indução à tolerância contra fatores de estresse, resistência ao ataque de insetos e doenças (ZHANG, SONG e TAN, 2006; MADIGAN, et al., 2016).

Todos esses benefícios são possíveis, pois, os fungos apresentam a capacidade de produzir compostos com elevada diversidade química, especificidade bioquímica, elevada afinidade de ligação com receptores celulares (MOLINARI, 2009; GUIMARÃES, 2010). Por esses motivos, dentre outros, esses compostos são de elevado interesse acadêmico e industrial. Estes compostos são denominados metabólitos secundários (PICHERSKY e GANG, 2000; BON, FERRARA e CORVO, 2008).

A diversidade de metabólitos secundários, produzidas pelos fungos, se dá pela capacidade que os fungos apresentam de adaptação ao meio em que estão

inseridos através da ativação de genes por estímulos externos como temperatura, tipo de substrato, qualidade e quantidade de nutrientes disponíveis (KURTBOKE, SWINGS e STORMS, 2010).

Os metabólitos secundários são compostos classificados como não essenciais, ou seja, não estão diretamente ligados ao desenvolvimento, crescimento e reprodução dos fungos e sua ausência não resulta na morte imediata do indivíduo, mas desempenham funções importantes como proteção, competição e interação com outras espécies (FREIRE, VASCONCELOS e COUTINHO, 2014; MENG, et al., 2015; SPITELLER, 2015).

Diferente das plantas, os fungos apresentam inúmeras vantagens quando se leva em consideração a obtenção de compostos bioativos. Usando este tipo de organismo elimina-se variáveis como a sazonalidade, divergências ambientais e políticas com o corte e coleta. Em alguns casos, até mesmo o rendimento de metabólitos de fungo é mais elevado que os das plantas (GONÇALVES, FREIRE e LIMA, 2013).

Das principais classes químicas de metabólitos secundários produzidos pelos fungos, podemos encontrar os (a) policetídeos, (b) alcaloides, (c) terpenos e (d) peptídeos não ribossomais, a estrutura de um representante dessas classes pode ser observada na figura 4 (TAN e ZOU, 2001; CANUTO et al., 2012).

Os policetídeos são obtidos por meio da condensação contínua de moléculas de ácidos graxos de cadeia curta. Alcaloides são derivados diretos dos aminoácidos e os terpenos são compostos formados por duas ou mais unidades isoprênicas. Os peptídeos não ribossomais são compostos sintetizados a partir de aminoácidos proteinogênicos ou não proteinogênicos. Vale ressaltar que a síntese destes compostos é mediada por reações enzimáticas (CANUTO, et al., 2012).

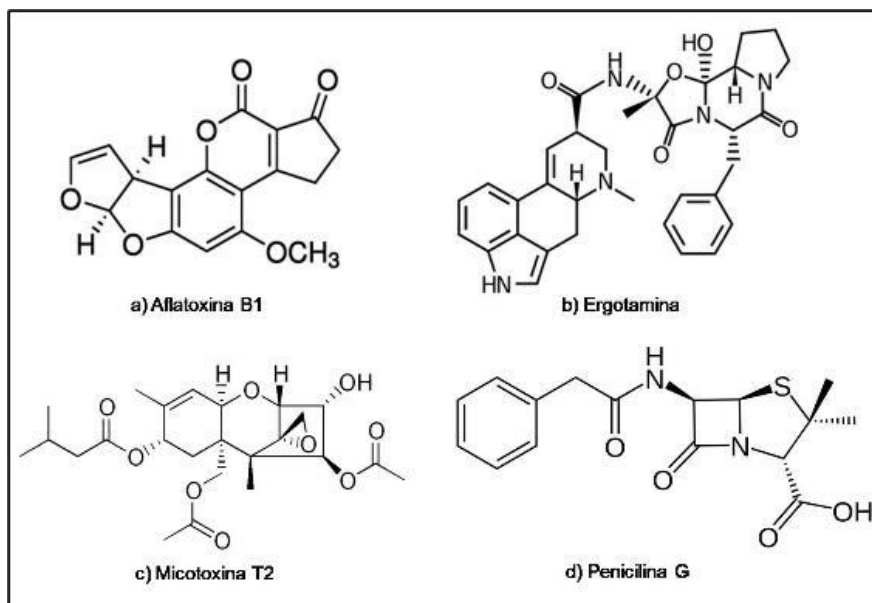


Figura 8: Representantes das principais classes químicas encontradas nos fungos. (a) policetídeos – Aflatoxina B1, (b) Alcaloide - Ergotamina, (c) Terpeno – Micotoxina T2 e (d) peptídeo não ribossomal – Penicilina G.

Os metabólitos secundários obtidos a partir dos fungos (figura 5) apresentam um amplo espectro de atividades biológicas das quais podem-se destacar a atividade (a) antiparasitária, (b) neuroprotetiva, (c) antioxidante, (d) antidiabética, (e) imunossupressora, (f) antiviral, (g) anticolinesterásica, (h) antineoplásicos, (i) citotóxica e (ji-jiii) antimicrobiana que são as mais exploradas (ONDEYKA, et al., 1997; ZHANG, et al., 1999; GOU, et al., 2000; STROBEL e DAISY, 2003; ALLY, DEBBAB e PROKSH, 2011; ALY, et al., 2010; WANG, et al., 2012).

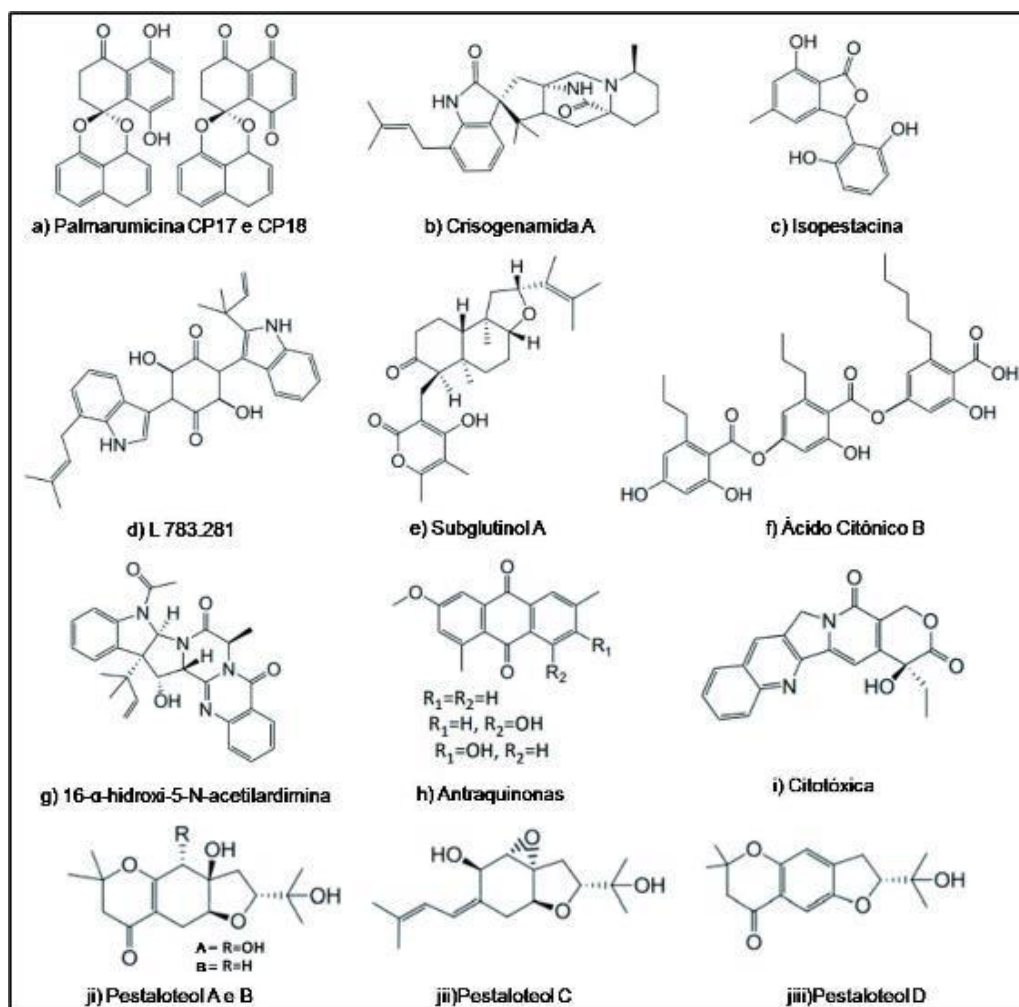


Figura 11: Alguns exemplos de metabólitos bioativos obtidos a partir de fungos (CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2013 modificado).

Com relação aos antimicrobianos, um dos relatos mais conhecidos na literatura é o da descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming no ano de 1928, durante seus estudos sobre as propriedades de cepas de *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva (TULP e BOHLIN, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2017).

O médico Alexander Fleming observou que crescimento da bactéria foi inibido em uma determinada área próxima ao fungo (Figura 6). Atualmente, essas reações de inibição entre colônias são comumente observadas em laboratório e são chamadas de antibiose. A atividade bactericida contra outros patógenos Gram-positivos causadores da febre escarlate, pneumonia, meningite e difteria também foram investigadas por Fleming (BROWN, 2004; TAKAHASHI e LUCAS, 2008).



Figura 14: Antibiose entre um fungo e uma bactéria em placa de petri.
Fonte: WordPress.com

O fungo produtor da penicilina foi identificado como *P. chrysogenum* no ano de 1929. E em 1940 a penicilina entra na sua fase de testes clínicos e pouco tempo depois se iniciou a sua produção em larga escala (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Desde então a busca por microrganismos, em especial os fungos, produtores de novos antibióticos evoluiu rapidamente (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017; OLIVEIRA, da SILVA e TALLARICO, 2010). Na tabela 1, estão descritos alguns fungos produtores de metabólitos secundários com ação antimicrobiana.

Tabela 1: Fungos como fonte de metabólitos secundários

Fungo	Metabólito	Ação	Referência
<i>Acremonium zeae</i>	Pyrrocidinas A e B	Antifúngico e Bactericida	(WICKLOW, 2005)
<i>Cephalosporium</i> spp	Cefalotina	Bactericida	(TORTORA, FUNKE e CASE, 2017)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ácido Colletótrico	Antifúngico e Bactericida	(ZOU et al, 2000)

<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Criptocina	Antifúngico	(STROBEL e DAISY, 2003)
<i>Epichloë typhina</i>	Chokols	Fungicida	(YOSHIHARA, 1985)
<i>Eupenicellium brefeldianum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> e <i>Paecilomyces</i> sp	Brefeldina A	Antifúngico e Bactericida	(HARRI, 1963; WANG, 2007)
<i>Eutypella scoparia</i>	Scoparasina B	Antifúngico	(PONGCHAROEN, 2006)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Viriditoxina	Bactericida	(SILVA, 2013)
<i>P. chrysogenum</i>	Penicilina	Bactericida	(TORTORA, FUNKE e CASE, 2017)
<i>P. griseofulvum</i>	Griseofulvina	Bactericida	(TORTORA, FUNKE e CASE, 2017)
<i>Periconia</i> sp.	Periconicinas A e B	Antifúngico e Bactericida	(KIM, 2004)
<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	Jesterona	Antifúngico	(ZHANG, SONG e TAN, 2006)
<i>P. microspora</i>	Isopestacina	Antifúngico e Bactericida	(HARPER, 2003)
<i>P. microspora</i>	Pestacina	Antifúngico	(ZHANG, SONG e TAN, 2006)
<i>Phomopsis cassiae</i>	3,12-Dihydroxycadalena	Antifúngico	(ZANARDI, 2012)
<i>Phomopsis</i> sp	Cycloepoxylactona, cycloepoxytriol B e Phomoenamida	Antifúngico e bactericida	(RUKACHAISIRIKUL, 2008; MOUSA e RAIZADA, 2013)
<i>Trichoderma erinaceum</i>	Trichodermaerina	Bactericida	(XIE, 2013)

<i>T. harzianum</i>	Trichodermina	Bactericida	(CHEN, 2014)
<i>Xylaria</i> sp	Fomenona	Bactericida	(SILVA, 2010)

Conforme apresentado na tabela acima, os fungos apresentam a capacidade de produzir compostos com alguma atividade antimicrobiana, porém, é importante ressaltar que muitas dessas substâncias são tóxicas aos seres humanos. Isso provoca uma desvalorização do ponto de vista comercial. Logo, a busca por novos antibióticos leva em consideração o aumento do número de bactérias resistentes e da necessidade do mercado por medicamentos com elevada eficácia, baixa toxicidade e menor impacto ambiental. Dos fungos produtores de metabólitos secundários com atividade biológica os mais explorados são os do gênero *Cephalosporium* e *Penicillium* (TENGURIA, KHAN e QUERESHI, 2011; FREIRE, VASCONCELOS e COUTINHO, 2014;).

3.2 Potencial químico e biológico do gênero *Penicillium*

Os fungos do gênero *Penicillium* são considerados cosmopolitas devido a sua ocorrência em diversos tipos de habitats como solo, água, ar e ambientes extremos com elevada variação de temperatura, salinidade e pH. Algumas espécies especializaram-se em colonizar alimentos, especialmente os grãos e os seus derivados (SMITH, 1951; VISAGIE, et al., 2014; MADIGAN, et al., 2016; SAXENA, et al., 2016).

O termo *Penicillium* foi cunhado pelo cientista Johann Heinrich Friedrich Link no ano de 1809 e significa (a) “pincel” ou “semelhante à escova” devido a sua micromorfologia. Inicialmente Link descreveu três espécies sendo elas o (b) *Penicillium candidum*, (c) *P. glaucum* e o (d) *P. expansum* apresentados na figura 7 (LINK, 1809; SAMSON e PITT, 1985).

O grupo apresenta a formação de hifas ramificadas com septos geralmente incolores. Em laboratório produz micélio compacto com bordas definidas, dependendo da espécie. As colônias apresentam um aspecto algodinoso sendo inicialmente brancos com evolução para o amarelo, verde ou rosa dependendo do meio e da espécie (PITT, et al, 1997).

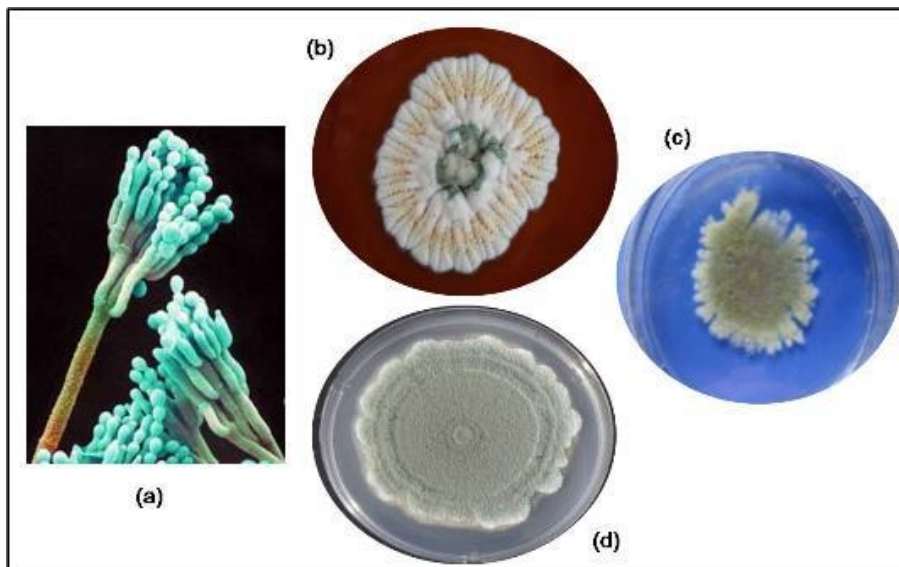


Figura 15: Espécies do gênero *Penicillium* descritas por Link (ERRAMPALLI, 2014; PARVEEN, et al., 2017 modificado).
(a) – Micromorfologia de *Penicillium* sp. (b) – *P. candidum*, (c) - *P. glaucum* e (d) - *P. expansum*.

Algumas espécies são utilizadas pela indústria de alimentos na produção de alimentos embutidos e queijos como o Camembert ou Roquefort. Outras espécies são versáteis quanto à fixação de nutrientes como o fósforo e amônia em plantas. Estes compostos promovem a síntese de fito-hormônios como o ácido indolacético e ácido giberélico (figura 8). Os fungos do gênero *Penicillium* podem ser utilizados como biorremediadores, produtores de biossurfactantes, e enzimas extracelulares. No entanto, estes fungos são amplamente explorados devido ao seu potencial de produção de moléculas com atividade antimicrobiana (THOM, 1906; NELSON, 1970; KARAHADIAN, JOSEPHSON e LINDSAY, 1985; GIRAUD, GIRAUD e AGUILETA, 2010; LUDEMANN, GRECO e RODRÍGUEZ, 2010; WHITELAW, HARDEN e BENDER, 1997; LEITÃO e EGUITA, 2016; KHAN, et al., 2008; CHÁVEZ, BULL e EYZAGUIRRE, 2006; GUSAKOV e SINITSYN, 2012)

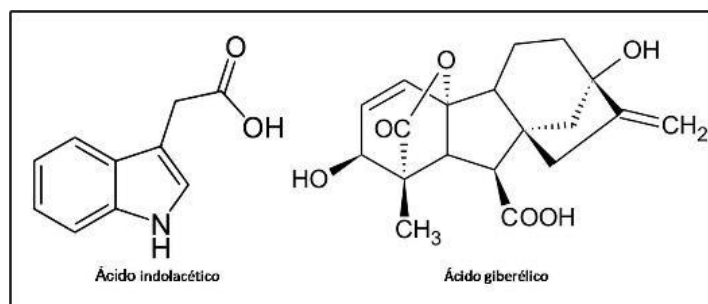


Figura 18: Fito-hormônios de plantas.

3.2.1 Substâncias bioativas de obtidas de *P. chrysogenum*

Quando se trata de moléculas com potencial antimicrobiano, o *P. chrysogenum*, antes conhecido como *P. notatum*, é o mais conhecido. A literatura relata que dele foi isolada a Penicilina G, sendo ela a com a maior atividade antimicrobiana e a única penicilina natural utilizada clinicamente. A estrutura química das penicilinas está baseada em um anel (A) tiazolúrico ligado a um anel ou núcleo (B) β -lactâmico ao qual está ligado uma cadeia lateral (R) (Figura 9). O núcleo da estrutura é responsável pela atividade biológica. Logo, qualquer alteração na estrutura do núcleo acarreta na perda da atividade antimicrobiana (CALIXTO e CAVALHEIRO, 2012; HOUBRAKEN, FRISVAD e SAMSON, 2011).

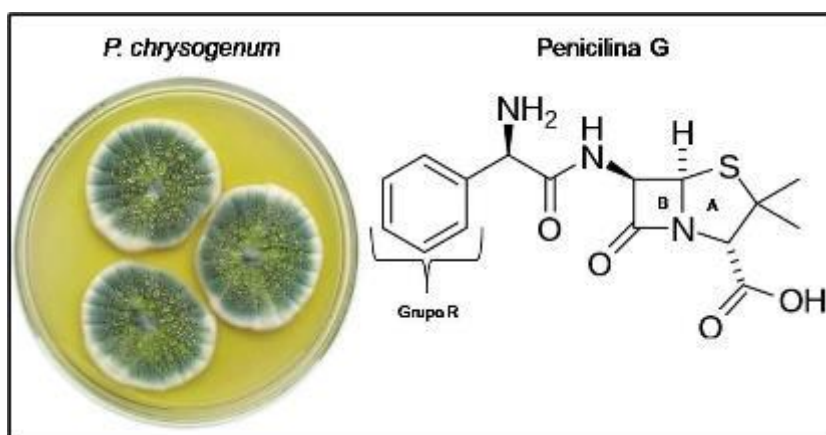


Figura 19: *P. chrysogenum* produtor de Penicilina G.
Fonte: Autor.

Tendo em vista que o núcleo β -lactâmico não pode ser alterado, a solução está em alterar a cadeia lateral, desta maneira pode-se obter derivados sintéticos (Figura 10) com diferentes características antibacterianas e farmacológicas (GOODMAN e GILMAN, 2010; CALIXTO e CAVALHEIRO, 2012).

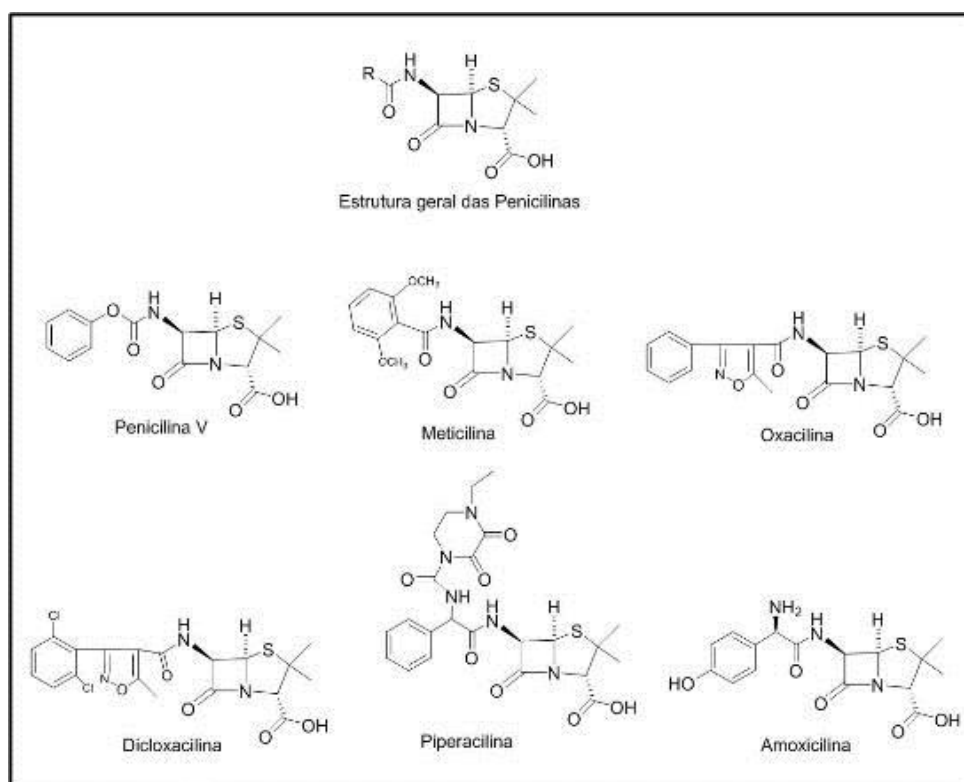


Figura 20: Derivados da Penicilina G.
Fonte: Autor.

Do *Penicillium chrysogenum*, Gao e colaboradores (2011) isolaram dois metabólitos secundários, o (a) penicídio A e um (b) monoterpreno de *Penicillium* sp com atividade inibidora contra o fungo *Alternaria brassicae*. Buscando a atividade antimicrobiana do *P. chrysogenum*, Devi et al. realizaram estudos nos anos de 2009 e 2012 isolando os compostos (c) (3,1'-didehydro-3[2''(3''',3'''-dimethyl-prop-2-enyl)-3''-indolylmethylene]-6-methyl piperazine-2,5-dione) e (d) Citrinina. Em estudos recentes na busca por compostos bioativos oriundos de *P. chrysogenum*, Trinh et al. (2017) isolaram o (d) citreohibridonol, composto com atividade antimicrobiana contra o *Bacillus cereus* e *S. faecalis*.

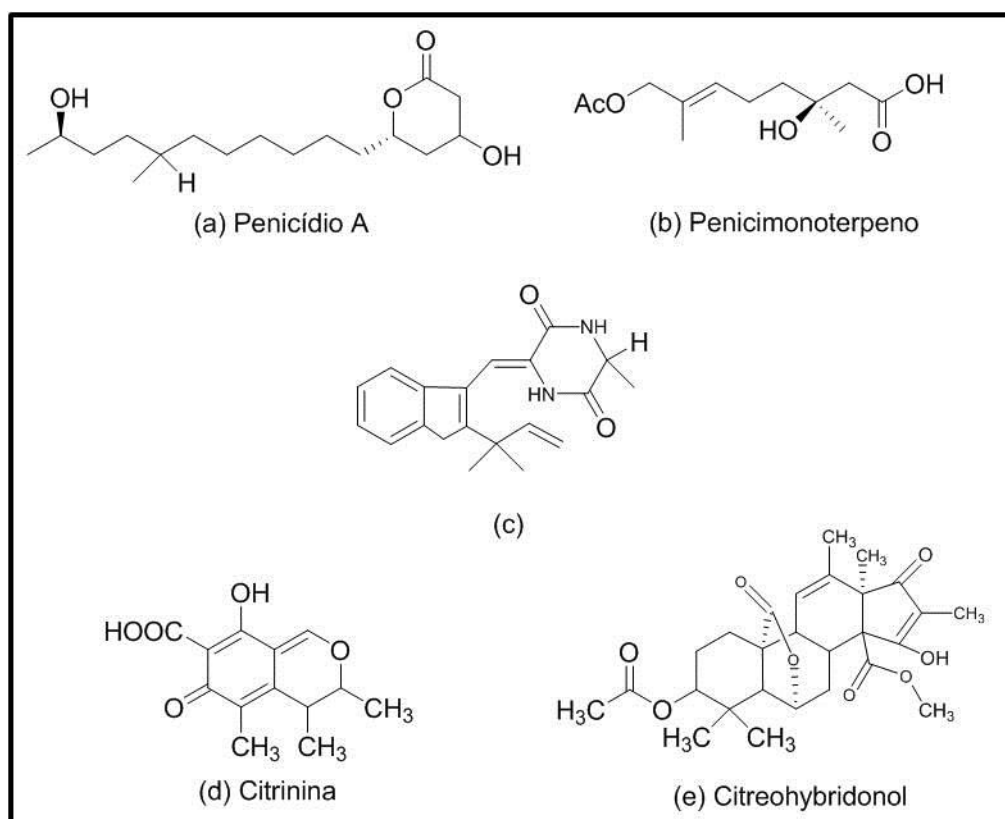


Figura 23: Metabólitos secundários de *P. chrysogenum* (DEVI, et al., 2009; GAO, et al., 2011; DEVI, RODRIGUES e NAIK, 2012; TRINH, et al., 2017 modificado).

3.2.2 Substâncias bioativas de *P. purpurogenum*

O *P. purpurogenum* é um fungo filamentoso que, em determinadas condições de cultivo e tempo, pode produzir um pigmento vermelho conforme figura 12. Em geral, seu dorso apresenta cor verde devido à esporulação intensa e pode ser obtido do solo ou a partir de um tecido vegetal (MUSALEM, STEINER e CONTRERAS, 1984).

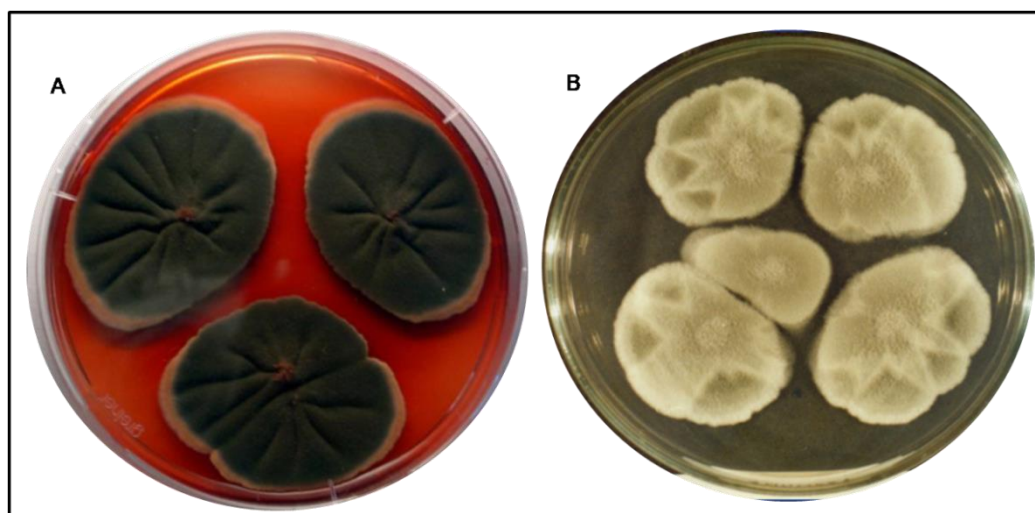


Figura 24: Culturas de *P. purpurogenum* em diferentes condições. Em A – Meio de cultura YES com crescimento por 7 dias e em B – Meio de cultura BDA com crescimento por 6 dias (MAPARI, et al., 2009) modificado.

Com base na literatura, um dos primeiros estudos envolvendo a espécie foi realizado por Musalem no ano de 1984, sobre a produção de enzimas hemicelulolíticas. Desde então, diversas enzimas produzidas pelo *P. purpureogenum* foram isoladas e caracterizadas sendo as principais as β -glicosidasases, endoxilases, acetil xilano esterase (AXE) e α -L-arabinofuranosidase. Estas moléculas são amplamente utilizadas pelo setor agrícola principalmente para obtenção de alimentos com maior valor nutricional (MUSALEM, STEINER e CONTRERAS, 1984; FRITZ, et al., 2008; HIDALGO, STEINER e EYZAGUIRRE, 1992; CHAVEZ, et al., 2002; EGANA, et al., 1996).

A possibilidade de produção de pigmentos a partir do cultivo de *P. purpureogenum*, chama atenção devido a possibilidade de uso como colorantes naturais de alimentos. Na busca por estes compostos, Mapari e colaboradores (2006) isolaram e identificaram a (a) 7-(2- hidroxietil)-monascorubramina de coloração vermelho-púrpura, Frisvad (1989) descreveu (b) purpurogenona de coloração amarelo-alaranjado e Büchi e colaboradores (1965) isolaram a (c) mitorubrina, de cor amarela, e o (d) mitorubrinol, de coloração laranja-avermelhada.

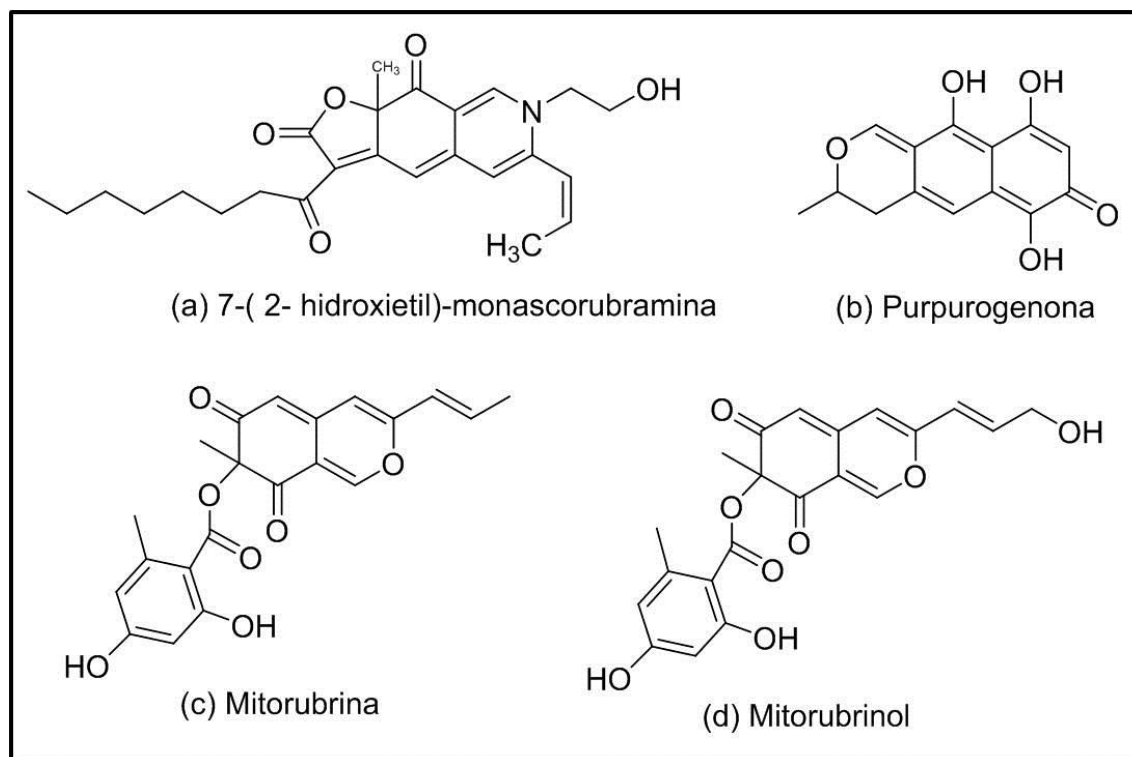


Figura 25: Pigmentos de *P. purpureogenum* (BUCHI, WHITE e WOGAN, 1965; FRISVAD, 1989; MAPARI, MEYER e THRANE, 2006).

Dos bioativos com potencial farmacológico, o *P. purpureogenum* apresenta a possibilidade de produzir compostos com atividade (a) antitumoral, (b) anti-inflamatória e (c – d) antiviral para H1N1 (WANG, et al., 2011; XUE, et al., 2014).

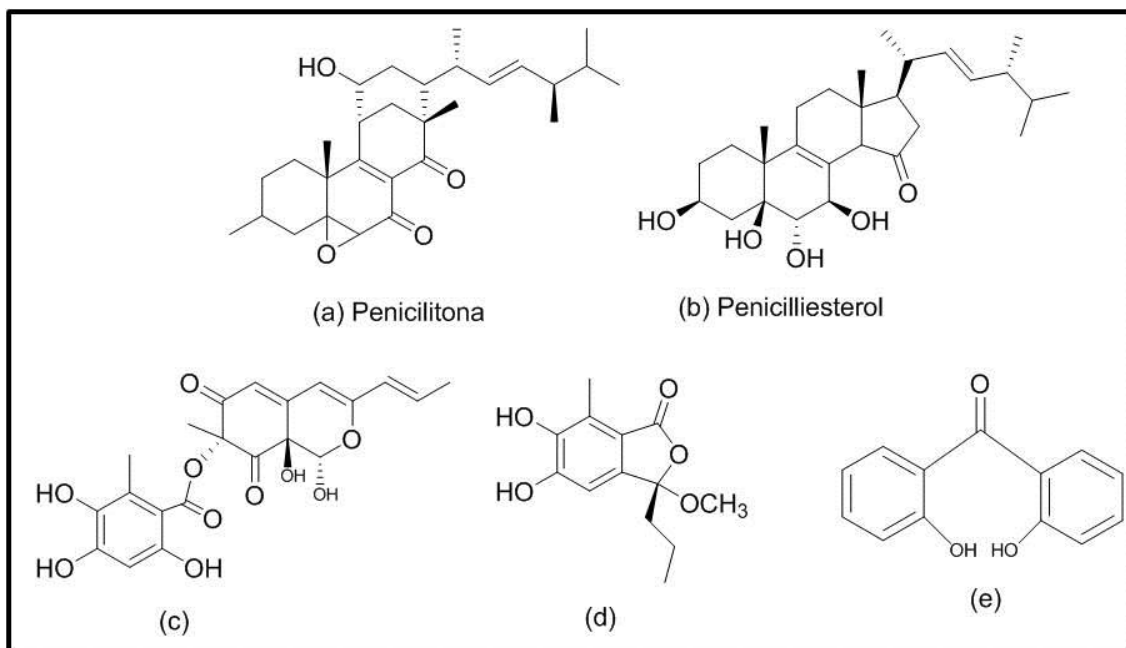


Figura 26: Compostos isolados de *P. purpureogenum*.

Com relação aos compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *P. purpureogenum*, a literatura reporta o (a) limoneno, substância que apresenta atividade antibacteriana, e o (b) timol com elevada atividade antifúngica (GHANBARI, MOHAMMADKHANI e BABAEIZAD, 2014; KHETHR, et al., 2008; FRISVAD, et al., 2004; SOKOVIC, et al., 2009).

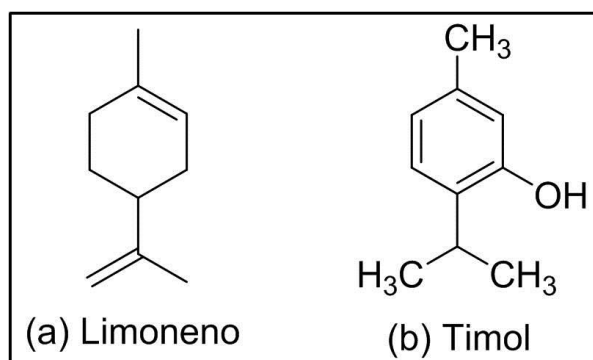


Figura 29: Terpenos isolados de *P. purpureogenum*.

Em estudos conduzidos por Yenn e colaboradores (2017) revelaram que a espécie é capaz de produzir o (a) stigmasterol. Este composto apresentou atividade antimicrobiana para várias bactérias e leveduras de relevância clínica, porém, o que chamou atenção dos pesquisadores foi a eficácia do stigmasterol

em degenerar a parede celular do patógeno *Staphylococcus aureus* o que resulta na liberação do conteúdo celular causando a morte do organismo.

Na busca por compostos com atividade antibacteriana, especialmente contra o *S. aureus* e o *S. aureus* resistente a metilina, Xue e colaboradores (2020) isolaram e identificaram ao menos quatro novas substâncias da classe das (b-e) xantonas. Todos os compostos descritos estão apresentados na figura 16.

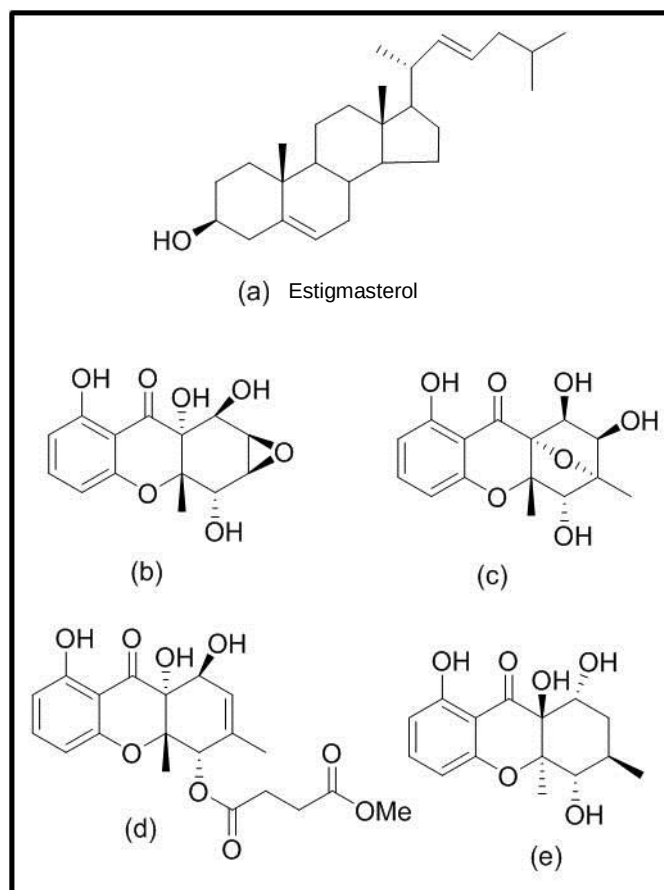


Figura 32: Compostos isolados de *P. purpurogenum* com atividade bactericida (YENN, et al., 2017; XUE, et al., 2020)

O *P. purpurogenum* é promissor na produção de novos compostos antimicrobianos através da indução ou ativação de genes silenciados. Esta técnica é chamada de OSMAC (One-strain-many-compounds) e pode ser executada através da mudança de fatores ambientais e forma de cultivo. Conforme relatado por Li e colaboradores (2016) foram isolados três novos alcaloides (Figura 17) através da indução de rotas biossintéticas silenciadas por dietil sulfato (DBOE, et al., 2002; WILLIAMS, et al., 2008).

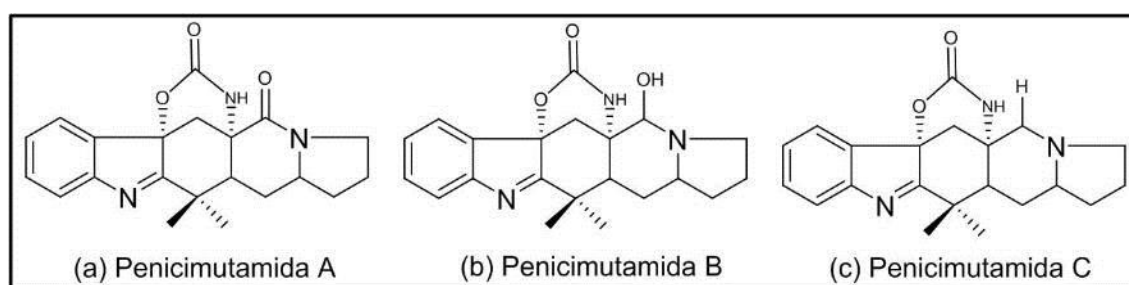


Figura 35: Estrutura das Penicimutamidas (LI, et al., 2016) modificado.

3.2.3 Substâncias bioativas de *Penicillium oxalicum*

O *P. oxalicum* é um fungo ascomiceto anamórfico encontrado no solo e em associação com as raízes do milho. Por esse motivo, o *P. oxalicum* apresenta elevada importância para o setor agrícola de produção de milho, devido sua atuação como fixador de nutrientes, promotor da síntese de fatores de crescimento da planta e indutor do aumento da capacidade defensiva da planta seja contra fitopatógenos ou predadores (MURALI e AMRUTHESH, 2014; TYLER, et al., 2008; VAN DER ENT, VAN WEES e PIETERSE, 2009; HOSSAIN, et al., 2014).

Dos diversos compostos bioativos obtidos a partir do *P. oxalicum*, o ácido secalônico D chama atenção por ser uma substância tóxica presente em alimentos, como por exemplo, o milho recém colhido. A toxicidade desta substância em ratos é de 50 mg/Kg porém, não apresentam toxicidade em embriões de galinha mas em humanos, este composto é teratogênico e abortivo (CIEGLER, HAYES e VESONDER, 1980; CARLTON, TIUTE e MISILEV, 1968; MISLIVEC e TUIE, 1970).

No entanto, estudos envolvendo o ácido secalônico D (Figura 18 a) ressaltam que este composto possui propriedades citotóxicas contra células causadoras de carcinoma epidermóide de boca (KB) e o fibrossarcoma. A substância apresenta ainda certa seletividade em células de tamanho que variam de 0,03 a 15 µm (GUO, et al., 2007; REN, et al., 2006).

Análogos como o ácido secalônico F (Figura 18 b) possuem atividade antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, bactéria fitopatogênica. Já o ácido secalônico A (Figura 18 c) apresenta atividade contra *Bacillus subtilis* e *Piriculaia oryzae* enquanto o ácido secalônico B (Figura 18 d) mostrou-se com um bom

antifúngico contra *Microbotryum violaceum* e um efetivo antimicrobiano contra *Bacillus megaterium* e a *Escherichia coli* (ZHANG, et al., 2008; MASTERS e BRASE, 2012).

Outros dados obtidos na literatura, reforçam o potencial da espécie para a produção de compostos com atividade antimicrobiana, a exemplo disto tem se o estudo realizado por Yang e colaboradores (2008) em que determinou-se a atividade antifúngica *in-vitro* do *P. oxalicum* contra dezessete cepas de fungos patogênicos, dentre eles o *Sclerotinia sclerotiorum* causador da doença mofo branco. Através do co-cultivo e do teste *in vitro* Shen, Li e Wang (2014) determinaram a atividade antifúngica do fungo *P. oxalicum*, bem como do extrato metanólico, contra o *Alternaria solani*, causador da doença pinta preta ou mancha de alternaria. A atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *P. oxalicum* foi o objetivo principal do trabalho de Santamarina (2002), nele concluiu-se que houve um elevado efeito antagonista contra as bactérias patogênicas *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*.

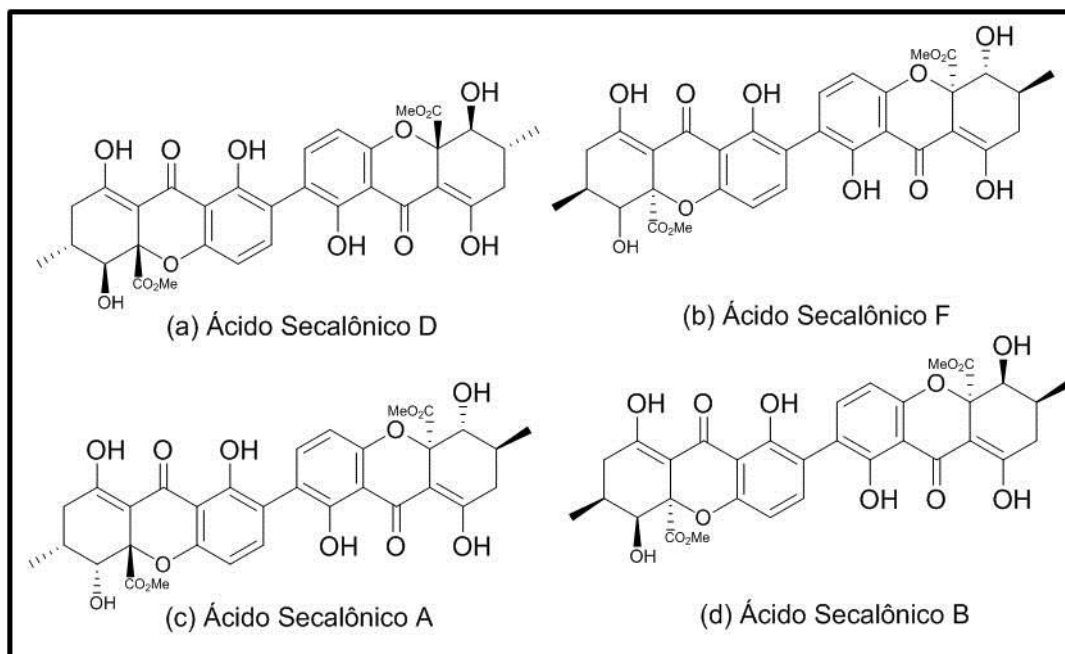


Figura 36: Derivados do ácido secalônico (HOOPER, et al., 1971; MASTERS e BRASE, 2012).

A literatura reporta que do *P. oxalicum* é possível obter alcaloides (WANG, et al., 2013; XU, ZOU e CHENG, 2014; ZHANG, et al., 2015), meroterpenos (DUAN, et al., 2016), diterpenos (BIAN, et al., 2015) antraquinonas (WANG, et

al., 2014), policetídeos (REN, et al., 2019), enamida fenólicas (LI, et al., 2015), cromonas (BAO, et al., 2014) (Figura 19) dentre outros.

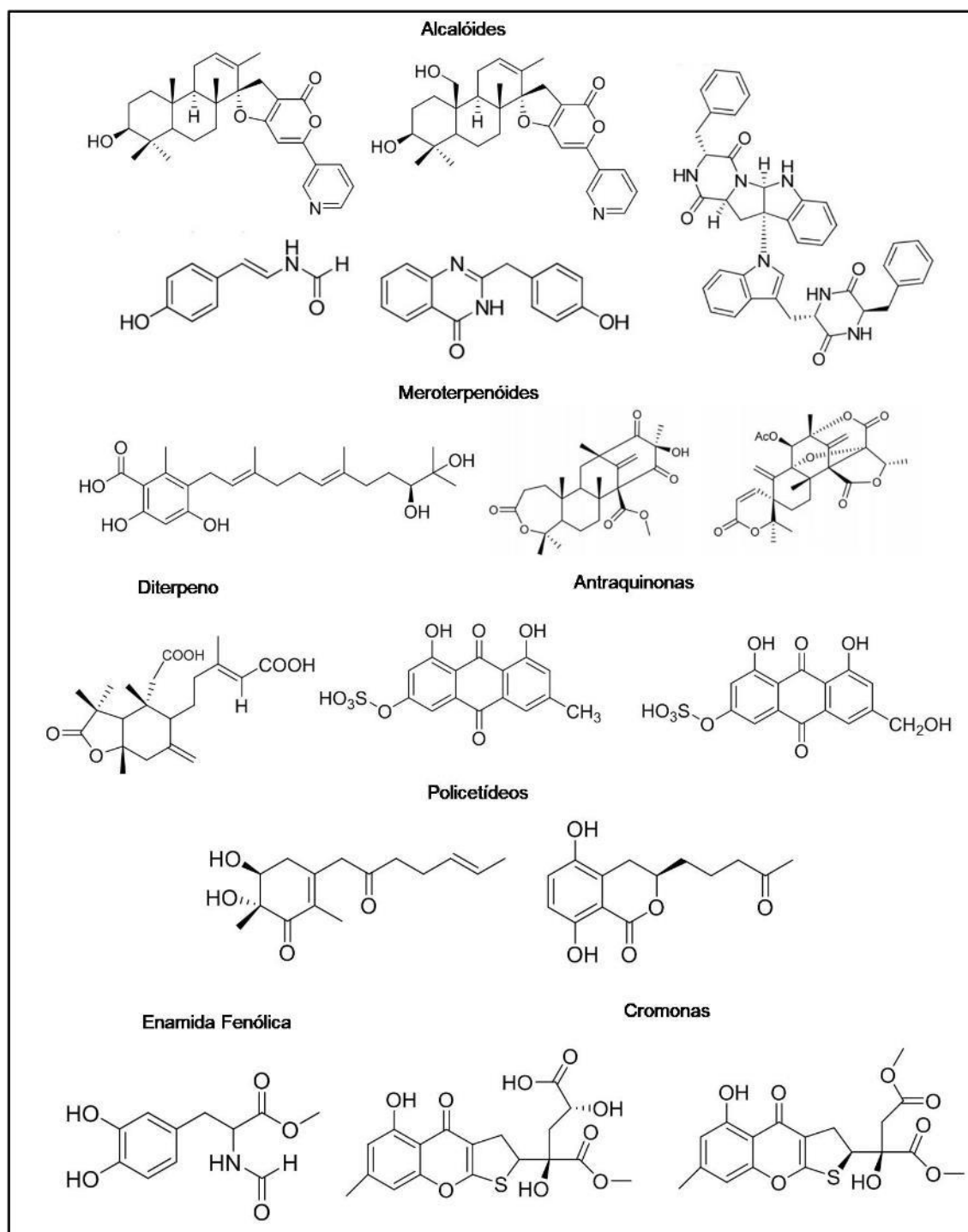


Figura 39: Compostos isolados de *P. oxalicum*.
Fonte Autor.

3.2.4 Substâncias Bioativas de *Penicillium citreonigrum*

O *P. citreonigrum* é um fungo amplamente distribuído em diversos ecossistemas. Relatos extraídos da literatura mostram que este organismo pode

ser encontrado em indústrias produtoras de queijo, amostras de solo de plantação de milho, feijão verde, uva passa e em cortiça. Este organismos é principal produtor da citreoviridina (Figura 20) um potente inibidor da atividade mitocondrial e uma perigosa micotoxina neurotóxica (AZIZ, MATTAR e MAHROUS, 2006; GRAVES e HESSELTINE, 1966; KURE, SKAAR e BRENDENHAUG, 2004; NJOBEH, DUTTON, *et al.*, 2009; PITT e HOCKING, 2009; SERRA, PETERSON e VENANCIO, 2008).

A produção deste composto se dá pela contaminação do arroz, em especial o que é produzido no leste da Ásia. O consumo deste arroz contaminado causa insuficiência respiratória, insuficiência circulatória, paralisia, convulsões e morte. Devido aos inúmeros casos no Japão a doença ganhou notoriedade e foi denominada de Shoshin-Kakke (beribéri cardíaco) no ano de 1891. A literatura reporta que a mudança de hábitos alimentares e o uso de suplementos alimentares contendo tiamina, reduziram gradativamente a ocorrência de Shoshin-Kakke (SAKAKI, 1981; KUSHIRO, 2015; UENO, 1974; NISHIE, COLE e DORNER, 1988; HONGSUK, HUH e WILCOX, 1996; ROSA, 2010).

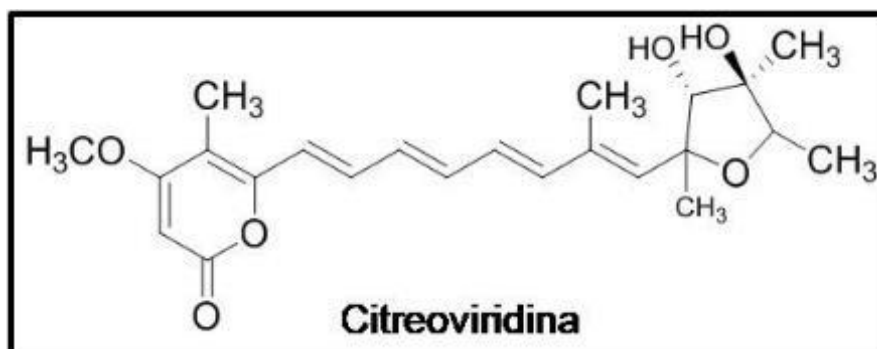


Figura 42: Metabólito de *P. citreonigrum*.

A partir de outros estudos envolvendo o *P. citreonigrum*, encontraram-se compostos com atividade antioxidante (Figura 21a-b), potencial de inibição da proliferação de células cancerígenas como a do hepatocarcinoma humano - HepG2 (Figura 21c-d) e câncer de colorretal humano - HCT116 (Figura 21e), substâncias inibidoras da enzima α -glicosidase (Figura 21f) que auxiliam no controle da glicemia pois, retarda a quebra de polissacarídeos complexos como o amido da mesma maneira como o fármaco arcabose (YUAN, ZHANG, *et al.*, 2017; HUANG, ZOU, *et al.*, 2018; YUAN, WEI, *et al.*, 2014).

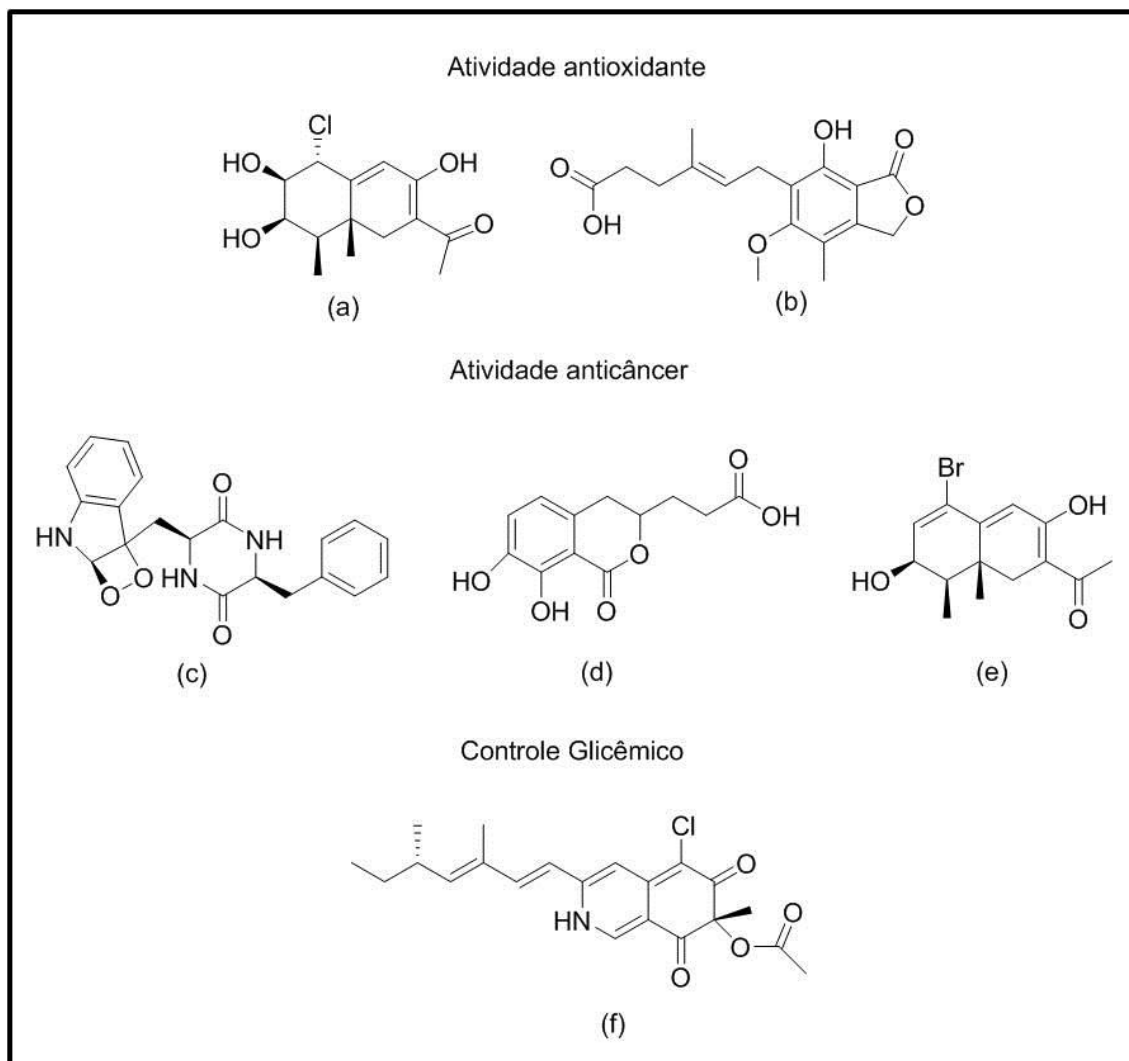


Figura 45: Variedade de compostos obtidos de *P. citreonigrum*.
Fonte Autor

3.2.5 Substâncias Bioativas de *Penicillium citrinum*

O *P. citrinum* é um fungo filamentoso amplamente distribuído em diversos ambientes. De acordo com literatura, esta espécie é constantemente encontrada em substratos como o solo, cereais, especiarias, frutas e ambientes internos (PITT, 1979; HOUBRAKEN, FRISVAD e SAMSON, 2010).

Esta espécie chama atenção pela produção da citrinina, uma micotoxina com efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e citotóxicos. Além deste composto, este organismo pode produzir o ácido tanzawaico A, quinolactacinas, quinocitrininas, ácido esteárico, mevastatina e a compactina. Atualmente busca-se entender os benefícios de outros metabólitos secundários produzidos por esse fungo (KOZLOVSKY, et al., 2003; SAMSON e FRISVAD, 2004; HETHERINGTON e RAISTRICK, 1931; JESUS, 2012; MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN e FRISVAD, 2000). Todos os compostos citados estão representados na figura 22.

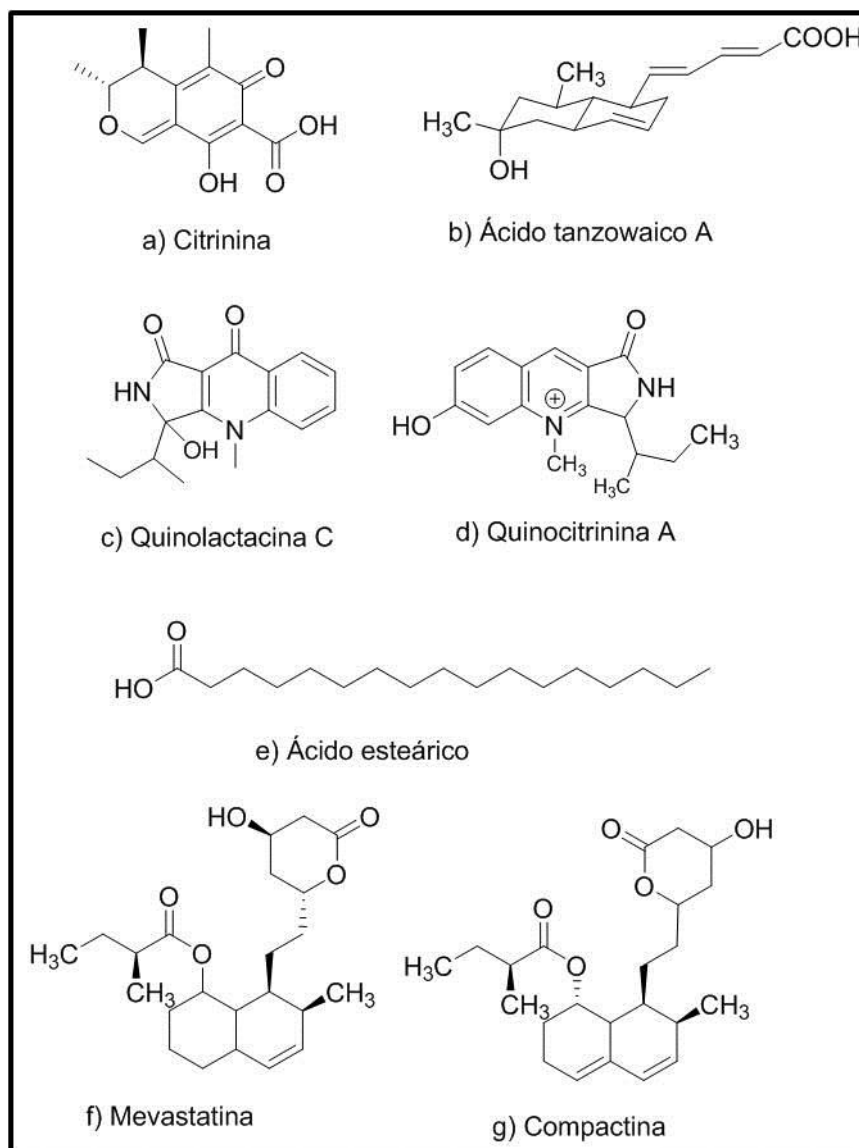


Figura 48: Metabólitos secundários obtidos do *P. citrinum*.

Em estudo realizado por Lu e colaboradores (2008), mostra que o *P. citrinum* é capaz de produzir moléculas com capacidade antioxidante (figura 23a). Apresenta a capacidade de produção de compostos com potencial de inibição da proliferação de células cancerígenas (Figura 23b1–b5), como as de leucemia – HL 60 (CHEN, et al., 2011), linfoma murino – L5178Y (LAI, et al., 2013; EL-NEKETI, et al., 2013), carcinoma de Ehrlich (YURCHENKO, et al., 2013), câncer de pulmão humano - NCI-H137 (TRISUWAN, et al., 2014).

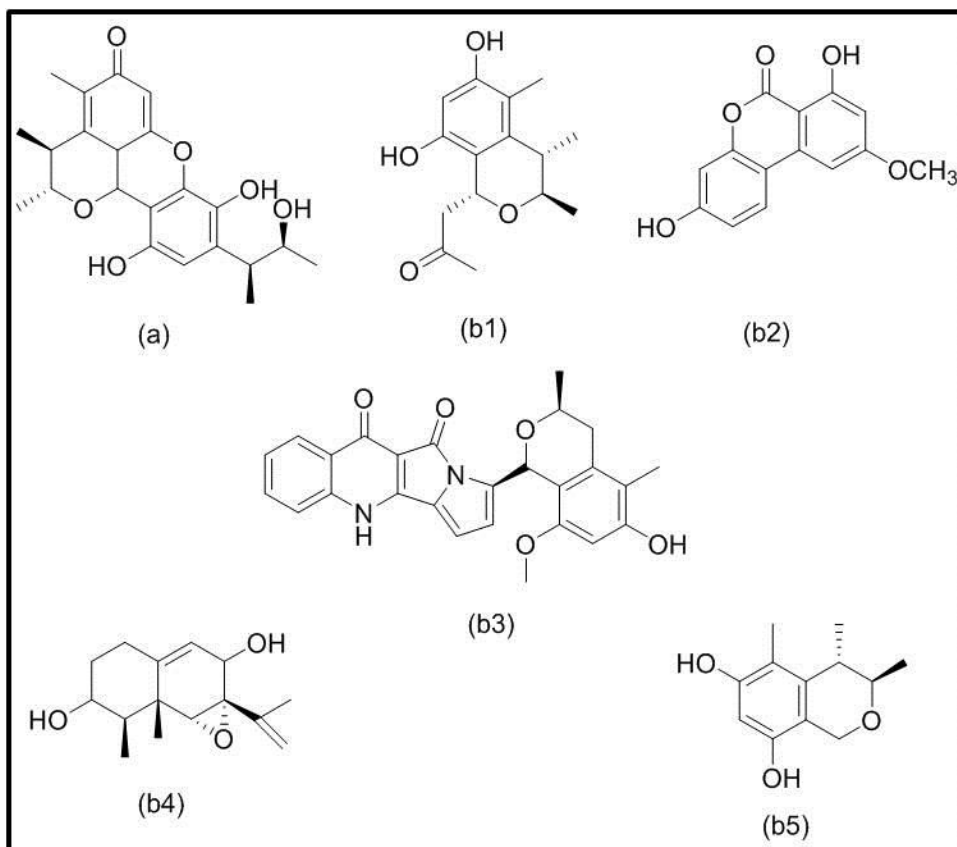


Figura 49: Bioativos de *P. citrinum* de importância biotecnológica.

Com relação à atividade antimicrobiana, o *P. citrinum* mostra-se um bom produtor da 1-(2,6-dihidroxifenil) propan-1-ona, figura 24a, com atividade contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus* e *Micrococcus tetragenus* segundo trabalho realizado por Zheng e colaboradores (2016). A substância isolada apresentou uma atividade de concentração mínima inibitória – CMI no valor de 6,94 μM .

Trabalhos como o de Zheng et al (2016) são importantes pois, a literatura relata que infecções causadas por *Bacillus subtilis* e *B. cereus*, geralmente estão associadas aos alimentos e causam problemas no trato gástrico e intestinal com os principais sintomas sendo náuseas, vômitos e diarreias graves. Já infecções causadas por *Micrococcus tetragenus*, chamam atenção, pois, causam infecções pulmonares e septicemia (REIMANN, 1935; KOTIRANTA, LOUNATMAA e HAAPASALO, 2000).

Ao realizar testes *in vitro* de avaliação antimicrobiana de vinte metabólitos obtidos a partir do cultivo e extração do *P. citrinum*, Lai e colaboradores (2013) relatam que ao menos três compostos (Figura 24b1-b3) apresentaram CIM de 64 $\mu\text{g/ml}$ contra o *Staphylococcus aureus*, bactéria causadora de infecções de

pele, alimentar, ósseas, articulares e em implantes médicos devido a formação de biofilme.

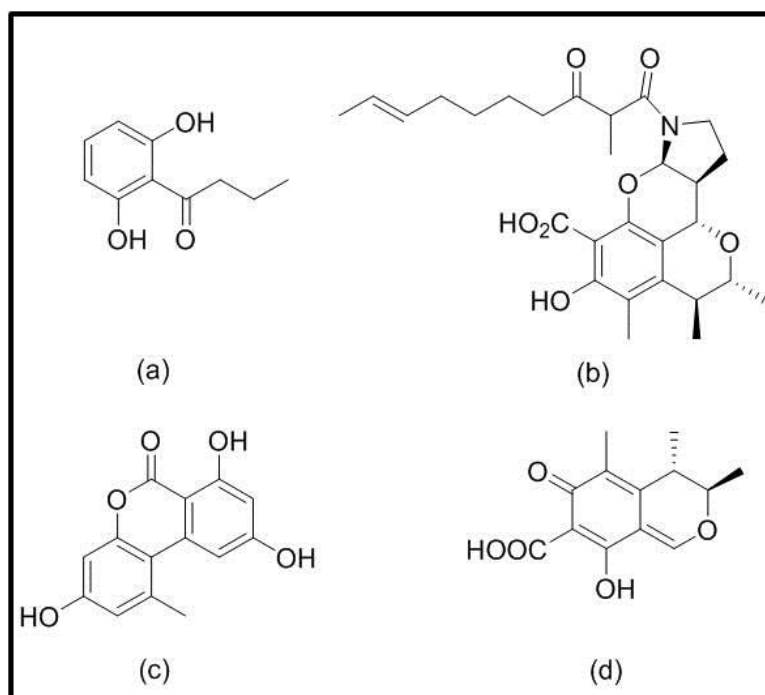


Figura 52: Metabólitos de *P. citrinum* com atividade bactericida

4 Técnicas analíticas empregadas na identificação de metabólitos secundários

4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Cromatografia é um método analítico utilizado de forma eficaz na separação e diferenciação dos componentes químicos de amostras complexas tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio dentre outras (SKOOG, WEST, *et al.*, 2010).

Os métodos cromatográficos podem ser do tipo planar ou em coluna. As metodologias executadas em coluna são classificadas em três categorias diferenciadas pelo tipo e fase móvel que pode ser fluido supercrítico, gasosa ou líquida (SEWELL e CLARKE, 1998; FRIED e SHERMA, 1999).

A técnica de cromatografia líquida foi empregada pela primeira vez em 1900 por Mikhail S. Tswett, um cientista italiano que concentrava seus estudos na separação de pigmentos vegetais, como clorofila, carotenos e xantofilas, em uma coluna utilizando solventes como eluentes. Desde então a técnica de cromatografia líquida passou por muitos avanços motivados pela criação de

novas partículas de fase estacionária. Dessa maneira, têm-se colunas mais estáveis, seletivas e eficientes (COLLINS, 2009; MALDANER e JARDIM, 2009).

Com a evolução dos instrumentos, a cromatografia líquida moderna, que inclui a Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE), é extremamente mais eficiente do que a cromatografia clássica, uma vez que são utilizadas partículas menores na fase estacionária, cuja separação com auxílio de alta pressão, leva a separações com altas resoluções. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica amplamente utilizada pelos diversos setores da indústria e academia, devido sua versatilidade para separar e quantificar amostras (LANÇAS, 2009; GERBER, KRUMMEN, *et al.*, 2004).

Na figura 25 é possível observar o esquema geral da CLAE. Um instrumento de CLAE é equipado com um ou mais reservatórios de vidro onde ficam acondicionadas as fases móveis que se deseja utilizar. Esta fase móvel é sugada por uma bomba de alta pressão, que leva até o sistema de injeção de amostra. No injetor, a amostra é misturada com a fase móvel e em seguida, essa mistura é introduzida na coluna, onde ocorre a separação da amostra. Os tipos mais comuns de recheio de coluna são a sílica fase normal, baseada na capacidade de realizar interações polares com o analito, e a fase reversa que realiza interações de natureza apolar. (DONG, 2006; MCMASTER, 2007).

Após a separação na coluna, o analito é direcionado para um detector que acusa sua presença. Os detectores mais usados são aqueles baseados na absorção da radiação ultravioleta e visível (UV-VIS) nos quais são monitorados dois comprimentos de onda, usualmente o 220 nm e 254 nm. Os detectores baseados no arranjo de diodos (PDA) são mais eficientes que os de UV-VIS, pois, facilitam a detecção de impurezas e a obtenção de dados de múltiplos comprimentos de onda ao mesmo tempo, porém este detector é mais sensível a ruídos dificultando experimentos que visam a quantificação de determinada substância. O sinal gerado pelo detector é registrado por um programa de computador e um cromatograma com o perfil cromatográfico da amostra é gerado (MEYER, 2004; SNYDER e KIRKLAND, 2009).

A obtenção deste perfil é considerada como uma das melhores estratégias de análise de metabólitos secundários e seus derivados. No entanto, o metaboloma de um organismo como um fungo, é altamente complexo devido à diversidade de estruturas químicas geradas pelo metabolismo, logo, se faz

necessário utilizar abordagens complementares para que se possa diferenciar e obter o maior número de compostos. Mesmo com o grande avanço de novas técnicas em cromatografia líquida, a identificação e a resolução dos picos cromatográficos ainda é uma tarefa difícil (KLITGAARD, IVERSEN, *et al.*, 2014; WEHRENS, CARVALHO, *et al.*, 2013).

No entanto essa situação mudou com o aperfeiçoamento e melhoramento de ferramentas que permitiram o melhoramento do acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas (CL/MS) (NIESSEN, 2006).

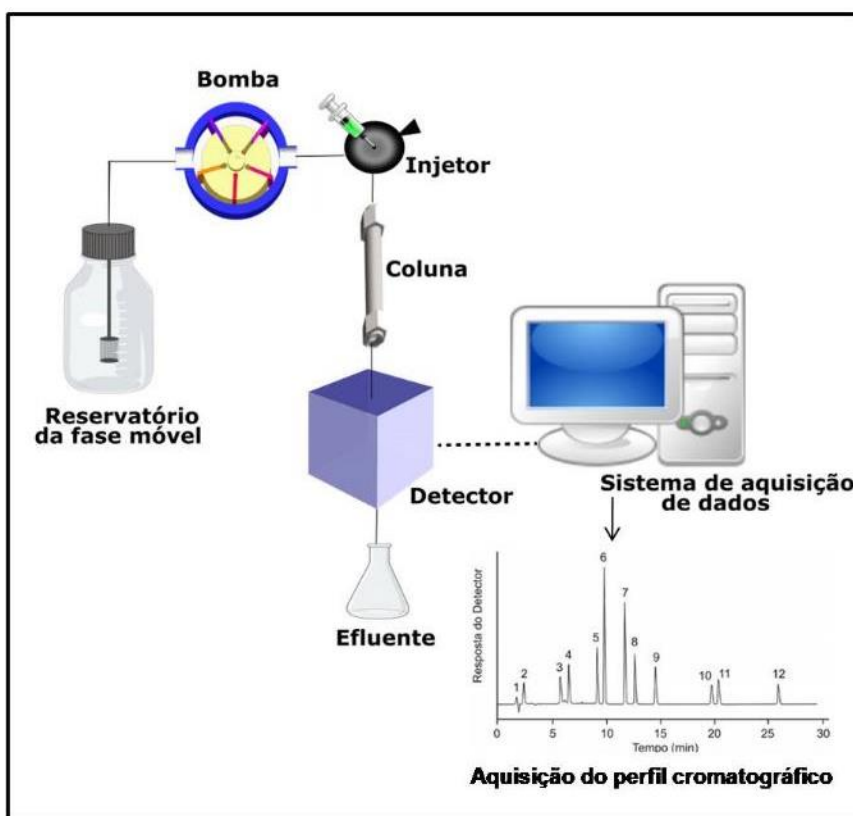


Figura 55: Diagrama ilustrativo de um HPLC Kenneth, R. (2018) modificado.

4.2 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas é o sistema de análise mais utilizado, pois, ao passo que a separação dos compostos químicos presentes em uma amostra ocorre na coluna de um cromatógrafo, o espectrômetro de massas fornece, com alta especificidade molecular e sensibilidade, a identidade do composto em termos de razão massa carga (m/z) (THOMAS, 2001; CHAIMBAULT, 2014; DASS, 2007).

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica analítica que mede a razão massa / carga (m / z) de partículas carregadas (íons). Um espectrômetro

apresenta os seguintes componentes, uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons (ambos mantidos sob vácuo) e um sistema de dados conforme pode ser observado na figura 26. Este tipo de técnica melhora a sensibilidade das metodologias utilizadas podendo ser utilizada na busca e identificação de compostos de interesse industrial como o farmacêutico, agroquímico, monitoramento ambiental e em pesquisas acadêmicas (LANÇAS, 2009; SKOOG, WEST, *et al.*, 2010; ROBERTS, 2013; SILVERSTEIN, WEBSTER, *et al.*, 2019).

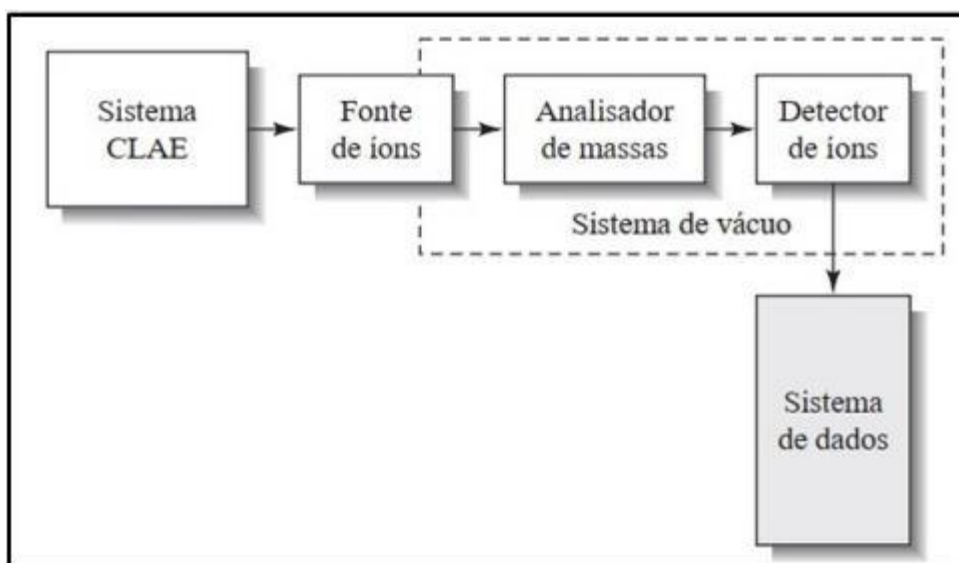


Figura 58: Diagrama de um sistema CL-MS (SKOOG, WEST, *et al.*, 2010) modificado.

De maneira geral, em uma análise por CLAE/EM, a os íons contidos em uma amostra na fase líquida são ionizados para fase gasosa e em seguida são conduzidos para a o analisador de massas. No analisador são aplicados campos magnéticos para que assim os íons sejam classificados de acordo com sua abundância e massa (SILVERSTEIN, WEBSTER, *et al.*, 2019; DASS, 2007).

Mesmo sendo uma combinação ideal, existe um problema fundamental no acoplamento dessas duas técnicas que é a interface. Para a espectrometria de massas é necessário que a amostra esteja no estado gasoso para a análise, porém, a amostra que sai de uma coluna cromatográfica está no estado líquido devido a mistura do solvente com o analito. Logo, a maior parte do solvente deve ser removido e em seguida evaporado durante a ionização da amostra (PITT, 2017; ARPINO, 1992).

Para isso, diversos dispositivos de ionização foram testados. Inicialmente utilizou-se no acoplamento fontes que operam em pressão atmosférica como o electrospray (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) e

Atmospheric Pressure Photon Ionization (APPI). Dentre as fontes de ionização utilizadas, a ESI e a APCI são as mais utilizadas (NIESSEN, 2006; CAPPIELLO, FAMIGLINI, *et al.*, 2008; CAPPIELLO, FAMIGLINI, *et al.*, 2002).

A interface do tipo ESI, pode ser utilizada para análise de compostos de uma amostra levemente polar. A mistura contendo o solvente e o analito, oriundas da coluna de CLAE, são bombeados por um capilar metálico no qual aplica-se uma voltagem de 3kV a 5kV. Isso força a pulverização da amostra e a evaporação do solvente. Os íons gerados são transferidos para uma câmara de vácuo e em seguida para o analisador, este processo pode ser observado na figura 27. É um método muito suave de ionização, pois o analito retém pouca energia após a ionização. O sistema pode ser operado no modo positivo ou negativo. Alguns autores relatam que a principal desvantagem da técnica é a dificuldade de realizar a fragmentação de alguns compostos químicos, problema que é solucionado com o uso de técnicas espectrométricas de massa em tandem (sistemas de MS em série) (PITT, 2017; DOLE, MACK, *et al.*, 1968; IRIBARNE e THOMSON, 1976).

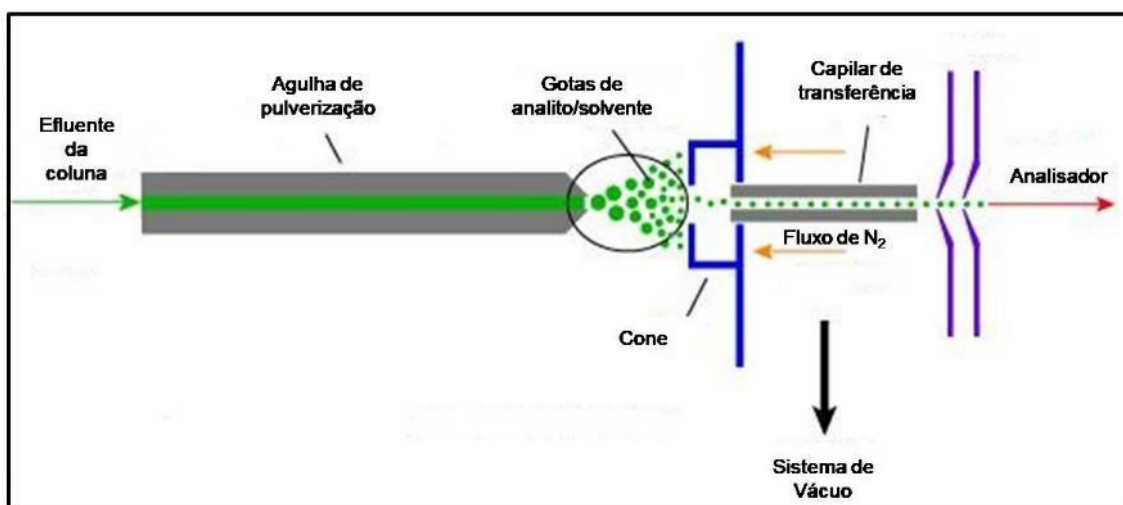


Figura 61: Esquema de uma interface ESI Gates, P (2020) modificado.

A metodologia envolvendo APCI é muito similar ao método de ionização química (CI) porém a principal diferença é que o processo ocorre à pressão atmosférica. Esta técnica tem sido utilizada quando o alvo são moléculas não polares e levemente voláteis como esteróides, lipídios e vitaminas lipossolúveis, pois, estes compostos não são ionizados de forma eficiente em ESI. A técnica é baseada em transferir as moléculas contidas no solvente para a fase gasosa (LANÇAS, 2009; HORNING, HORNING, *et al.*, 1973).

Para isso, o líquido advindo da coluna cromatográfica é introduzido em uma sonda para que o solvente seja evaporado e as moléculas do analito sejam liberadas para que em seguida sejam ionizadas, todo este processo é mediado por um fluxo contínuo de N_2 . Em seguida, as moléculas do analito, na presença de N_2 , são submetidas a uma descarga elétrica por um eletrodo (denominado efeito corona). O processo é eficiente devido a ocorrência de diversas colisões entre os íons analito e os íons dos solventes, ambos em fase gasosa. Na figura 28, é possível observar um esquema de uma fonte APCI (HORNING, HORNING, *et al.*, 1973; PITT, 2017; ARDREY, 2003).

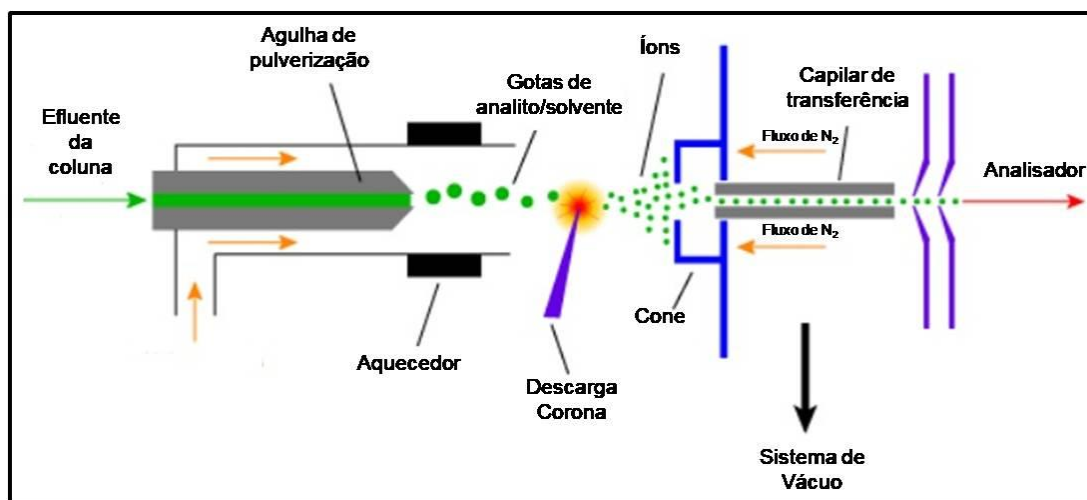


Figura 64: Esquema de uma interface APCI Gates, P (2020) modificado.

A região para a qual são transferidos os íons gerados pelas fontes, é denominada de analisador de massas onde ocorre a medida da sua razão m/z . Os tipos de analisadores mais conhecidos são o time off flight (TOF), quadrupolo-quadrupolo e quadrupolo – ion trap (HOFFMAN e STROOBANT, 2007; DINIZ, 2011).

Os analisadores por tempo de voo utilizam um campo magnético para acelerar os íons. Os que apresentam a mesma razão massa/carga, possuem energia cinética igual logo, a velocidade dependerá do valor da massa molecular. Sendo assim, íons com massa molecular menor atingirão o detector em um menor tempo (WOLLNIK, 1993; GUILHAUS, 1998).

Os do tipo duplo quadrupolo funcionam como um filtro seletivo de massa. Funcionam com campos elétricos oscilantes gerados por quatro eletrodos paralelos. Isso desestabilizar ou estabilizar os íons de maneira seletiva durante

a passagem pelo centro do quadrupolo. Dessa maneira, os íons chegarão no detector em tempos diferentes e de acordo com sua razão m/z (SYED, MAHER e TAYLOR, 2013).

Analísadores do tipo quadrupolo – ion-trap funcionam de maneira muito similar aos do tipo duplo quadrupolo. O diferencial é que os íons gerados são aprisionados no interior do analisador. Um potencial RF (rádio frequência) elevado é utilizado para criar uma instabilidade de massa fazendo com que sejam expelidos para fora do analisador de acordo com seus valores de m/z (SCHWARTZ, SENKO e SYKA, 2002; LAMMERT, ROCKWOOD, *et al.*, 2006; SNYDER, PULLIAM, *et al.*, 2016).

5 Objetivo geral

Investigar o potencial antimicrobiano dos extratos de *Penicillium* spp. isolados no Amazonas e caracterizar os constituintes químicos através de LC-MS/MS e RMN

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos dos fungos, oriundos do cultivo em diferentes meios em uma pequena escala;
- Selecionar a o melhor cultivo e a melhor linhagem com atividade antimicrobiana;
- Realizar o cultivo em larga escala da linhagem selecionada;
- Caracterizar os compostos com atividade antimicrobiana por métodos espectroscópicos e espectrométricos;

6 Metodologia geral

6.1 Obtenção e reativação das linhagens

As quatro linhagens de fungos do gênero *Penicillium* spp. utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) sendo provenientes da água de consumo da comunidade ribeirinha, Lago do Limão (DE LIMA, RIBEIRO, *et al.*, 2017). Na tabela 2, podem ser observados os códigos de coleção das linhagens bem como os códigos de trabalho.

Tabela 2: Códigos de coleção e de trabalho das linhagens de *Penicillium* spp.

Código da colônia	Fungos	Código de trabalho
214	<i>Penicillium purpurogenum</i>	F1
1311	<i>Penicillium oxalicum</i>	F2
340	<i>Penicillium citreonigrum</i>	F3
47	<i>Penicillium citrinum</i>	F4

A reativação das linhagens foi realizada em uma placa de petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com Amoxicilina (50 µg/mL) através do cultivo de um pequeno fragmento da colônia preservada. O experimento foi realizado em triplicata sendo incubado em Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) à 28 °C por 7 dias.

Após o tempo de crescimento, as linhagens foram submetidas ao procedimento de monospórica a fim de se obter uma colônia pura (Rizzardi *et al.*, 2017). De cada linhagem, as colônias puras foram suspensas em tubos criogênicos estéreis de 2,0 mL contendo 1,5 mL de glicerol a 20% (SOUZA, *et al.*, 2004). Os tubos foram mantidos em geladeira a 3 °C.

6.2 Obtenção dos extratos fúngicos

As linhagens foram cultivadas em diferentes erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido com as seguintes proporções descritas a seguir.

- BDL (Batata – Dextrose - Extrato de Levedura) – Batata 200 g/L, Dextrose 20 g/L e Extrato de Levedura 4 g/L;
- YES (Extrato de levedura – Sacarose) – Sacarose 150 g/L e Extrato de Levedura 20 g/L;

- ISP₂ (International Streptomyces Project 2) – 10 g/L de Amido, 4 g/L de Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose e 4 g/L de Malte;
- Sabouraud – 20 g/L de Glicose e 10 g/L de Peptona.

Os experimentos foram realizados em triplicada sendo inoculados 50 µL de uma suspensão de conídios na concentração 1×10^{-6} células/mL. Os erlenmeyers foram incubados à 28 °C em DBO por 15 dias. Após o tempo de cultivo, o material fermentado foi filtrado com o auxílio de sistema a vácuo. Desta maneira, obteve-se o caldo e o micélio, conforme pode ser observado na figura 29.

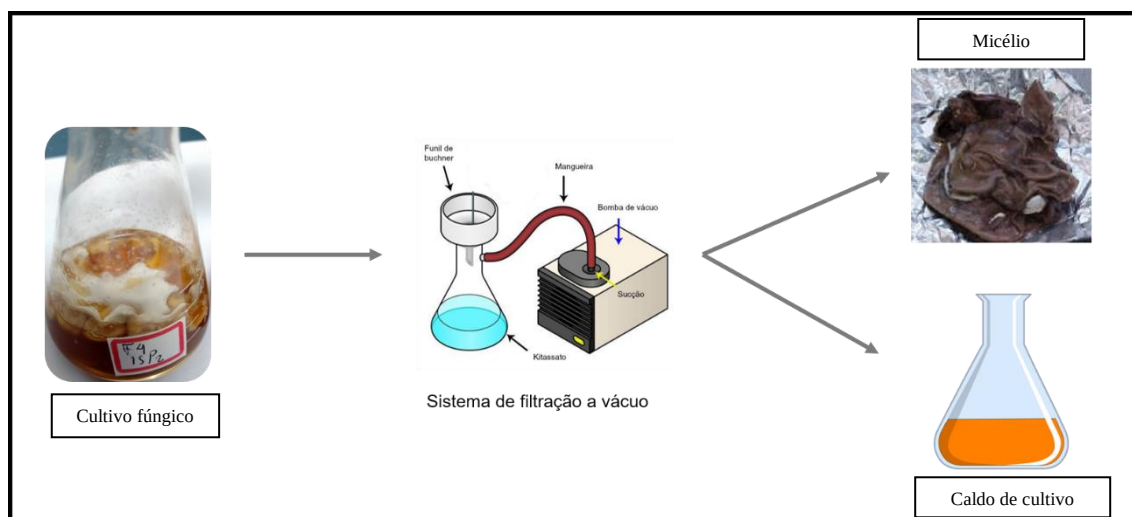


Figura 67: Cultivo do fungo e filtração a vácuo.

Após a etapa de filtração, adicionou-se uma quantidade suficiente de metanol para cobrir o micélio. Após 48 h o material foi filtrado e o solvente foi evaporado. Desta maneira foram obtidos os extratos metanólicos dos fungos cultivados (Figura 30).

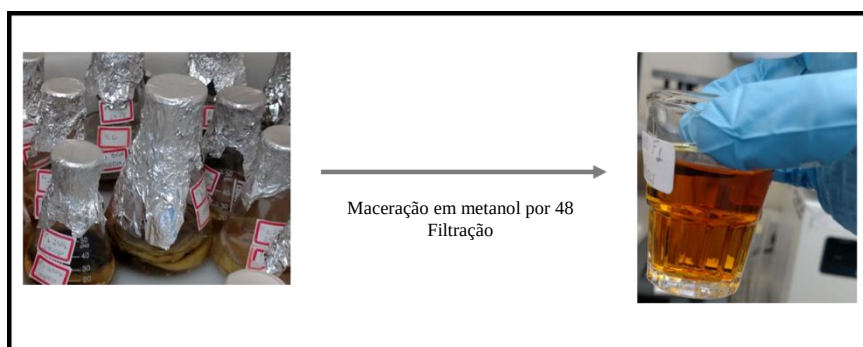


Figura 70: Obtenção dos extratos metanólicos

O caldo foi submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila na proporção 1:1. Com o auxílio de um funil de separação, a fase aquosa foi separada da fase orgânica. O extrato da fase orgânica foi obtido após evaporação do solvente e a fase aquosa foi descartada (Figura 31).

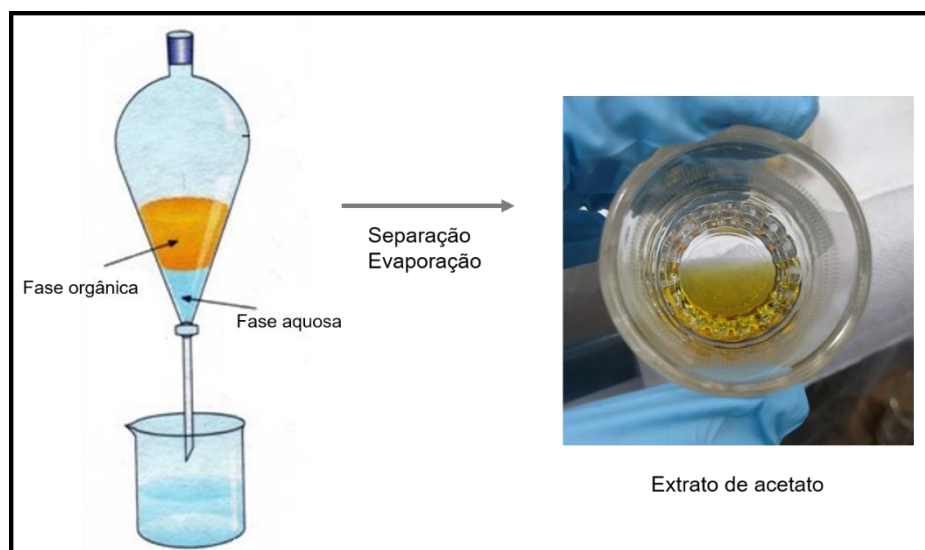


Figura 73: Obtenção dos extratos em acetato

Os 32 extratos obtidos foram conduzidos ao dessecador para eliminação de água. Quando secos, transferiu-se 1 mg das amostras para diferentes tubos do tipo eppendorf para futuras análises de LC-MS.

6.3 Preparo dos inóculos e amostras para avaliação do potencial antimicrobiano

Os microrganismos testados foram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), as gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC-10231) e *C. tropicalis* (ATCC-13803) adquiridas da coleção Cefar Diagnóstica. As bactérias foram reativadas em Caldo Mueller Hinton (MH) (HIMEDIA®) e as leveduras em Caldo Sabouraud (SB) (HIMEDIA®), ambas foram incubadas à 36 ± 1 °C por 24 e 48 h, respectivamente.

Após reativação dos patógenos, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MH para bactérias, e caldo SB para levedura, ambos posteriormente incubados a 36 ± 1 °C por 24 horas.

A concentração de células dos patógenos foi ajustada para o padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida, o padrão foi diluído 1:100, obtendo-se dessa maneira a concentração células $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para as leveduras (CLSI, 2002) e para as bactérias, foi diluído 1:10 para obter uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL (CLSI, 2003).

As amostras foram pesadas e diluídas em uma solução aquosa de DMSO 10% até a concentração de 2 mg/mL. Para realização do teste foram inoculados em placa de Elisa 10 µL do patógeno, 100 µL de meio de cultura (SB ou MH) e 100 µL do extrato. O experimento foi incubado a 36 ± 1 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, adicionou-se 10 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) para avaliação dos resultados. O teste foi realizado em placa de Elisa em triplicata com os extratos descritos na tabela 3. Foram considerados como resultados positivos os poços que não adquiriram a coloração rosa. Em seguida, os que apresentaram resultado positivo foram conduzidos para a determinação da concentração mínima inibitória – CIM e foram cultivados em larga escala para isolamento e identificação dos compostos químicos.

Tabela 3: Extratos obtidos e fungos testados

Número	Fungo	Meio de Cultivo	Extrato	Solvente
1	<i>P. purpureogenum</i>	YES	Caldo	AcOEt
2		BDL	Caldo	AcOEt
3		SB	Caldo	AcOEt
4		ISP ₂	Caldo	AcOEt
5	<i>P. purpureogenum</i>	YES	Micélio	MeOH
6		BDL	Micélio	MeOH
7		SB	Micélio	MeOH
8		ISP ₂	Micélio	MeOH
9	<i>P. oxalium</i>	YES	Caldo	AcOEt
10		BDL	Caldo	AcOEt
11		SB	Caldo	AcOEt
12		ISP ₂	Caldo	AcOEt
13	<i>P. oxalium</i>	YES	Micélio	MeOH
14		BDL	Micélio	MeOH
15		SB	Micélio	MeOH

16		ISP ₂	Micélio	MeOH
17		YES	Caldo	AcOEt
18	<i>P. citreonigrum</i>	BDL	Caldo	AcOEt
19		SB	Caldo	AcOEt
20		ISP ₂	Caldo	AcOEt
21		YES	Micélio	MeOH
22	<i>P. citreonigrum</i>	BDL	Micélio	MeOH
23		SB	Micélio	MeOH
24		ISP ₂	Micélio	MeOH
25		YES	Caldo	AcOEt
26	<i>P. citrinum</i>	BDL	Caldo	AcOEt
27		SB	Caldo	AcOEt
28		ISP ₂	Caldo	AcOEt
29		YES	Micélio	MeOH
30	<i>P. citrinum</i>	BDL	Micélio	MeOH
31		SB	Micélio	MeOH
32		ISP ₂	Micélio	MeOH

BDL – Batata Dextrose extrato de levedura; SB – Sabouraud; ISP₂ - International Streptomyces Project 2 e YES – Extrato de levedura sacarose; Acoet – Acetato

6.4 Concentração inibitória mínima- CIM

Após a avaliação do potencial antimicrobiano, foram determinadas o MIC para cada amostra. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura na concentração dobrada. Em seguida, adicionou-se 100 µL de cada amostra teste na concentração de 2 mg/mL, em triplicata, na primeira fileira da placa. Após a homogeneização, as amostras foram diluídas de maneira sucessiva no poço seguinte. O esquema da diluição está apresentado na figura 32.

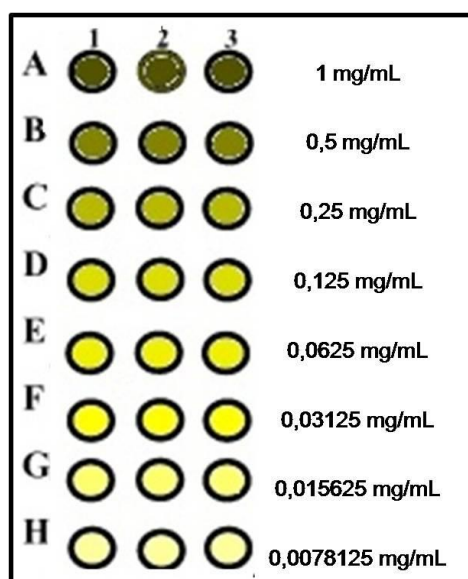


Figura 76: Concentrações obtidas a partir das sucessivas diluições.

Foram inseridos em todos os poços 10 µL dos patógenos nas concentrações citadas no item 5.3. O experimento foi incubado a 36 ± 1 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, adicionou-se 10 µL do revelador TTC à 1% para avaliação dos resultados. Foram considerados como resultados positivos os poços que não adquiriram a cor rasa após a adição do revelador

6.5 *Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE-DAD*

As amostras selecionadas foram diluídas a 1 mg/mL em MeOH e em seguida, analisadas em HPLC modelo Acella® (Thermo Scientific), equipado com uma coluna Shimadzu (shim pack) C18 (5µm, 250 mm x 4,60 mm). A eluição foi realizada com um gradiente de 20-100% de B ao longo de 24 min a um fluxo de 1 mL/min. Os espectros de UV foram registrados na faixa de 190-400 nm.

6.6 *Cromatografia em coluna – CC*

Para o fracionamento das amostras, foi utilizada uma coluna de vidro de 40 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro interno. As separações foram realizadas com o auxílio de sílica gel C18 fase reversa (15 – 25 µm) com poro medindo 100 Å (Sigma-Aldrich). A fase móvel utilizada foi metanol / água em um gradiente de 10%, 50% e 100%. O metanol (Synth) utilizado no fracionamento das amostras foi previamente destilado. Em seguida, as frações obtidas foram alocadas em dessecador para eliminação da água, quando secas foi pesado 1 mg de cada fração para realização de análise em LC/MS.

6.7 *Análises de ultra fast liquid chromatography acoplada ao espectrômetro de massas – UFLC-MS/MS*

Foi utilizado um cromatógrafo modelo Prominence UFLC (Shimadzu) da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia – CA-LTQPN - INPA, operando com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF com ionização por ESI (Bruker daltonics). A coluna utilizada foi uma Kinetex (Core-Shell) C18 150 x 2,1 mm (100 Å, 2,6µ) com fases móveis metanol e água. O método utilizado foi de 20% a 100% com variação de

3,3% no tempo de 0 até 24 minutos. Após a análise, as aquisições foram devidamente processadas.

6.8 Isolamento dos compostos de interesse por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa

O isolamento em escala semi-preparativa foi realizado, sob a supervisão da Dr. Sergio Massayoshi Nunomura (INPA), em cromatógrafo modelo Shimadzu®, CBM – 20A, equipado com detector de UV SPD-20A, degaseificador DGU-20A e sistema binário de solventes LC-DAD. As análises foram realizadas em uma coluna semi-preparativa Shim-pack Shimadzu C18 (CLC-ODS(M)®) de 5µm, 250 x 20 mm (100 Å, 5u) com fases móveis sendo metanol e água. Após o isolamento dos constituintes químicos majoritários, as amostras foram analisadas em RMN Bruker AVANCE III HD (500 MHz) da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas -UFAM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSH, P. Fungal Endophytes: Unique Plant Inhabitants With Great Promises. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, 2013.

ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.

AMAZONAS. GOVERNO DO ESTADO. **A Floresta Amazônica e seu papel nas mudanças climáticas**. 1. ed. Manaus: Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento, v. 18, 2009.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. [S.l.]: Analytical Techniques in the Sciences / John Wiley & Sons, 2003.

ARPINO, P. Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray". **Mass Spectrometry Reviews**, v. 11, n. 1, p. 3-40, 1992.

AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações na indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, 2018.

AZIZ, N. H.; MATTAR, Z. A.; MAHROUS, S. R. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. **Journal of Food Safety**, v. 26, n. 3, p. 184-201, 2006.

BAO, J. et al. Dihydrothiophene-condensed chromones from a marine-derived fungus *Penicillium oxalicum* and their structure–bioactivity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 2433-2436, 2014.

BENCHIMOL, S. **Amazônia: um pouco antes e além-depois**. 2. ed. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, v. 1, 2010.

BIAN, X. et al. Penioxalicin, a novel 3-nor-2,3-seco-labdane type diterpene from the fungus *Penicillium oxalicum* TW01-1. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 5013-5016, 2015.

DBOE, H. B. et al. Big Effects From Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. **ChemBioChem**, v. 7, p. 2, 2002.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FTC, 2008.

BROWN, K. **Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution**. [S.I.]: Sutton Publishing, 2004.

BUCHI, G.; WHITE, J. D.; WOGAN, G. N. The Structures of Mitorubrin and Mitorubrinol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 15, p. 87, 1965.

CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, É. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.

CANUTO, K. M. et al. **Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura**. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

CAPELARI, M. & G. A. M. The Higher Fungi. In: BICUDO, C. & M. M. **Biodiversity in Brazil**. São Paulo: CNPq, 1996.

CAPPIELLO, A. et al. A simple approach for coupling liquid chromatography and electron ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 3, p. 265-273, 2002.

CAPPIELLO, A. et al. Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9443-9448, 2008.

CARLTON, W. W.; TIUTE, J.; MISILEV, P. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 13, p. 372, 1968.

CAVALCANTE, F.; CAMPOS, M. C. C.; DE LIMA, J. P. S. A percepção ambiental sobre fungos: uma revisão. **Novos Cadernos NAEA**, v. 24, n. 3, p. 81-98, 2021.

CHAIMBAULT, P. The Modern Art of Identification of Natural Substances in Whole Plants. In: JACOB, C., et al. **Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products**. [S.I.]: Springer Netherlands, 2014. p. 31-94.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHAVEZ, R. et al. Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Saccharomyces cerevisiae* transformed with genomic fungal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 237-241, 2002.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.

CHEN, L. et al. Citrinin Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 515-517, 2011.

CHEN, M. E. A. Lumazine peptides penilumamides B–D and the cyclic pentapeptide asperpeptide A from a gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 7, p. 1601-1606, 2014.

CIEGLER, A.; HAYES, A. W.; VESONDER, R. F. Production and Biological Activity of Secalonic Acid D. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 39, 1980.

COCA-CASTRO, A. et al. **Land use Status and Trends in Amazonia**. International Center for Tropical Agriculture. Palmira, p. 72. 2013. (0000000000).

COLLINS, C. H. **Scient. Chromatogr**, v. 1, n. 7, 2009.

DA SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; DA FONSECA, G. A. B. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. **MEGADIVERSIDADE**, v. 1, n. 1, 2005.

DA SILVA, J. V. **Estudo das alterações metabólicas nos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum***. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

DASS, C. Hyphenated Separation Techniques. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. **John Wiley & Sons**, p. 151-194, 2007.

DE OLIVEIRA, J. C.; KATAK, RICARDO DE MELO; ROCHA, E. M.; MUNIZ, V. A.; SERRÃO, D. M.; CORREA, L. V.; FILHO, J. DA SILVA R.; TADEI, W. P.. Detecção molecular do locus gênico chi em linhagens de bacilos amazônicos. In: OLIVEIRA, L. A., et al. **Diversidade Microbiana da Amazônia**. Manaus: INPA, v. 3, 2019.

DEVI, P. et al. Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38, n. 1, p. 38-44, 2009.

DEVI, P.; RODRIGUES, C.; NAIK, C. G. Isolation and Characterization of Antibacterial Compound from a Mangrove-Endophytic Fungus, *Penicillium chrysogenum* MTCC 5108. **Indian Journal Microbiology**, 2012.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995.

DIAS, L. B. **Água nas plantas**. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 2008.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Belo Horizonte. 2011.

DOLE, M. et al. **The Journal of Chemical Physics**, 1968.

DONG, M. W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. Nova jersey: Wiley, 2006.

DONINI, L. P. et al. DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE PLEUROTUS SPP. SOB A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS E DEXTROSE. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DUAN, R. et al. Antimicrobial meroterpenoids from the endophytic fungus *Penicillium* sp. T2-8 associated with *Gastrodia elata*. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 197-201, 2016.

EGANA, L. et al. Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 24, n. 1, 1996.

EL-NEKETI, M. et al. Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, an Endophyte Isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1099-1104, 2013.

EMBRAPA. embrapa.br. **Contando Ciência**, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-amazonia>>. Acesso em: 23 maio 2020.

ERRAMPALLI, D. *Penicillium expansum* (Blue Mold). In: BAUTISTA-BAÑOS, S. **Postharvest Decay**. [S.l.]: Academic Press, 2014.

FEARNSIDE, P. M. **A floresta amazônica nas mudanças globais**. 19. ed. Manaus: INPA, v. 1, 2003.

FLORA DO BRASIL. Re flora do Brasil, 2020. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=12&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=1&ordem=null&genero=&especie=&autor=&nome>>. Acesso em: 23 maio 2020.

FONSECA, O. J. D. M. **Pensando a Amazônia**. Manaus: Valer Editora, 2011.

FREIRE, F. D. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. D. L. FUNGOS ENDOFÍTICOS: UMA FONTE DE PRODUTOS BIOATIVOS DE IMPORTÂNCIA PARA A HUMANIDADE. **Essentia**, Sobral, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.

FRIED, B.; SHERMA, J. **Thin Layer Chromatography**. 4. ed. Nova York: Marcel Dekker, 1999.

FRISVAD, J. C. The Connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and Mycotoxins with Special Emphasis on Misidentified Isolates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, p. 452-467, 1989.

FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 201-241, 2004.

FRITZ, M. et al. A family 51 α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification, properties and amino acid sequence. **mycological research**, v. 112, p. 933-942, 2008.

GAO, S. S. et al. Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011.

GERBER, F. et al. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μ m particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. **Journal of Chromatography A**, v. 2, p. 127-133, 2004.

GHANBARI, M. A. T.; MOHAMMADKHANI, H. S.; BABAEIZAD, V. Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species. **Mycologia Iranica**, v. 1, n. 2, 2014.

GIRAUD, F.; GIRAUD, T.; AGUILETA, G. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 204-213, 2010.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. D. C. O.; LIMA, J. L. FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL COMO PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS. **Essentia**, sobral, v. 15, n. 1, p. 71-92, 2013.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOU, B. et al. 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.

GRAVES, R. R.; HESSELTINE, C. W. Fungi in flour and refrigerated dough products. **Mycopathol Mycol App**, v. 29, n. 3, p. 277-290, 1966.

GUILHAUS, M. Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 30, n. 11, p. 1519-1532, 1998.

GUIMARÃES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "Caenorhabditis elegans"**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2010.

GUO, Z. et al. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, 2007.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels**, v. 3, p. 467-477, 2012.

HARPER, J. K. E. A. Pestacin a 1-3dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis* microspore possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HARRI, E. E. A. Über die isolierung der stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* Dodge. **Helvetica Chimica Acta**, v. 46, p. 1235-1244, 1963.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, 2017.

HETHERINGTON, A. C.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of microorganisms. XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 220, p. 269-295, 1931.

HIDALGO, M.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. Beta-glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification and properties. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 15, n. 2, 1992.

HIGUCHI, M. I. G. **A floresta amazônica e suas múltiplas dimensões: uma proposta de educação ambiental**. 1. ed. Manaus: INPA / CNPq, v. 1, 2004.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons Chichester, 2007.

HONGSUK, S.; HUH, H. K.; WILCOX, C. S. Chemistry of F1, F0-ATPase inhibitor, photoleomerization of citreoviridin and isocitreoviridin an structure of isocitreoviridin. **Bull Korean Chem Soc**, v. 17, p. 104-105, 1996.

HOOPER, J. W. et al. The Chemistry of Fungi. Part LXVJ The Structures of Ergochrysin A, Isoergochrysin A, and Ergoxanthin, and of Secalonic Acids A, B, C, and D. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, v. 21, p. 3580-3590, 1971.

HORNING, E. C. et al. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 6, 1973.

HOSSAIN, M. M. et al. The plant growth-promoting fungus *Penicillium* spp. GP15-1 enhances growth and confers protection against damping-off and anthracnose in the cucumber. **Journal of Oleo Science**, v. 63, p. 391-400, 2014.

HOUBRAKEN, . J.; FRISVAD, . J. C.; SAMSON, . R. A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53-138, 2011.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 117-133, 2010.

HUANG, J. N. et al. Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, *Penicillium citreonigrum* SP-6. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 114-118, 2018.

IRIBARNE, J. V.; THOMSON, B. A. **The Journal of Chemical Physics**, 1976.

JESUS, K. D. **Investigação de metabólitos secundários bioativos de micro-organismos do ambiente marinho**. Universidade de São Paulo. São Carlos. 2012.

KARAHADIAN, C.; JOSEPHSON, D. B.; LINDSAY, R. C. Volatile compounds from *Penicillium* sp. contributing musty-earthly notes to Brie and Camembert cheese flavors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 339-343, 1985.

KHAN, S. A. et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **BMC Microbiology**, v. 8, 2008.

KHETHR, F. B. H. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Trichoderma* sp. growing in Tunisia. **Annals of microbiology**, v. 58, p. 303-308, 2008.

KIM, S. E. A. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 448-450, 2004.

KLITGAARD, A. et al. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, n. 7, p. 1933-1943, 2014.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 189-198, 2000.

KOZLOVSKY, A. G. et al. Quinocitrinines A and B, New Quinoline Alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a Permafrost Fungus. **The Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 5, p. 488-491, 2003.

KURE, C. F.; SKAAR, I.; BRENDENHAUG, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 41-49, 2004.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. Biodiscovery from microbial resources: Actinomycetes leading the way. **Microbiology Austrália**, v. 31, n. 2, p. 53-57, 2010.

KUSHIRO, M. Historical review of researches on yellow rice and mycotoxigenic fungi adherent to rice in Japan. **JSM Mycotoxins**, v. 65, n. 1, p. 19-23, 2015.

LAI, D. et al. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 100-106, 2013.

LAMMERT, S. A. et al. Miniature toroidal radio frequency ion trap mass analyze. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 7, p. 916922, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEITÃO, A. L.; EGUITA, F. J. Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. **Microbiology Research**, v. 183, p. 8-18, 2016.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. How Many Species Are There in Brazil? **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, 2005.

LI, C. et al. Penicimutamides A–C: Rare Carbamate-containing Alkaloids from a Mutant of the Marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59†. **RSC Advances**, p. 1-6, 2016.

LI, X. et al. A new phenolic enamide and a new meroterpenoid from marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium oxalicum* EN-290. **Journal of asian natural Products research**, v. 17, n. 12, p. 1204-1212, 2015.

LINK, H. F. Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio 1. **Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin.**, v. 3, p. 3-42, 1809.

LU, Z. Y. et al. Citrinin Dimers from the Halotolerant Fungus *Penicillium citrinum* B-57. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 543-546, 2008.

LUDEMANN, V.; GRECO, M.; RODRÍGUEZ, M. P. Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 312-318, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Broock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v. 54, p. 301-309, 2000.

MAPARI, S. A. S. et al. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 24, p. 1-15, 2009.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Colorimetric Characterization for Comparative Analysis of Fungal Pigments and Natural Food Colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7027-7035, 2006.

MASTERS, K. S.; BRASE, S. Xanthones from Fungi, Lichens, and Bacteria: The Natural Products and Their Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3717-3776, 2012.

MCMASTER, M. **HPLC: A Practical User's Guide**. Nova jersey: Wiley, 2007.

MENG, L. H. et al. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3c]-pyrrole-4,5-dione derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 5, p. 610-612, 2015.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. [S.l.]: Wiley, 2004.

MISLIVEC, P.; TUIITE, J. **Mycologia**, v. 62, n. 67, 1970.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 655, p. 13-27, 2009.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 65, 2013.

MURALI, M.; AMRUTHESH, K. N. Plant Growth-promoting Fungus *Penicillium oxalicum* Enhances Plant Growth and Induces Resistance in Pearl Millet Against Downy Mildew Disease. **Journal of Phytopathology**, p. 1-12, 2014.

MUSALEM, S. M.; STEINER, W. J.; CONTRERAS, O. I. Produccion de celulasas por hongos aislados de madeira e suelos del sur de Chile. **Boletín Micológico**, v. 8, p. 17-25, 1984.

NELSON, J. H. Production of blue cheese flavor via submerged fermentation by *Penicillium roqueforti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 567-569, 1970.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. 3. ed. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

NISHIE, K.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. Toxicity of citreoviridin. **Res Commun Chem Patho Pharmacol**, v. 59, p. 31-52, 1988.

NJOBEH, P. B. et al. Contamination with storage fungi of human food from Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 3, p. 193-198, 2009.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de Diaporthe citri em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 429-432, 2004.

OLIVEIRA, G. D.; DA SILVA, L.; TALLARICO, P. M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

ONDEYKA, J. G. et al. Nodulisporic Acid A, a Novel and Potent Insecticide from a Nodulisporium Sp. Isolation, Structure Determination, and Chemical Transformations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 38, p. 8809-8816, 1997.

PARVEEN, S. et al. First report of Penicillium glaucum Link causing Penicillium rot of pear fruits Pyrus communis L. in Jammu and Kashmir, India. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 8, p. 265-272, 2017.

PEIXOTO, J. M.; UNTERSTELL, N.; FREIRE, R. M. **O valor dos serviços da natureza - subsídios para políticas públicas de serviços ambientais no Amazonas**. 1. ed. Manaus: Governo do Estado do Amazonas, v. 1, 2010.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective**. 10. ed. [S.l.]: Trends in plant science, v. 5, 2000.

PITT ET AL, J. I. Penicillium and Related Genera. In: PITT., J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. [S.l.]: [s.n.], 1997. p. 203-338.

PITT, J. I. **The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces**. London: Academic Press, 1979.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3. ed. New York: Springer, 2009.

PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19-34, 2017.

PONGCHAROEN, W. E. A. Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 856-858, 2006.

REIMANN, H. A. MICROCOCCUS TETRAGENUS INFECTION. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 14, n. 3, p. 311-319, 1935.

REN, H. et al. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 59, 2006.

REN, Y. et al. Two new polyketides from the fungus *Penicillium oxalicum* MHZ153. **NATURAL PRODUCT RESEARCH**, v. 33, n. 3, p. 347-353, 2019.

ROBERTS, G. **Encyclopedia of Biophysics**. [S.l.]: Springer, 2013.

ROSA, C. A. R. A. A. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 2, p. 241-248, 2010.

RUKACHAISIRIKUL, V. E. A. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry Letters**, v. 69, p. 783-787, 2008.

SAKAKI, J. First report on the toxicological research of molded rice. **Tokyo Ishikai-shi**, v. 5, p. 1097-1104, 1981.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-266, 2004.

SAMSON, R. A.; PITT, J. I. **Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics**. [S.l.]: [s.n.], v. 102, 1985.

SANTAMARINA, M. P. et al. Antagonistic Activity of *Penicillium Oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium Decumbens* Thom and *Trichoderma Harzianum* Rifai Isolates Against Fungi, Bacteria and Insects in Vitro. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2002.

SAXENA, A. K. et al. Microbial diversity of extreme regions: an unseen heritage and wealth. **Indian Journal Plant Genetic**, v. 29, p. 246-248, 2016.

SCHWARTZ, J. C.; SENKO, W. M.; SYKA, J. E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, 2002.

SERRA, R.; PETERSON, S.; VENANCIO, A. Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. **Research in Microbiology**, v. 3, 2008.

SEWELL, P.; CLARKE, B. **Chromatographic separation**. Nova York: Wiley, 1998.

SHUO, S.; WEI, L.; JIAN, W. Antimicrobial and antitumor activities of crude secondary metabolites from a marine fungus *Penicillium Oxalicum* 0312F1. **African journal of microbiology research**, v. 8, n. 14, p. 1480-1485, 2014.

SILVA, G. H. E. A. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2038-2041, 2010.

SILVA, M. C. D. **Metamorfoses da Amazônia**. Manaus: Editora Valer, 2013.

SILVA, M. R. O. E. A. Section: Antimicrobial natural products. Viriditoxin, an antibacterial substance produced by mangrove endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. [S.l.]: Biocontrol / Formatex Research Center, 2013. p. 1406-1441.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 8. ed. [S.l.]: Gen / Ltc, 2019.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SMITH, G. Taxonomy of *Penicillium*: A manual of the *Penicila*. **Nature**, v. 4268, 1951.

SNYDER, D. T. et al. Miniature and Fieldable Mass Spectrometers: Recent Advances. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 2-29, 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. [S.l.]: Wiley, v. 3, 2009.

SOKOVIC, M. et al. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. **Molecules**, v. 14, p. 238-249, 2009.

SOTÃO, H. M. P.; DE CAMPOS, E. L.; COSTA, S. D. P. S. **Micologia diversidade dos fungos na Amazônia**. [S.l.]: Museu Paraense Emílio Goeldi, v. 1, 2004.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SPITELLER, P. Chemical ecology of fungi. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 971-993, 2015.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York , v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUBIRÁ, R. J.; GALVÃO, A.; DE CARVALHO, C. E. G. **Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília: ICMBio/MMA, v. 1, 2018.

SYED, S. U.; MAHER, S.; TAYLOR, S. Quadrupole mass filter operation under the influence of magnetic field. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 12, p. 1325-1339, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química nova**, v. 31, n. 7, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S. Endophytes - mines of pharmacological therapeutics. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 127-149, 2011.

THOM, C. Fungi in cheese ripening: Camembert and Roquefort. U.S. **Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry - Bulletin.**, v. 82, p. 1-39, 1906.

THOMAS, R. **Spectroscopy**. [S.l.]: [s.n.], v. 16, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRINH, P. T. H. et al. SECONDARY METABOLITES FROM A MARINE-DERIVED FUNGUS *Penicillium chrysogenum* 045-357-2. **Journal of Science and Technology**, v. 55, n. 1, 2017.

TRISUWAN, K. et al. Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 1336-1338, 2014.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional Natural Sources for Future Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

TYLER, J. et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology Biochemistry**, v. 40, p. 1733-1740, 2008.

UENO, Y. **Citreoviridin from *Penicillium citreo-viride* Biourge**. Amsterdam: IFH / Elsevier, 1974.

VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1581-1588, 2009.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **STUDIES IN MYCOLOGY**, v. 78, p. 343-371, 2014.

WANG, F. E. A. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 79-83, 2007.

WANG, H. et al. Anti-influenza Virus Polyketides from the Acid-Tolerant Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. **J. Nat. Prod**, v. 74, p. 2014-2018, 2011.

WANG, L. W. et al. Bioactive Metabolites From *Phoma* Species, an Endophytic Fungus From the Chinese Medicinal Plant *Arisaema Erubescens*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

WANG, P. L. et al. Novel Decaturin Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium oxalicum*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, 2013.

WANG, P. L. et al. Two new compounds from a marine-derived fungus *Penicillium oxalicum*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 5, p. 290-293, 2014.

WEHRENS, R. et al. High-throughput carotenoid profiling using multivariate curve resolution. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 15, p. 5075-5086, 2013.

WHITELAW, M.; HARDEN, T.; BENDER, G. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. **Soil Research**, v. 35, p. 291-300, 1997.

WICKLOW, D. T. E. A. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, p. 61, 2005.

WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome†. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, 2008.

WOLLNIK, H. Time-of-flight mass analyzers. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 89-114, 1993.

WRIGHT, S. J. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. **Oecologia**, v. 130, 2002.

XIE, Z. L. E. A. Trichodermaerin, a new diterpenoid lactone from the marine fungus *Trichoderma erinaceum* associated with the sea star *Acanthaster planci*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 1, p. 67-68, 2013.

XU, B.; ZOU, K.; CHENG, F. Alkaloids from *Penicillium oxalicum*, a Fungus Residing in *Acrida cinerea*. **Advanced Materials Research**, v. 881-883, p. 442-445, 2014.

XUE, J. et al. Penicillitone, a Potent in Vitro Anti-inflammatory and Cytotoxic Rearranged Sterol with an Unusual Tetracycle Core Produced by *Penicillium purpurogenum*. **Organic Letters**, v. 16, p. 1518-1521, 2014.

XUE, J. et al. Bioactive Polyhydroxanthones from *Penicillium purpurogenum*. **J. Nat. Prod**, v. 83, p. 1480-1487, 2020.

YANG, L. et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1—potential antibiotics against plant pathogenic fungi. **World JOURNAL Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 909-915, 2008.

YENN, T. W. et al. Antimicrobial efficacy of endophytic *Penicillium purpurogenum* ED76 against clinical pathogens and its possible mode of action. **Korean Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, 2017.

YOSHIHARA, T. E. A. . Three fungitoxic cyclopentanoid sesquiterpenes from stromata of *Epichloe typhina*. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 5551-5554, 1985.

YUAN, W. H. et al. Halogenated Metabolites Isolated from *Penicillium citreonigrum*. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 11, 2014.

YUAN, W. H. et al. Antioxidant Sesquiterpenes from *Penicillium citreonigrum*. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 12, p. 1827-1829, 2017.

YURCHENKO, A. N. et al. BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF THE FACULTATIVE MARINE FUNGUS *Penicillium citrinum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, 2013.

ZANARDI, L. M. E. A. Sesquiterpenoides produzidos pelo fungo *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2333-2336, 2012.

ZHANG, B. et al. Discovery of a Small Molecule Insulin Mimetic With Antidiabetic Activity in Mice. **Science**, v. 284, p. 974-977, 1999.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Report**, New York, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHANG, P. et al. Two new alkaloids from *Penicillium oxalicum* EN-201, an endophytic fungus derived from the marine mangrove plant *Rhizophora stylosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 160-164, 2015.

ZHANG, W. et al. **Chemistry—A European Journal**, v. 14, 2008.

ZHENG, C. J. et al. A new benzopyrans derivative from a mangrove-derived fungus *Penicillium citrinum* from the South China Sea. **NATURAL PRODUCT RESEARCH**, v. 30, n. 7, p. 821-825, 2016.

ZOU, W. X.; AL, E. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.

Capítulo I

Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de fungos *Penicillium* spp.

Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de fungos *Penicillium* spp.

Evaluation of the antimicrobial potential of extracts from fungi *Penicillium* spp.

Evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de hongos *Penicillium* spp.

Recebido: 02/02/2022 | Revisado: 06/02/2022 | Aceito: 09/02/2022 | Publicado: 14/02/2022

O presente capítulo está relacionado aos dois primeiros objetivos específicos desta tese. Foi elaborado um manuscrito em língua portuguesa que foi publicado na revista Research, Society and Development, Qualis Capes A3 com Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26457>.

Paulo Alexandre Lima Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: psantiago@uea.edu.br

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Brasil
E-mail: srhaquel@hotmail.com

Priscila Ferreira de Aquino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2344-0493>
Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas, Brasil
E-mail: priscila.aquino@fiocruz.br

Sergio Massayoshi Nunomura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8919-9225>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: smnunomu@inpa.gov.br

Rita de Cássia Saraiva Nunomura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1119-7238>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: ritasnunomura@gmail.com

Resumo

Os fungos do gênero *Penicillium* produzem metabólitos secundários que são utilizados como modelo para a síntese e desenvolvimento de antibióticos como a Penicilina, Penicilina V, Ampicilina, Amoxilina e Griseofulvina. A produção de tais compostos pode ser explorada através de pequenas alterações em parâmetros físicos e químicos do cultivo. Essas alterações estimulam rotas biossintéticas silenciadas e isso aumenta a diversidade de compostos bioativos produzidos pelo fungo. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi de investigar o potencial antimicrobiano dos extratos *Penicillium* spp. isolados no estado do Amazonas. As linhagens estudadas nesse trabalho estão depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), e foram reativadas em meio BDA por sete dias. Para a produção dos extratos, utilizou-se uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^{-6} UFC/mL. Inoculou-se 50 µL desta suspensão em erlenmeyers contendo 25 mL dos meios BDL, SB, YES e ISP₂. O experimento foi realizado em triplicata, em modo estático, incubado à 28 °C por 15 dias. Passado esse período, o caldo fermentado foi extraído com acetato de etila e o micélio com metanol. Então, determinou-se a Concentração Mínima Inibitória – CIM dos extratos obtidos em acetato de etila frente aos patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. As melhores atividades foram observadas para as linhagens *P. oxalicum* e *P. citrinum* cultivados em BDL e SB com CIM de 250 µg/ml e 62,5 µg/ml, respectivamente.

Palavras-chave: Fungos; Compostos Bioativos; Atividade Antimicrobiana.

Abstract

Fungi of the genus *Penicillium* produce secondary metabolites that are used as a model for the synthesis and development of antibiotics such as Penicillin, Penicillin V, Ampicillin, Amoxicillin and Griseofulvin. The production of such compounds can be explored through small changes in physical and chemical parameters of the crop. These changes stimulate silenced biosynthetic pathways and this increases the diversity of bioactive compounds produced by the fungus. Therefore, the aim of the present study was to investigate the antimicrobial potential of *Penicillium* spp. isolated in the state of Amazonas. The strains studied in this work are deposited in the Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) of the Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), and were reactivated in PDA medium for seven days. For the production of extracts, a spore suspension solution was used at a concentration of 1×10^{-6} CFU/mL. 50 μ L of this suspension was inoculated into erlenmeyers containing 25 mL of BDL, SB, YES and ISP2 media. The experiment was carried out in triplicate, in static mode, incubated at 28 °C for 15 days. After this period, the fermented broth was extracted with ethyl acetate and the mycelium with methanol. Then, the Minimum Inhibitory Concentration - MIC of the extracts obtained in ethyl acetate against the pathogens *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* was determined. The best activities were observed for the *P. oxalicum* and *P. citrinum* strains cultivated in BDL and SB with MIC of 250 μ g/ml and 62.5 μ g/ml, respectively.

Keywords: Fungi; Bioactive Compounds; Antimicrobial Activity.

Resumen

Los hongos del género *Penicillium* producen metabolitos secundarios que se utilizan como modelo para la síntesis y desarrollo de antibióticos como Penicilina, Penicilina V, Ampicilina, Amoxicilina y Griseofulvina. La producción de tales compuestos se puede explorar a través de pequeños cambios en los parámetros físicos y químicos del cultivo. Estos cambios estimulan rutas biosintéticas silenciadas y esto aumenta la diversidad de compuestos bioactivos producidos por el hongo. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar el potencial antimicrobiano de *Penicillium* spp. aislada en el estado de Amazonas. Las cepas estudiadas en este trabajo están depositadas en la colección de hongos da Amazônia (CFAM) del Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), y fueron reactivadas en medio PDA durante siete días. Para la elaboración de los extractos se utilizó una solución de suspensión de esporas a una concentración de 1×10^{-6} UFC/mL. Se inocularon 50 μ L de esta suspensión en erlenmeyers que contenían 25 mL de medio BDL, SB, YES e ISP2, el experimento se realizó por triplicado, en modo estático, se incubó a 28 °C durante 15 días. Pasado este tiempo, el caldo fermentado se extrajo con acetato de etilo y el micelio con metanol. Luego, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria - CMI de los extractos obtenidos en acetato de etilo frente a los patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Las mejores actividades se observaron para las cepas de *P. oxalicum* y *P. citrinum* cultivadas en BDL y SB con MIC de 250 μ g/ml y 62,5 μ g/ml, respectivamente.

Palabras clave: Hongos; Compuestos Bioactivos; Actividad Antimicrobiana.

1 Introdução

1.1 Microrganismos: importância e relação com metabólitos secundários

Os microrganismos pertencem a um grupo heterogêneo de seres que vivem de forma independente ou em comunidades e encontram-se amplamente distribuídos em diversos tipos de ecossistemas (Cardoso & Andreote, 2016). Dentre estes seres, os fungos e as bactérias são aqueles que através de reações químicas de decomposição, participam da manutenção de diversos processos ecológicos. Logo, apresentam um papel fundamental na ciclagem dos nutrientes em ecossistemas aquáticos e terrestres (Thomaz, 2009).

Atualmente são estimados que existam em escala global cerca de 3,8 milhões de

espécies fúngicas pertencem ao Reino Fungi. Estes organismos são classificados como eucariontes, heterotróficos com quitina como principal constituinte da sua parede celular (Hawksworth & Lücking, 2017; Azevedo & Barata, 2018). A maioria dos fungos podem ser encontrados no solo, onde desempenham o papel de decomposição da matéria orgânica através da digestão enzimática. Desta forma, as macromoléculas como os polissacarídeos e proteínas contidas no substrato em decomposição no solo, são quebradas em compostos mais simples e servem de nutrientes que podem beneficiar outros organismos (de Campos & Costa, 2004; Madigan, et al., 2016).

Conforme exposto, os fungos são fundamentais para o equilíbrio ambiental devido a sua presença em diversos ecossistemas onde exercem a ciclagem de nutrientes e auxiliam na manutenção dos ciclos biogeoquímicos. Podem ainda estabelecer relações mutualísticas com plantas oferecendo vantagens como adaptação ao ambiente, indução à tolerância contra fatores de estresse, resistência ao ataque de insetos e doenças (Zhang, Song e Tan, 2006; Madigan et al., 2016).

Estes benefícios são possíveis, uma vez que os fungos apresentam a capacidade de produzir compostos com elevada diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade de ligação com receptores celulares (Molinari, 2009; Guimarães, 2010). Por esses motivos, dentre outros, esses compostos são de elevado interesse acadêmico e industrial e são eles os de metabólitos secundários (Pichersky & Gang, 2000; Bon, Ferrara e Corvo, 2008).

Os metabólitos secundários são compostos classificados como não essenciais, ou seja, não estão diretamente ligados ao desenvolvimento, crescimento e reprodução dos fungos e sua ausência não resulta na morte imediata do indivíduo, mas desempenham funções importantes como proteção, competição e interação com outras espécies (Freire, Vasconcelos & Coutinho, 2014; Meng et al., 2015; Spiteller, 2015).

Diferente das plantas, os fungos apresentam inúmeras vantagens quando se leva em consideração a obtenção de compostos bioativos. Usando este tipo de organismo eliminamos variáveis como a sazonalidade, divergências ambientais e políticas com o corte e coleta. Em alguns casos, os rendimentos de metabólitos secundários em fungos são superiores aos observados em plantas (Gonçalves, Freire, & Lima, 2013).

1.2 Fungos do gênero *Penicillium* spp como fontes de metabólitos secundários

Quando se trata de moléculas com potencial antimicrobiano, o *Penicillium chrysogenum*, antes conhecido como *P. notatum*, é o mais conhecido. A literatura relata que desta espécie foi isolada a Penicilina G, metabólito secundário com a maior atividade antimicrobiana e única penicilina natural utilizada clinicamente (Calixto & Cavalheiro, 2012; Houbaken, Frisvad, & Samson, 2011).

Dentre outras espécies deste fungo, pode-se destacar o *P. oxalicum* como fonte de compostos bioativos. Este fungo é um ascomiceto anamórfico encontrado no solo e em

associação com as raízes do milho. Por esse motivo, o *P. oxalicum* apresenta elevada importância para o setor agrícola de produção de milho, devido sua atuação como fixador de nutrientes, promotor da síntese de fatores de crescimento das plantas e indutor do aumento da capacidade defensiva da planta, seja contra fitopatógenos ou predadores (Murali & Amruthesh, 2014; Tyler et al., 2008; Van Der Ent, Van Wees & Pieterse, 2009; Hossain, et al., 2014).

Dos compostos bioativos obtidos a partir do cultivo de *P. oxalicum*, tem-se o ácido secalônico D e F. O primeiro apresenta propriedades citotóxicas contra células causadoras de carcinoma epidermóide de boca (KB) e o fibrossarcoma (Guo et al., 2007; Ren et al., 2006). Já o ácido secalônico F possuem atividade antimicrobiana contra *Bacillus megaterium* uma bactéria fitopatogênica (Zhang et al., 2008; Masters & Brase, 2012).

A literatura relata ainda que *P. Citreonigrum* é uma fonte promissora de compostos bioativos. A partir dele pode-se obter substâncias antioxidantes, com potencial de inibição da proliferação de células cancerígenas, como a do hepatocarcinoma humano - HepG2, e câncer de colorretal humano - HCT116. Encontram-se ainda compostos inibidores da enzima α -glicosidase que auxiliam no controle da glicemia (Yuan, Zhang, Zhang, & Ding, 2017; Huang, et al., 2018; Yuan, et al., 2014).

Outra espécie que chama atenção é o *P. citrinum*, é um fungo amplamente distribuído em diversos ambientes. De acordo com literatura, esta espécie é constantemente encontrada em substratos como o solo, cereais, especiarias, frutas e ambientes internos (Pitt, 1979; Houbaken, Frisvad, & Samson, 2010).

Vale ressaltar que esta espécie é fonte de diversos compostos bioativos, alguns deles são a citrinina, ácido tanzawaico A, quinolactacinas, quinocitrininas, ácido esteárico, mevastatina e compactina. Atualmente busca-se entender os benefícios de outros metabólitos secundários produzidos por esse fungo, principalmente os que apresentam atividade antimicrobiana (Kozlovsky, et al., 2003; Samson & Frisvad, 2004; Hetherington & Raistrick, 1931; Jesus, 2012; Malmstrøm, Christophersen & Frisvad, 2000).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano dos extratos de fungos *Penicillium* spp. que foram isolados no Amazonas.

2. Metodologia

2.1 Reativação das linhagens fúngicas

As linhagens de *P. oxalicum*, *P. citreonigrum* e *P. citrinum* foram cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane sendo provenientes de diferentes ambientes amazônicos conforme estudo realizado por Lima e colaboradores (2017).

A reativação das linhagens foi realizada em uma placa de petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com Amoxicilina (50 mg/mL) através da retirada de um pequeno fragmento da colônia preservada. O experimento foi realizado em triplicata sendo incubado em DBO à 28 °C por 7 dias.

Após o tempo de crescimento, as cepas foram submetidas ao procedimento de monospórica para a obtenção de colônias fúngicas puras (Rizzardi, et al., 2017). As colônias puras foram preservadas em tubos criogênicos estéreis de 2,0 mL contendo 1,5 mL de glicerol à 20% e armazenadas em geladeira à 3 °C.

2.2 Cultivo em escala laboratorial e obtenção dos extratos

Foram inoculadas 50 µL de uma suspensão de esporos na concentração 1×10^{-6} UFC/mL em diferentes erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido com as seguintes proporções: BDL (Batata – Dextrose - Extrato de Levedura) – Batata 200 g/L, Dextrose 20 g/L e Extrato de Levedura 4 g/L; YES (Extrato de levedura – Sacarose)–Sacarose 150 g/L e Extrato de Levedura 20 g/L; ISP₂ (International Streptomyces Project 2) – 10 g/L de Amido, 4 g/L de Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose e 4 g/L de Malte; Sabouraud –20 g/L de Glicose e 10 g/L de Peptona.

O cultivo foi realizado em triplicata ao longo de 15 dias à 28 °C. Após o tempo de cultivo o material fermentado foi filtrado em sistema a vácuo. O caldo obtido foi submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila na proporção 1:1 e o micélio foi macerado em metanol por 48 horas. Após a eliminação do solvente, foram pesados 2 mg dos extratos para determinação da CIM da atividade antimicrobiana.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

Os microrganismos testados foram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), as gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC-10231) e *C.tropicalis* (ATCC-13803) adquiridas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD). As bactérias foram reativadas em Mueller Hinton Broth (MH) (HIMEDIA®) e as leveduras em Sabouraud Broth (SB) (HIMEDIA®), ambas foram incubadas à 36 ± 1 °C por 24 horas e 48 horas, respectivamente.

Após reativação dos patógenos, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MH para bactérias, e caldo SB para levedura, ambos posteriormente incubados a 36 ± 1 °C por 24 horas.

Para a determinação da CIM, foi utilizada a metodologia estabelecida pela NCCLS (2003). A concentração de células dos patógenos foi ajustada para o padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida, o padrão foi diluído 1:100, obtendo-se dessa maneira a concentração células $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para leveduras e para bactérias, foi diluído 1:10 para obter uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL.

As amostras foram pesadas e diluídas em uma solução aquosa de DMSO 10% até a concentração de 2 mg/mL. Em seguida, usando uma placa de Elisa, foram adicionados 100 µL de meio de cultura na concentração dobrada, 100 µL de cada amostra teste na concentração de 2 mg/mL, em triplicata, na primeira fileira da placa. O teste foi acompanhado por 24 horas. Após

este tempo, foram adicionados 10 µL do revelador 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) a 1% e, foram considerados como resultados positivos os poços que não adquiriram a cor lilás após a adição do revelador.

3 Resultados e Discussão

3.1 Rendimento dos extratos

O meio líquido fermentado foi extraído com acetato de etila e, após eliminar o solvente, obteve-se o extrato bruto e o rendimento apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos brutos obtidos no cultivo de diferentes fungos *Penicillium* spp.

Fungo	Meio de cultivo	Massa (mg)	Rendimento (%)
<i>P. oxalicum</i>	ISP ₂	56,4	0,01
	YES	405,8	0,07
	BDL	132,8	0,02
	SB	105,8	0,02
<i>P. citrinum</i>	ISP ₂	75,8	0,01
	YES	320,0	0,05
	BDL	130,0	0,02
	SB	132,3	0,02
<i>P. citreonigrum</i>	ISP ₂	76,2	0,01
	YES	280,2	0,05
	BDL	120,3	0,02
	SB	110,0	0,02

BDL – Batata Dextrose extrato de levedura; SB – Sabouraud; ISP₂ - International Streptomyces Project 2 e YES – Extrato de levedura sacarose.

Conforme pode ser observado na tabela 1, os maiores rendimentos foram os obtidos a partir do fungo cultivado em meio YES. Segundo relatos encontrados na literatura, a obtenção de biomassa e extrato fúngico está diretamente relacionada a disponibilidade e tipo de fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultura (Dutton & Evans, 1996). Devido a presença da sacarose no meio YES, podemos inferir que as vias metabólicas foram estimuladas de maneira mais intensa do que nos meios que contém somente glicose o que resultou em um maior rendimento de extrato. Vale ressaltar que uma das vias metabólicas mais estimuladas ao longo do desenvolvimento do fungo é a das policetídeos sintases (PKS) que podem levar a biossíntese de compostos aromáticos polihidroxilados, compostos alifáticos oxigenados e ácidos graxos de importância biológica (Kleinkauf & Dohren, 1996; Sacido & Genilloud, 2002).

3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos extratos de *Penicillium* spp

3.2.1 *Penicillium oxalicum*

Os valores da CIM observados para os extratos de *P. oxalicum* que apresentaram atividade antimicrobiana igual ou menor que 1000 µg/mL, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores da CIM para os extratos de *P. oxalicum*.

Meio de Cultivo	Tipo de extrato	Patógeno	Concentração (µg/mL)
BDL	MeOH	<i>C. albicans</i>	1000

BDL	Acoet	<i>C. albicans</i>	500
ISP ₂	Acoet	<i>C. albicans</i>	1000
BDL	MeOH	<i>C. tropicalis</i>	1000
YES	Acoet	<i>C. tropicalis</i>	1000
ISP ₂	Acoet	<i>C. tropicalis</i>	1000
BDL	Aq	<i>C. tropicalis</i>	1000
ISP ₂	Aq	<i>C. tropicalis</i>	1000
YES	MeOH	<i>E. faecalis</i>	1000
BDL	Acoet	<i>S. aureus</i>	250

BDL – Batata Dextrose extrato de levedura; SB – Sabouraud; ISP₂ - International Streptomyces Project 2 e YES – Extrato de levedura sacarose; Acoet – Acetato de Etila; MeOH – Metanol e Aq – Aquoso.

Conforme pode ser observado na tabela acima, diversos extratos apresentaram CIM antimicrobiana de 1000 µg/mL principalmente para as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, porém, pode-se destacar que os extratos obtidos a partir do cultivo do *P. oxalicum* em BDL frente à *C. albicans* e *S. aureus* apresentaram CIM de 500 e 250 µg/mL, respectivamente.

Este resultado revela o elevado potencial dos compostos químicos produzidos por esta espécie para estudos envolvendo a prospecção da atividade antimicrobiana. Ao consultar a literatura, constatou-se que as pesquisas envolvendo o *P. oxalicum* estão concentradas na obtenção de pigmentos (YAO, et al., 2016), prospecção enzimática de amilases (Pi, et al., 2020), celulasas (Bomtempo, et al., 2017), hemicelulasas (Song, et al., 2016) quitinases (Rodríguez, Copa-Patiño, & Pérez-Leblic, 1995) e pectinases (Kumar & Suneetha, 2021).

Com relação aos compostos químicos isolados de *P. oxalicum*, foram encontrados estudos nos quais foram determinadas as estruturas do ácido secalônico D (Steyn, 1970), oxalina (Nagel, et al., 1974), citrinalinas (Pimenta, 2011), meleagrina (Pimenta, 2011), hidroxiantraquinona (Arpink Red) (, Velmurugan, Dufossé, Devi, & Ravi, 2020), hamisonina (Seetharaman, et al., 2017) dentre outros compostos orgânicos.

Este organismo é alvo de estudos sobre a degradação de biomassa (Yang, et al., 2011), seleção de compostos com atividade anticâncer (Iwaguchi, et al., 1980), substâncias utilizadas como suplementos alimentares (Itoh, et al., 1986), biodiversidade (Jayashree & Wesely, 2019) e biorremediação (Kothari, et al., 1998).

3.2.2 *Penicillium citrinum*

Ao observar a CIM dos extratos de *P. citrinum* obtidos do cultivo em diferentes meios de cultura, obteve-se os valores apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores da CIM para os extratos de *P. citrinum*.

Meio de Cultivo	Tipo de extrato	Patógeno	Concentração (µg/mL)
SB	Acoet	<i>C. albicans</i>	62,5
BDL	Acoet	<i>C. albicans</i>	1000
SB	Acoet	<i>C. tropicalis</i>	500

BDL – Batata Dextrose extrato de levedura e SB – Sabouraud; I; Acoet – Acetato de Etila; MeOH.

Após testar os extratos contra diferentes bactérias e leveduras patogênicas, observou-se uma maior especificidade de inibição de crescimento para as leveduras. E dentre os resultados observados na tabela 2, pode-se destacar a CIM de 62,5 e 500 µg/mL do extrato obtido em meio SB. De acordo com a literatura, da Silva e colaboradores (2010) avaliaram, de

forma qualitativa diversos fungos, oriundos de um acervo, quanto a sua atividade antimicrobiana frente a diversos patógenos. Os resultados obtidos por eles foi que o *P. citrinum* foi capaz de inibir o crescimento da *C. albicans*. Este resultado corrobora o que foi observado no presente estudo, no entanto, é importante resaltar que conforme a metodologia descrita no item 2.3, fomos capazes de quantificar o potencial antimicrobiano e não somente observá-lo.

Dos metabólitos secundários obtidos de *P. citrinum*, os mais relevantes são a citrinina (Hetherington & Raistrick, 1931) e seus derivados como a penicitrina, penicitol, descarboxidihidrocitrinina (Wakana, et al., 2006), dicitrinina (Clark, et al., 2006), alcalóides quinocitrinina (Kozlovsky, et al., 2003), citrinolactonas (Kuramata, et al., 2007) e citrinadina (Tsuda, et al., 2004). Outros compostos como a esclerotinina C (Kuramata, et al., 2007) chamam atenção devido a sua capacidade de regular o crescimento de plantas. Também o ácido tanzawáico (Makoto, et al., 1997) e quinolactacinas (Kim, Song, & Yoo, 2001) são relevantes pois, apresentam um potencial de inibir tanto a produção do ânion superóxido como a atividade enzimática de acetilcolinesterase.

A literatura reporta que o *P. citrinum* é estudado quanto ao seu potencial de sintetizar enzimas como amilase e proteases (Junior, et al., 2021), celulasas, tais como endoglicanases e β -glicosidases (Pimentel, 2014), xilanases (Maravilla, et al., 2017), produção de suplementos alimentares (Florencio, 2014) e como biocatalisador de reações químicas (Ferreira, 2016). Essas informações chamam atenção pois, mostram outros processos que podem ser exploradas pelos membros do presente estudo utilizando o *P. citrinum*.

3.2.3 *Penicillium citreonigrum*

No presente estudo foram avaliados os extratos de *P. citreonigrum* quando cultivados em meios de cultura diferentes. O valor da CIM dos extratos que apresentaram atividade de inibição de crescimento frente a bactérias patogênicas, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores da CIM para os extratos de *P. citreonigrum*.

Meio de Cultivo	Tipo de extrato	Patógeno	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
SB	MeOH	<i>C. albicans</i>	1000
ISP ₂	Acoet	<i>C. tropicalis</i>	1000
YES	Acoet	<i>C. tropicalis</i>	1000

SB – Sabouraud; ISP₂ - International Streptomyces Project 2 e YES – Extrato de levedura sacarose; Acoet – Acetato de Etila e MeOH – Metanol.

Conforme pode ser observado na tabela acima, foi determinado que a CIM dos extratos de *P. citreonigrum* foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ somente para as leveduras patogênicas *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em consulta a literatura, não foram encontrados relatos sobre a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir do cultivo de *P. citreonigrum*. Dessa maneira, o presente estudo contribui para o aumento do conhecimento sobre a prospecção da atividade fúngica dos compostos químicos de *P. citreonigrum*.

Dos compostos químicos de *P. citreonigrum*, descritos na literatura, destaca-se a Citreoviridina. Trata-se de uma micotoxina com potencial neuro e cardiotoxico, isolada pela primeira vez em 1940 a partir de investigações de beribéri cardíaco em jovens japoneses que consumiam arroz mofado ou arroz amarelo. Outras avaliações toxicológicas sobre este composto

mostram que ele causa paralisia dos membros, convulsões, falência respiratória e uma cardiomiopatia conhecida como doença de Keshan (Almeida, et al., 2012; da Rocha, 2013).

Outras substâncias provenientes de *P. citreonigrum* foram descritas no estudo realizado por Wang e colaboradores (2010). Em seu trabalho foram obtidas azafilonas, pencolídeos, terpenos e atlantinonas pelo estímulo de vias metabólicas silenciadas com a substância 5-azacitidina.

Outros estudos envolvendo o *P. citreonigrum* revelam seu potencial em produzir compostos prebióticos como os frutooligossacarídeos através de reações enzimáticas mediadas pela β -frutofuranosidase. Estes oligossacarídeos, quando consumidos regularmente, previnem infecções intestinais, reduzem a chance de ocorrência de câncer de cólon, diminuem o colesterol e melhoram a absorção de nutrientes pelo intestino (do Nascimento, et al., 2016).

A literatura reporta trabalhos em que o *P. citreonigrum* apresenta um potencial para estudos envolvendo biorremediação, devido seu potencial em degradar hidrocarbonetos (Lima, et al., 2015), monitoração da qualidade do ar como serviço de saúde pública (Espinosa, et al., 2020) e indução metabólica (de Oliveira, 2019).

4. Considerações Finais

Conforme relatado no presente estudo, a maioria dos extratos em acetato de etila oriundos do cultivo dos fungos *P. oxalicum*, *P. citreonigrum* e *P. citrinum* em meios de cultura específicos, apresentaram atividade antimicrobiana, com maior seletividade, para os patógenos *C. albicans* e *C. tropicalis* em concentrações que variam de 1000 $\mu\text{g/mL}$ à 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Vale ressaltar que os extratos de *P. oxalicum*, obtidos YES e BDL, foram os únicos que apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos *E. faecalis*, 1000 $\mu\text{g/mL}$, e *S. aureus*, 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Considerando os resultados expressivos de CIM dos extratos em acetato de etila de *P. oxalicum* e *P. citrinum* cultivados respectivamente em BDL e SB, serão realizados experimentos de HPLC-MS/MS para a determinação do perfil químico e caracterização dos compostos químicos dessas amostras em estudos posteriores.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer as instituições Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane – FioCruz Amazonas e Universidade do Estado do Amazonas pela infraestrutura e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

O presente estudo foi financiado com recursos oriundos das instituições financeira Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. Este trabalho é parte da tese de doutorado de Paulo Alexandre Lima Santiago (Universidade Federal do Amazonas - 2022).

Referências

- Almeida, M. I., Almeida, N. G., Carvalho, K. L., Gonçalves, G. A., Silva, C. N., & Santos, E. A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*.
- Azevedo, E., & Barata, M. (2018). Diversidade no reino Fungi e aplicações na indústria. *Revista de Ciência Elementar*, 6(4).
- Bomtempo, F. V., Santin, F. M., Pimenta, R. S., de Oliveira, D. P., & Guarda, E. A. (2017). Production of cellulases by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation using agroindustrial substrates. *Acta Scientiarum*, pp. 321-329.
- Bon, E. P. S; Ferrara, M. A; Corvo, M. L.(2008). Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência.
- Calixto, C. M., & Cavalheiro, É. T. (2012). Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico. *Química nova na escola*, 34(3), 118-123.
- Cardoso, E. J. B. N; Andreote, F. D. (2016). Microbiologia do solo. Piracicaba: ESALQ.
- Clark, B. R., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., & Gill, J. H. (2006). Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. *Organic & Biomolecular Chemistry*.
- da Rocha, M. W. (2013). *Produção, purificação e caracterização espectrométrica da micotoxina citreoviridina produzida pelo penicillium citreonigrum em meio de cultura yes (yeast extract sucrose)*. Brasília: Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.
- da Silva, J. C., Fernandes, O. C., Martins, M. d., Rodrigues Jr, A. d., & Teixeira, M. F. (2010). Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- de Lima, A. K., Ribeiro, J. S., de Souza, I. d., Rodrigues, J. C., de Souza, T. C., Maia, C. R., & Fernandes, O. C. (2017). Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: potencial patogênico. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 12(6), 1017-1024.
- de Oliveira, G. P. (2019). *Indução metabólica de fungos filamentosos pelas técnicas de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética: produção de metabólitos secundários com atividade neuroprotetora*. Belo Horizonte: Tese de doutorado em Química da Universidade Federal de Minas Gerais.
- do Nascimento, A. K., Nobre, C., Soares, M. T., Teixeira, J. A., & Porto, A. L. (2016). XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. *Síntese de frutooligosacarídeos a partir da β frutofuranosidase obtida de *Penicillium citreonigrum* URM 4459*. Fortaleza, Ceará, Brasil.
- Dutton, M. V., & Evans, C. S. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, pp. 881-895.
- Espinosa, K. C., Chávez, M. A., Ramírez, I. P., Flores, T. I., & Rodríguez, M. J. (2020). Diversidad fúngica en la atmósfera de la habana (cuba) durante tres períodos poco lluviosos. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
- Ferreira, I. M. (2016). *Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise*. São Carlos: Tese de Doutorado em Ciências da Universidade de São Paulo.

Florencio, M. (2014). *Estudo da produção e aplicação da enzima extracelular nuclease p1 do fungo Penicillium citrinum thom 1131 ATCC 14994*.

Gonçalves, F. J., Freire, F. d., & Lima, J. L. (2013). Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. *Essentia*, 15(1), 71-92.

Guimarães, D. O. (2010). *Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "Caenorhabditis elegans"*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5.

Hetherington, A. C., & Raistrick, H. (1931). On the Production and Chemical Constitution of a New Yellow Colouring Matter, Citrinin, Produced from Glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*.

Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44, 117-133.

Huang, J. N., Zou, Q., Chen, J., Xu, S. H., Luo, D., & Zhang, F. G. (2018). Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, *Penicillium citreonigrum* SP-6. *Phytochemistry Letters*, 27, 114-118.

Itoh, Y., Shimura, S., Yasuda, H., Shitoh, T., & Yamano, T. (1986). Isolation and identification of I-kestose produced from sucrose by fructose-transferring enzyme of *Penicillium oxalicum*. *Nippon Shokuhin Gakkaishi*, pp. 831-834.

Iwaguchi, T., Kitagawa, H., Hirose, K., Ishida, T., & Yamamoto, T. (1980). 5-di-(2'-tetrahydropyranyl) secalonic acid d as a new antibiotic derivative with anticancer activity. *Gann*.

Jayashree, M., & Wesely, E. G. (2019). The Impact of Weather on the Fungal Abundance and Richness in Sorghum Grains in Selected Districts of Tamil Nadu, India. *Infokara research*.

Junior, G. P., da Silva, K. N., Santiago, P. A., Santiago, S. R., Ohse, K. O., Martim, S. R., & de Aquino, P. F. (2021). prospecção enzimática e atividade antimicrobiana de espécies de *penicillium* isoladas do bioma amazônico. *Brasilina Journal of Development*.

Kim, W. G., Song, N. K., & Yoo, I. D. (2001). Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. *The journal of antibiotics*.

Kleinkauf, H., & Dohren, H. V. (1996). A nonribosomal System of Peptide Biosynthesis. *European journal of biochemistry*, pp. 335-351.

Kothari, I. L., Choksi, P. C., Patel, H. B., & Udhaya, J. (1998). Biodregadation of 2,4 - D by *Penicillium*. *Recent Advances in Ecobiological Research*.

Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V., Adanin, V. M., Ozerskaya, S. M., Kochkina, G. A., Gräfe, U. (2003). Quinocitrinines A and B, new quinoline alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a permafrost fungus. *The journal of antibiotics*.

Kumar, P. G., & Suneetha, V. (2021). Microbial pectinases: Wonderful enzymes in fruit juice clarification. *International Journal of MediPharm Research*, pp. 12-20.

Kuramata, M., Fujioka, S., Shimada, A., Kawano, T., & Kimura, Y. (2007). Citrinolactones A, B and C, and Sclerotinin C, plant growth regulators from *Penicillium citrinum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.

Lima, J. M., Pereira, J. O., Costa Neto, P. Q., Batista, I. H., Santos, J. C., Araújo, S. P., Azevedo, J. L. (2015). Avaliação de fungos endofíticos e epifíticos com potencial para produção de biossurfactantes, isolados de macrófitas aquáticas do rio Negro em Manaus, Amazonas. Em L. A. Oliveira, O. C. Fernandes, M. A. Jesus, J. L. Bentes, S. L. Andrade, A. Q. Souza, & C. Santos, *Diversidade Microbiana da Amazônia*. Editora INPA.

Makoto, K., Kaoru, Y., Mayumi, S., Kazunaga, Y., Hirokazu, A., Tomoyuki, O., & Daisuke, U. (1997). Tanzawaic Acids A, B, C, and D: Inhibitors of Superoxide Anion Production from *Penicillium citrinum*. *Chemistry Letters*.

Maravilla, M. P., Romo, M. A., Navarro, K. G., Sánchez, J. E., & Delgado, L. A. (2017). Cellulases and xylanases production by *Penicillium citrinum* cgetcr using coffee pulp in solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, pp. 757-769.

Molinari, G. (2009). Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. *Pharmaceutical Biotechnology*, 655, 13-27.

Nagel, D. W., Pachler, G. R., Steyn, P. S., Wessels, P. L., Gafner, G., & Kruger, G. J. (1974). X-Ray structure of oxaline: a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 1021-1022.

NCCLS. (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition, NCCLS document M2-A8*. The National Committee for Clinical Laboratory Standards., 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania.

Pi, C., Zhang, Z., Xiang, B., Tian, H., Liao, Q., Chen, Y., Hu, S. (2020). Constructing a novel expression system by specific activation of amylase expression pathway in *Penicillium*. *Microbial Cell Factories*.

Pimenta, E. P. (2011). *Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos Penicillium citrinum e Penicillium oxalicum*. São Carlos.

Pimentel, P. S. (2014). *Caracterização de enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo filamentoso penicillium citrinum*. manaus: dissertação do programa multi-institucional de pós-graduação em biotecnologia da universidade federal do Amazonas.

Pitt, J. I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press.

Rodríguez, J., Copa-Patiño, J. L., & Pérez-Leblic, M. L. (1995). Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Letters in Applied Microbiology*, pp. 46-49.

Sacido, A. A., & Genilloud, O. (2002). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I System in Actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene surveys. *Environmental microbiology*, pp. 10-24.

Seetharaman, P., Gnanasekar, S., Chandrasekaran, R., Chandrakasan, G., Syed, A., Hodhod, M., Sivaperumal, S. (2017). Isolation of limonoid compound (Hamisonine) from endophytic fungi *Penicillium oxalicum* LA-1 (KX622790) of *Limonia acidissima* L. for its larvicidal efficacy against LF vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Science Pollution Research*, pp. 21272-21282.

Song, W., Han, X., Qian, Y., Liu, G., Yao, G., Zhong, G., & Qu, Y. (2016). Proteomic analysis of the biomass hydrolytic potentials of *Penicillium oxalicum* lignocellulolytic enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*.

Steyn, P. S. (1970). The isolation, structure and absolute configuration of secalononic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron*, pp. 51-57.

Thomaz, S. M. (2009). O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. Maringá, PR. Nupélia.

Tsuda, M., Kasai, Y., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., Mikami, Y., & Kobayashi, J. (2004). Citrinadin A, a Novel Pentacyclic Alkaloid from Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Organic Letters*.

Venil, C. K., Velmurugan, P., Dufossé, L., Devi, P. R., & Ravi, A. V. (2020). Fungal Pigments: Potential Coloring Compounds for Wide Ranging Applications in Textile Dyeing. *Jornal of Fungi*.

Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Okada, K., Tabaki, G. M., Yaguchi, T., Kawai, K. (2006). New citrinina derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Medicines*.

Wang, X., Filho, J. S., Hoover, A. R., King, J. B., Ellis, T. K., Powell, D. R., & Cichewicz, R. H. (2010). Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of Natural Products*.

Yang, Z., Kang, H., He, X., Zhuang, G., Zhang, H., & Bai, Z. (2011). Microbial degradation and utilization of lignocellulosic biomass pyrolysis oil. *Second International Conference on Mechanic Automation and Control Engineering*, pp. 7457-7459.

Yao, G., Gao, L., Wu R., Kan, Q., Liu, G., & Qu, Y. (2016). Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, pp. 73-86.

Yuan, W. H., Wei, Z. W., Dai, P., Wu, H., Zhao, Y. X., Zhang, M. M., Zheng, W. F. (2014). Halogenated Metabolites Isolated from *Penicillium citreonigrum*. *Chemistry & Biodiversity*, 11.

Yuan, W. H., Zhang, Y., Zhang, P., & Ding, R. R. (2017). Antioxidant Sesquiterpenes from *Penicillium citreonigrum*. *Natural Product Communications*, 12(12), 1827-1829.

Capítulo II

Caracterização dos compostos químicos de fungos *Penicillium* spp. isolados no Amazonas

Caracterização dos compostos químicos de fungos *Penicillium* spp. isolados em ambiente aquático no interior do Amazonas.

O presente capítulo está relacionado aos dois últimos objetivos desta tese. Foi elaborado um manuscrito em língua portuguesa que, posteriormente será traduzido para o inglês. Pretende-se submeter este trabalho no periódico Química Nova, Qualis A4 após considerações da banca e eventuais análises complementares. Procurou-se colocar este capítulo no formato da revista pretendida.

Paulo Alexandre Lima Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: psantiago@uea.edu.br

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>

Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Brasil

E-mail: srhaquel@hotmail.com

Priscila Ferreira de Aquino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2344-0493>

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas, Brasil

E-mail: priscila.aquino@fiocruz.br

Sergio Massayoshi Nunomura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8919-9225>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: smnunomu@inpa.gov.br

Rita de Cássia Saraiva Nunomura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1119-7238>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: ritasnunomura@gmail.com

Resumo

Fungos do gênero *Penicillium* desempenham um importante papel ecológico como decompositores e são encontrados em vários ambientes terrestres e aquáticos. Destes organismos são obtidos compostos bioativos de elevada relevância química e biotecnológica de várias classes químicas como terpenos, alcaloides e policetídeos com atividades antiviral, citotóxica e antimicrobiana. Em estudos posteriores, cultivou-se as linhagens *P. purpurogenum*, *P. citrinum* e *P. oxalicum* nos meios BDL, YES, ISP₂ e Sabouraud. Após o cultivo, foram elaborados os extratos a partir do caldo e, em seguida determinou-se a concentração inibitória mínima da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Após a determinação da CIM, destacaram-se os extratos em *P. purpurogenum*, *P. citrinum* e *P. oxalicum* em SB. Sendo assim, visando contribuir com o conhecimento sobre os compostos químicos das linhagens de *Penicillium* spp isoladas no interior do Amazonas, o presente estudo buscou caracterizar os compostos das frações dos extratos de *P. purpurogenum*, *P. citrinum* e *P. oxalicum* cultivados em SB que apresentaram atividade antimicrobiana. Para alcançar esse objetivo, os extratos foram fracionados em coluna aberta com sílica C18 com gradiente de MeOH/H₂O de 10%, 50% e 100%. Em seguida as frações foram submetidas a análises de UPLC-MS/MS, os dados obtidos foram processados e comparados com a literatura. Através dos indícios obtidos na literatura, estabeleceu-se que os compostos pertencem a classe dos terpenos, policetídeos, oleamidas, benzofenonas e alcaloides revelando com isso o potencial dos *Penicillium* spp para obtenção de compostos com elevada importância química e biotecnológica.

Palavras-chave: *P. purpurogenum*, *P. citrinum*, *P. oxalicum*, antimicrobiano e metabólitos secundários.

1 Introdução

Pertencentes ao filo ascomycota, os fungos *Penicillium* spp. são um dos mais explorados quanto ao seu potencial químico e biotecnológico devido à produção de compostos bioativos como a penicilina, que revolucionou o tratamento de doenças de origem bacteriana desde a sua descoberta em 1929 (Yadav, et al., 2018; Park, et al., 2019). Desde então, os fungos *Penicillium* spp são estudados na busca de metabólitos secundários de várias classes químicas como policetídeos, alcaloides, terpenos e quinonas (Canuto, et al., 2012). Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas tais como antitumoral, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana (Calixto & Cavaleiro, 2012; Xue, et al., 2014). Vale ressaltar que em muitas situações, os compostos obtidos a partir dos fungos podem ser inéditos pois, alterações no cultivo causam microalterações no metabolismo fúngico através do estímulo de regiões genicas silenciadas e isso aumenta a possibilidade de obtenção com novos compostos bioativos (Keller, Turner, & Bennett, 2005).

A caracterização de metabólitos secundários de fungos não é uma tarefa simples, pois seus extratos apresentam um elevado grau de complexidade (Pastre, et al., 2007). Logo, uma estratégia para a separação e identificação destes compostos é a combinação das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas (Castrillo, Hayes, Mohammed, Gaskell, & Oliver, 2003) pois, ao passo que a separação dos compostos químicos presentes em uma amostra ocorre na coluna cromatográfica, o espectrômetro de massas fornece dados para predição das estruturas químicas presentes na matriz de análise (Thomas, 2001; Chaimbault, 2014). Com relação à aplicação dessas técnicas, Frisvad e colaboradores (1987) descreveram mais de 350 metabólitos de fungos utilizando HPLC-DAD. Utilizando LC-MS/MS, Rundberget e Wilkins (2002) determinaram a presença das micotoxinas ácido micofenólico, griseofulvina, roquefortina, quetoglobosina B, verruculogênio e penitrem A em *Penicillium* sp. Utilizando os padrões fornecidos pela literatura e os dados experimentais de LC-MS/MS dos metabólitos secundários de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum* e outras linhagens, Rasmussen e colaboradores (2010) identificaram 19 compostos sem a necessidade de isolamento das substâncias. Em outro estudo Goes (2021) identificou 16 substâncias de *P. chrysogenum* baseando-se nos dados da literatura e em dados obtidos por LC-MS/MS.

Em estudo posterior, foram determinadas as atividades antimicrobianas dos extratos de fungos *Penicillium* spp (Santiago, 2022) isolados em uma comunidade do interior do Amazonas (de Lima, 2017). Dentre os organismos testados, destacaram-se o *P. citrinum* e *P. oxalicum* cultivados em meio BDL e SB. Sendo assim, sabendo do potencial biológico e químico dos fungos do gênero *Penicillium*, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração mínima inibitória dos extratos de *P. purpurogenum*, cultivado em diferentes meios, e caracterizar os compostos presentes nas frações dos extratos de *P. citrinum*, *P. oxalicum* e *P. purpurogenum* em SB através de UPLC-MS/MS.

2. Metodologia

2.1 Procedimentos gerais

Todo material utilizado em procedimentos envolvendo microrganismos foi esterilizado em autoclave vertical (Prismatec). A água destilada utilizada ao longo do estudo foi obtida em destilador Quimis (Q341-25). A manipulação e inóculo das linhagens foi realizado em cabine de Segurança Biológica Esco (Infinity® Class II). O cultivo ocorreu em incubadora DBO (Tecnal, Te-371). Após o tempo de cultivo, o caldo e o micélio foram separados em sistema de filtração (Filtrilo, SDF-1) e, o caldo foi extraído com acetato de etila (Synth grau PA) e o micélio foi macerado em metanol (Synth grau PA). Ao termino da extração, o solvente foi eliminado em rotaevaporador (Fisatom 802) equipado com bomba de vácuo (Prismatec 131) e por fim, a massa foi determinada em balança analítica (Shimadzu AY220).

2.2 Linhagens fúngicas e cultivo em escala laboratorial

As linhagens de *P. citrinum* (CFAM – 47), *P. oxalicum* (CFAM – 1311) e *P. purpurogenum* (CFAM – 214) foram cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane sendo provenientes de ambientes aquáticos amazônicos conforme estudo realizado por Lima e colaboradores (2017).

Foram inoculados 50 µL de uma suspensão de esporos na concentração 1×10^{-6} UFC/mL em diferentes erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido com as seguintes proporções: BDL (Batata – Dextrose - Extrato de Levedura) – Batata 200 g/L, Dextrose 20 g/L e Extrato de Levedura 4 g/L; YES (Extrato de levedura – Sacarose)–Sacarose 150 g/L e Extrato de Levedura 20 g/L; ISP₂ (International Streptomyces Project 2) – 10 g/L de Amido, 4 g/L de Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose e 4 g/L de Malte; Sabouraud –20 g/L de Glicose e 10 g/L de Peptona. O cultivo foi realizado em triplicata ao longo de 15 dias à 28 °C. Após o tempo de cultivo o material cultivado

foi filtrado em sistema a vácuo. O caldo de cultivo obtido foi submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila. Após a eliminação do solvente, foram pesados 2 mg dos extratos para determinação da CIM da atividade antimicrobiana.

2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antimicrobiana dos extratos

Para determinação da CIM da atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas - *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), gram-negativas - *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC-10231) e *Candida tropicalis* (ATCC-13803). O teste foi realizado em placa de Elisa conforme estabelecido pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS (2003) adaptado por Santiago et al. (2022). Foi utilizado como controle positivo a amoxicilina para bacterias e itraconazol para as leveduras. Para o controle negativo utilizou-se água destilada autoclavada.

2.4 Semi-purificação das amostras e análises de UFLC-MS/MS

Para a semi-purificação, foram solubilizados 200 mg dos extratos em solução de 5% MeOH/Água (Merck/Millipore, Bedford, MA, USA) e em seguida foram submetidas à semi-purificação em coluna de bancada contendo 5 g sílica C18 (Fluka Analytical, 100 Å) com gradiente de MeOH/H₂O de 10%, 50% e 100%.

Após secagem, as frações foram diluídas à 1 mg/mL, em MeOH – HPLC, e analisadas em cromatógrafo líquido modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A equipado com coluna Kinetex (Cote-Shell) C18 150 x 2,1 mm (100 Å, 2,6u) acoplado a um espectrômetro de massas Brucker Daltonics, modelo Amazon Speed Ion trap, Fonte ESI operando em modo positivo e negativo. O método utilizado foi um gradiente de 20-100% de B ao longo de 24 min em um fluxo de 1 ml/min. Quando possível, foram realizadas análises em espectrômetro de massas de alta resolução Brucker Daltonics, Modelo MicroTOF-QII, Fonte ESI em modo positivo e negativo, 17500 FWHM.

3 Resultados e Discussão

3.1 Rendimento dos extratos e CIM

A massa dos extratos de *P. purpurogenum* registrada no presente estudo foi de BDL = 140 mg, YES = 380 mg, ISP₂ = 85 mg e SB = 200 mg. Com relação a CIM dos extratos, destacam-se os obtidos no cultivo em SB, ISP₂ e YES pois apresentaram atividade contra o patógeno *C. albicans* de 31,25 µg/mL, 500 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente. As demais atividades observadas foram dos extratos em SB contra *C. tropicalis* (CIM = 250 µg/mL), *P. aeruginosa* (CIM = 1000 µg/mL), *S. aureus* (CIM = 125 µg/mL) e *E. faecalis* (CIM = 500 µg/mL). Em trabalho realizado anteriormente por Santiago et al. (2022) sobre a atividade antimicrobiana de extratos de fungos do gênero *Penicillium*, foi possível determinar a quantidade, o rendimento e a CIM de cada extrato obtido no cultivo do *P. citrinum* e *P. oxalicum* em diferentes meios de cultura e, com relação a CIM dos extratos de *P. citrinum* testados, destaca-se o obtido em SB com atividade na concentração de 62,5 µg/mL e 500 µg/mL contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. O resultado mais relevante para a CIM dos extratos de *P. oxalicum* foi na concentração de 500 µg/mL contra *C. albicans* do extrato obtido em caldo BDL.

O consenso vigente na literatura é que os fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela sua capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos bioativos (Arnold, 2007). Cerca de 30% dos metabólitos bioativos com propriedades antifúngicas e antibacterianas comercializados pela indústria farmacêutica são provenientes dos fungos do gênero *Penicillium* (Suryanarayanan, et al., 2009). Do ponto de vista químico e biotecnológico, o uso destes organismos como fonte de metabólitos bioativos é vantajoso pois, crescem em substratos de baixo custo, e uma vez isolados e conservados estão disponíveis a todo instante. Além disso, a manipulação dos seus genes é menos complexa quando comparada à organismos superiores (Mueller & Schmit, 2007).

Mesmo sendo organismos amplamente explorados, determinados estudos buscam novos compostos bioativos alterando certos parâmetros do processo fermentativo, dentre eles as condições de cultivo e fontes nutricionais que compõem o meio de cultivo (Martín, Casqueiro, & Liras, 2005; Khaldi, et al., 2010; Romano, 2018). Essas mudanças podem interferir diretamente no tipo ou qualidade dos metabólitos secundários obtidos pois, influenciam diretamente em *clusters* responsáveis por codificar enzimas biossintéticas e proteínas regulatórias o que ocasionam na ativação ou inibição de determinadas vias metabólicas (Keller et al., 2005; Fill, et al., 2016). Diante dos resultados observados, os extratos obtidos no cultivo de *P. purpurogenum*, *P. citrinum* e *P. oxalicum* em SB, apresentaram expressivas atividades antimicrobianas logo, buscou-se fracionar e caracterizar os compostos químicos dessas amostras.

3.2 Caracterização dos compostos químicos dos extratos de *Penicillium* spp

3.2.1 Rendimento das frações

Após o procedimento de semi-purificação dos extratos do caldo em SB em coluna aberta, usando um gradiente crescente de MeOH/H₂O sob pressão reduzida em fase reversa, obteve-se as frações e massas apresentadas na figura 33.

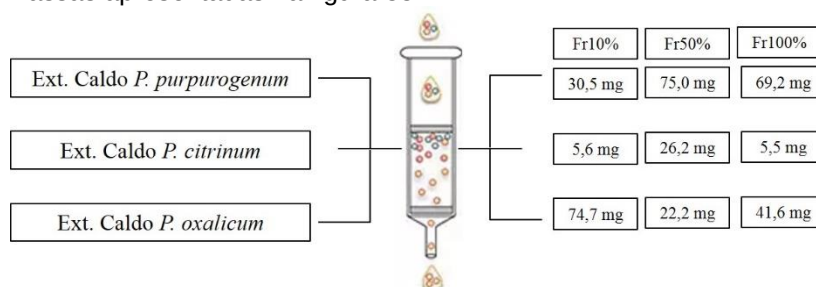


Figura 79: Procedimento de fracionamento dos extratos de *Penicillium* spp

Os valores das massas das frações obtidas no presente estudo, estão de acordo com o observado na literatura para estudos que utilizaram linhagens de *Penicillium* spp e meios de cultura similares (Pastre, et al., 2007; Guimarães, et al., 2019). Para caracterizar os compostos químicos das frações, foram utilizados os dados provenientes de procedimentos de UPLC-MS/MS.

3.2.2 *Penicillium purpurogenum*

Os espectros de massa em ESI modo positivo das frações revelaram a presença dos íons majoritários de m/z 401, 379, 282, 305 e 223 e estas massas foram comparadas com os dados da literatura. No espectro MS/MS em ESI(+) do íon $[M+H]^+$ m/z 401 apresentado na figura 34A, observam-se duas perdas subsequentes da molécula de água (-36 Da, m/z 401 $\rightarrow$ 365). Com base no padrão de fragmentação, em dados de HRMS-ESI (+) (m/z 401,2686, C₂₅H₃₇O₄) e apoiado em estudo realizado por (Narita, 2018) sugere-se que, este composto trata-se de um análogo da oflobolina C (figura 34B).

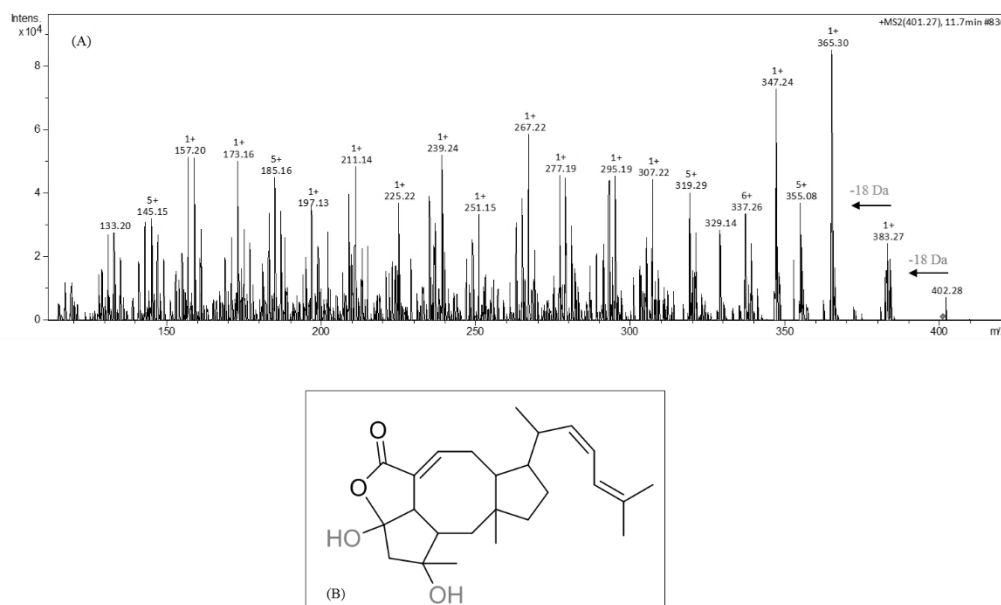


Figura 82: A - Espectro de MS/MS do íon m/z 401. B – Análogo Oflobolina C.

As oflobolinas são sesterpenos pertencentes a família dos terpenóides (Liu, et al., 2007) e, os compostos pertencentes a esta família são um dos principais metabólitos secundários produzidos por plantas e microrganismos (Roberts, 2007). O primeiro membro dos sesterpenos de origem fúngica foi a Ofiobolina A, isolada do fungo patogênico *Bipolaris oryzae* em 1957 (Nozoe, et al., 1965). Desde então foram descritas cerca de 50 ofiobolinas de origem natural sendo grande parte oriunda de fungos do gênero *Bipolaris* e *Aspergillus* (Au, Chick, & Leung, 2000; Ding, et al., 2020). No entanto segundo Narita (2018) organismos pertencentes aos gêneros *Emericella* spp e *Penicillium* spp são plenamente capazes de biossintetizar sesterpenos.

Sobre a biossíntese de sesterpenoides em fungos, a literatura relata que o processo é provavelmente mediado pela enzima sesterpeno sintase (Chiba, et al., 2013) e inicialmente ocorre uma ligação cabeça calda de cinco unidades de isopreno seguida de ciclização sequencial de difosfato de geranilfarnesil finalizando com oxidações que ocorrem em vários locais ao longo do esqueleto tricíclico (Au, Chick, & Leung, 2000). É comum que os sesterpenoides, como as ofiobolinas, apresentem diferentes cadeias oleofínicas laterais e isto proporciona uma vasta diversidade estrutural para estas substâncias (Cai, et al., 2019). Do ponto de vista biológico, a diversidade estrutural das ofiobolinas contribui para a ocorrência de atividades como nematocidas (Tsipouras, et al., 1996), herbicidas (Evidente, et al., 2006), citotóxicas (Zhang, et al., 2012), antifúngica (Li, et al., 1995) e antibacteriana (Liu, et al., 2013). Conforme exposto, o composto oflobolina C, caracterizado no presente estudo, provavelmente é o responsável pela atividade antimicrobiana contra *C. albicans* observada no extrato de *P. purpurogenum* em meio SB.

No espectro MS/MS em ESI (+) do íon $[M+H]^+$ m/z 379 apresentado na figura 35A, observam-se uma perda água (-18 Da, m/z 479 $\rightarrow$ 361) e outra de 15 Da (m/z 361 $\rightarrow$ 346). Com base na fragmentação, e em dados de HRMS-ESI (+) (m/z 379.1540, $C_{23}H_{23}O_5$) e apoiado em estudo realizado por (Wakana, et al., 2006) sugere-se que, este composto trata-se da Penicitrona B (figura 35B).

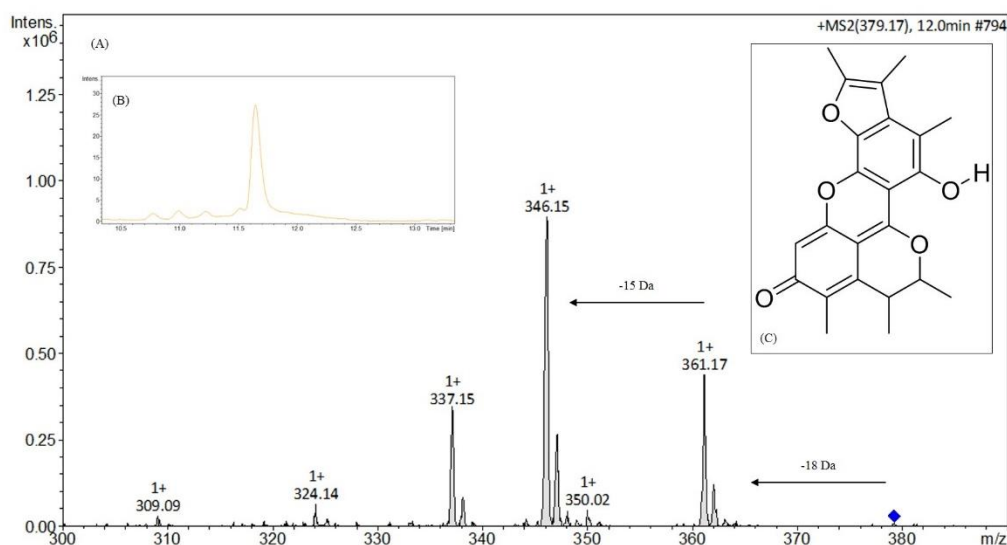


Figura 85: A – Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 379; B – Cromatograma $\lambda=254$ nm. C – Estrutura da Penicitrone B.

A Penicitrone B é um policetídeo formado através do acoplamento da citrinina e do composto 2,3,4-trimetil-5,7-dihidroxi-2,3-di-hidrobenzofurano comumente biossintetizadas por *P. citrinum* (Wakana, et al., 2006). Porém, há relatos da ocorrência da Penicitrone B em outras espécies como o *Aspergillus terreus*, conforme descrito em estudo realizado por (Xu, et al., 2017). Conforme relatado em estudo anterior realizado por Santiago e colaboradores (2021), a linhagem utilizada no presente estudo foi isolada de uma comunidade microbiana de ambiente aquático juntamente com outros fungos do gênero *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (de Lima, et al., 2017). Logo, este fato nos leva a inferir que, entre os fungos, ocorreu uma transferência gênica horizontal promovida por fatores ecológicos de manutenção bioquímica dos organismos (Hotopp, 2011; Robinson, Sieber, & Dunning, 2013). Esse movimento de material genético entre organismos do mesmo gênero, como é o caso do *P. purpurogenum* e *P. citrinum*, é vantajoso uma vez que, durante o processo podem ser transferidos genes de resistência a antibióticos que levam a produção de novos compostos (Cairns, et al., 2018; Kubyshkin, et al., 2018).

Com relação a atividade biológica da Penicitrone B, Xu e colaboradores (2017) descrevem moderada atividade contra bactérias Gram-negativas o que corrobora com o presente estudo onde foram observadas atividades do extrato de *P. purpurogenum* em SB contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* além das Gram-positivas *S. aureus* e *E. feacalis*.

Após análises complementares do espectro MS/MS em ESI(+) do íon $[M+H]^+$ m/z 282, constatou-se a presença do íon $[M+H]^+$ m/z 563 com uma perda de 281 Da (m/z 563 $\rightarrow$ 282) conforme apresentado na figura 4A. Com base nos dados de HRMS-ESI(+) determinou-se que o íon $[2M+H]^+$ m/z 563,5515 ($C_{36}H_{72}N_2O_2$) é um dímero do íon $[M+H]^+$ m/z 282,2800 ($C_{18}H_{36}NO$) que foi caracterizado como oleamida baseado nos dados espectrométricos do estudo realizado por Farha e Hatha (2019). Na figura 36B₁ – B₂ estão apresentadas as estruturas da oleamida e seu dímero.

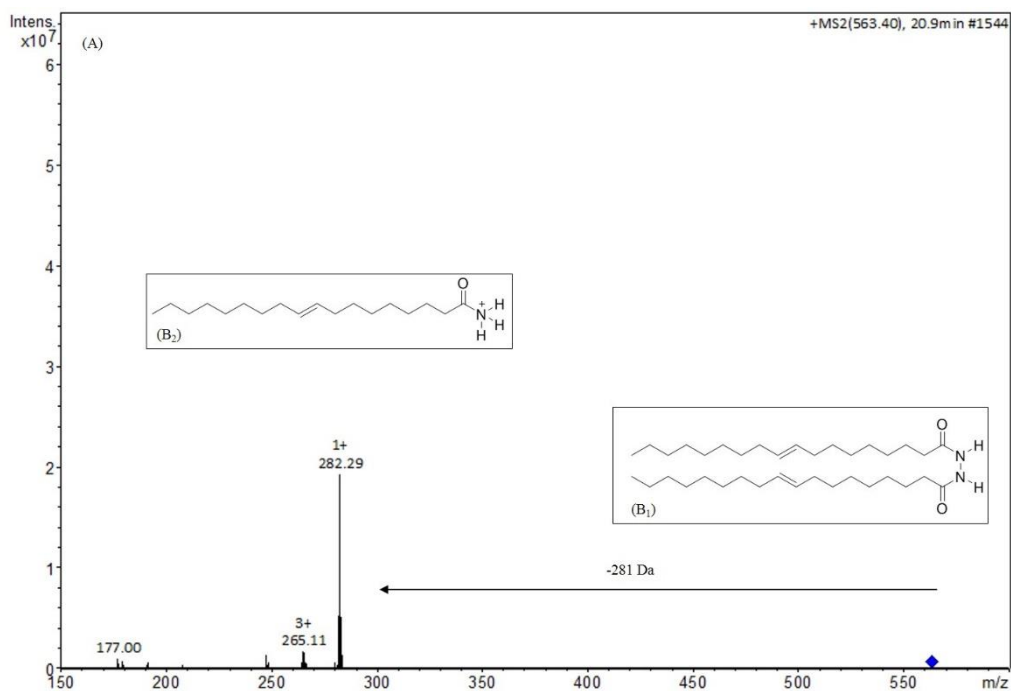


Figura 88: A – Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 563; B₁ – Dioleamida; B₂ – Oleamida.

A oleamida é um composto derivado do ácido oleico de comum ocorrência em plantas e microrganismos (Kima, Chapmana, & Blancaflor, 2010) como *Fusarium fujikuroi* (dos Reis, et al., 2018), *Colletotricum gloeosporioides* (Premjanu & Jaynthy, 2015), *Halomonas* sp (Donio, et al., 2013). e recentemente em fungos do gênero *Penicillium* sp. (Farha & Hatha, 2019). Com relação às atividades biológicas da oleamida, a literatura relata que esta substância é promissora no tratamento de distúrbios neurológicos relacionados a alterações de humor, sono e depressão (McKinney & Cravatt, 2005). Também são encontrados relatos de atividade antibacteriana e anticâncer para esta substância (Donio, et al., 2013). Por fim, as oleamidas apresentam aplicações na indústria como lubrificante e anticorrosivo (da Silva, 2010).

Por fim, o espectro de MS/MS em ESI (+) do íon $[M+H]^+$ m/z 223 apresentado na figura 37A, observa-se perda de água (-18 Da, m/z 223 $\rightarrow$ 205). Através da análise de dados de HRMS-ESI (+) determinou-se a fórmula molecular do íon $[M+H]^+$ m/z 223,0968 como $C_{12}H_{15}O_5$. Ao comparar com os dados de espectrometria de massas do presente estudo com os do trabalho realizado por (Afiyatullo, et al., 2015), o composto m/z 223,0968 foi caracterizado como a 3-[2(R)-hidroxibutil]-7-hidroxitalida (Figura 37B).

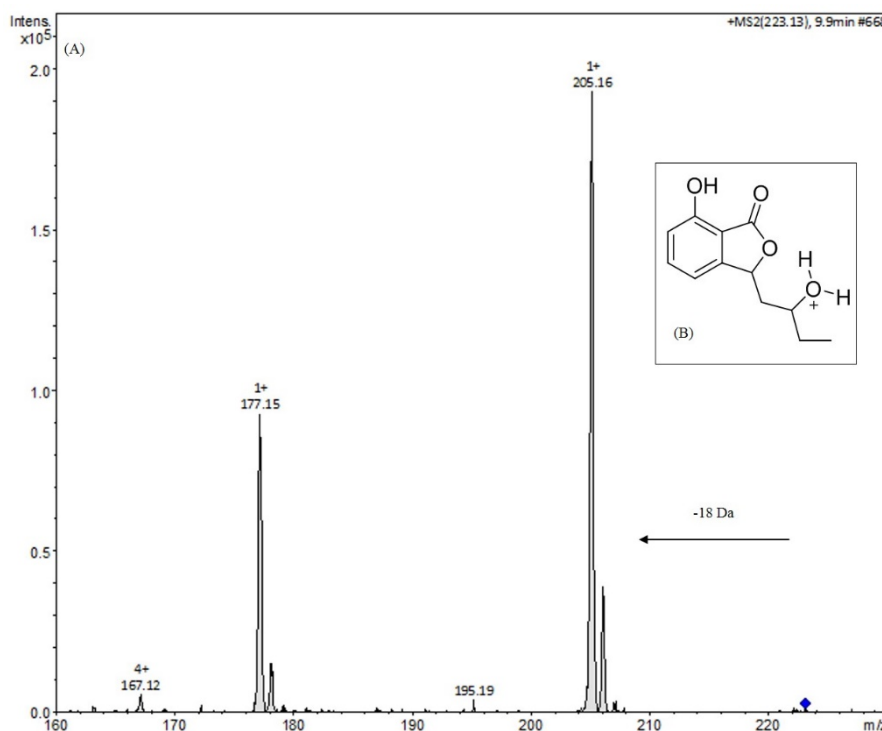


Figura 91: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 223; B – 3-[2(R)-hidroxibutil]-7-hidroxiftalida.

Ftalidas são metabólitos secundários precursores do ácido micofenólico e, são biossintetizadas por diversas espécies de *Penicillium* como *P. brevicompactum*, *P. roqueforti*, *P. bialowiezense*, *P. chrysogenum*, *P. raciborkii*, *P. stoloniferum* dentre outros (Arnold, 2007; Valente, et al., 2013). De acordo com a literatura, das várias atividades biológicas das ftalidas a mais explorada é a antimicrobiana, com destaque para a atividade contra a *Candida albicans* e *Bacillus cereus* (Intaraudom, et al., 2019).

3.2.3 *Penicillium citrinum*

Os espectros de massa em ESI modo positivo das frações revelaram a presença dos íons majoritários de $[M+H]^+$ m/z 501, 434, 375, 317, 245 e 253. Os perfis de LC-MS/MS observados no presente estudo foram comparados com perfis de outros estudos envolvendo a busca de compostos bioativos de *P. citrinum* e outros fungos pertencentes ao gênero. Para estas frações, não foi possível realizar análises de HRMS.

O espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ m/z 501 evidência duas perdas, uma de 18 Da (m/z 501→483) e outra de 221 Da (m/z 483→262) conforme observado na figura 6A. Com base nos estudos realizados por Tsuda e colaboradores (2005) e Clark e colaboradores (2006) o íon $[M+H]^+$ m/z 501 foi caracterizado como sendo a perinadina A (Figura 38B). Foi observado que o íon $[M+H]^+$ m/z 375 (Figura 39A) forma o íon $[M+H]^+$ m/z 357 (-18 Da) e fragmento íon molecular $[M+H]^+$ m/z 262 (-95 Da) observado para o composto anteriormente caracterizado. Desta forma o íon $[M+H]^+$ m/z 375 foi caracterizado, com base na literatura (Tsuda, et al., 2005), como um análogo (Figura 39B) da perinadina A.

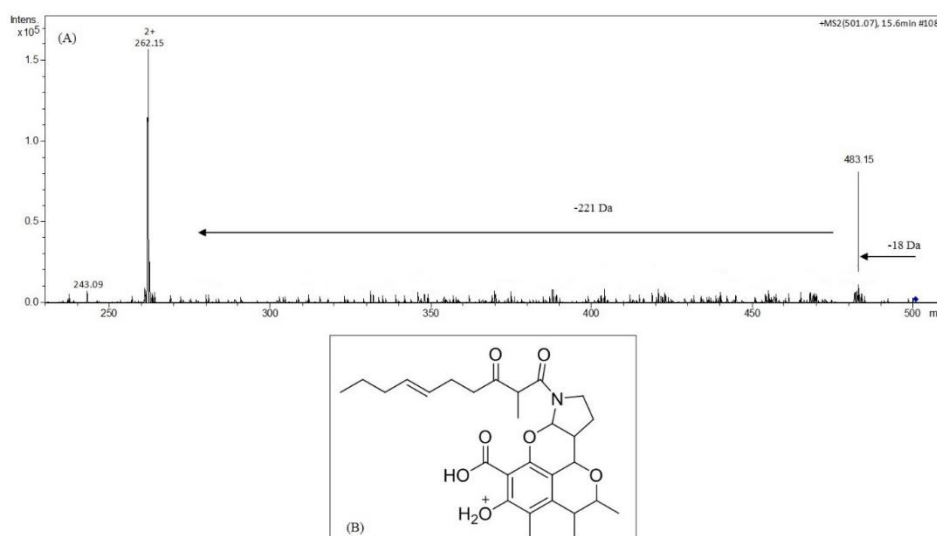


Figura 94: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 501; B – Perinadina A.

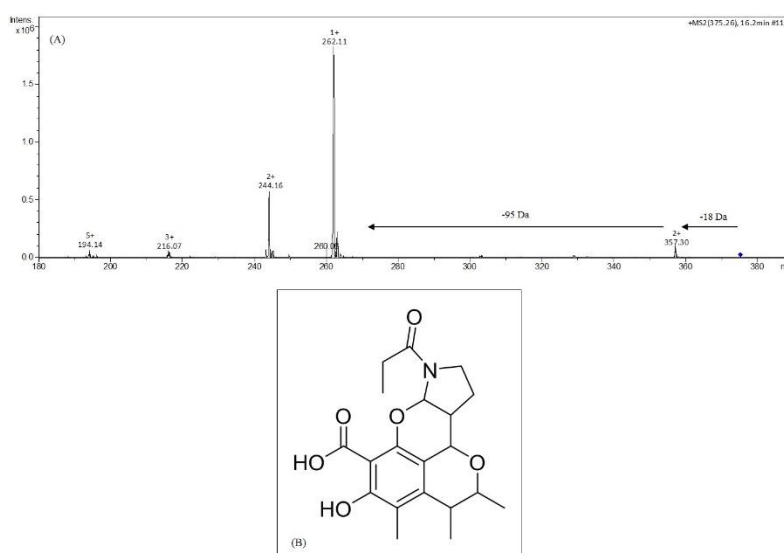


Figura 95: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 375; B – Análogo da perinadina A.

A perinadina A é um composto biossintetizado pelo *P. citrinum* através da união da citrinina com a Escalusamida B por uma reação Diels–Alder (Clark, et al., 2006). Sobre os precursores da perinadina A, a literatura relata que das várias atividades biológicas da citrinina destacam-se a antimicrobiana (Warren, Dougherty, & Wallis, 1957; Wang, Hong, Hwang, & Fan, 1947; Franco, et al., 1996). Com relação à escalusamida B são descritas atividades inseticidas e fungicidas (Castillo, et al., 1999). Sendo assim, a atividade antimicrobiana observada no extrato bruto de *P. citrinum* cultivado em meio SB contra *C. albicans* (62,5 $\mu\text{g/mL}$), pode estar relacionado com a presença do composto perinadina A.

O espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ m/z 434 evidencia duas perdas, uma de 31 Da (m/z 434 $\rightarrow$ 403) e a segunda de 68 Da (m/z 403 $\rightarrow$ 335) conforme observado na figura 40A. Para caracterizar este composto, utilizou-se o estudo realizado por Clark e colaboradores (2006) sobre os derivados da citrinina obtidos de *P. citrinum*. Sendo assim, sugere-se que o íon $[M+H]^+$ m/z 434 é o composto dicitrinina D (Figura 40B).

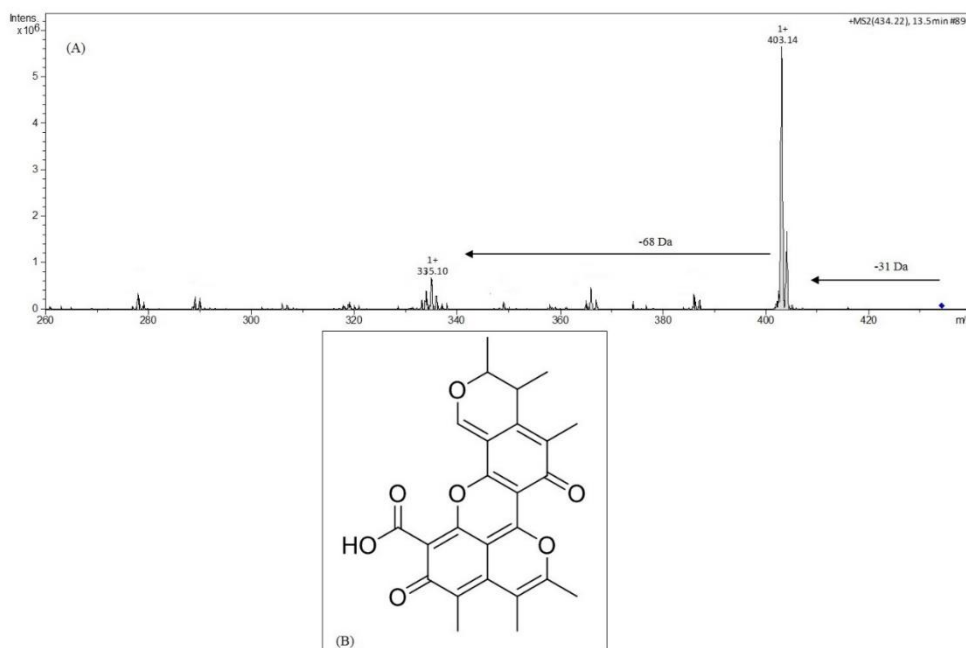


Figura 98: A - Espectro de MS/MS ESI(+) íon m/z 434; B – dicitrinina D.

A literatura relata que dímeros de citrinina, como a dicitrinina D, não apresentam atividade antimicrobiana significativa, porém, estes compostos são explorados quanto a outras atividades biológicas como a anticâncer em especial o mieloma, um tipo de câncer na medula (Clark, Capon, Lacey, Tennant, & Gill, 2006). Para confirmar a presença deste composto nas frações de *P. citrinum* obtidas em meio SB são necessários experimentos complementares de RMN e HRMS.

Por fim, outros metabólitos comuns aos *Penicillium* spp. que provavelmente estão presentes nas frações de *P. citrinum* são uridina (dos Santos, 2003; Marinho, Filho, & Santos, 2005) devido a presença do íon $[M+H]^+$ m/z 245, milanserina B (Draemle, et al., 2022) ao observar o íon $[M+H]^+$ m/z 253 e uma benzofenona $[M+H]^+$ m/z 317 (Zheng, et al., 2018; Bai, et al., 2021). As estruturas dos compostos e os espectros de MS/MS estão apresentados na figura 41.

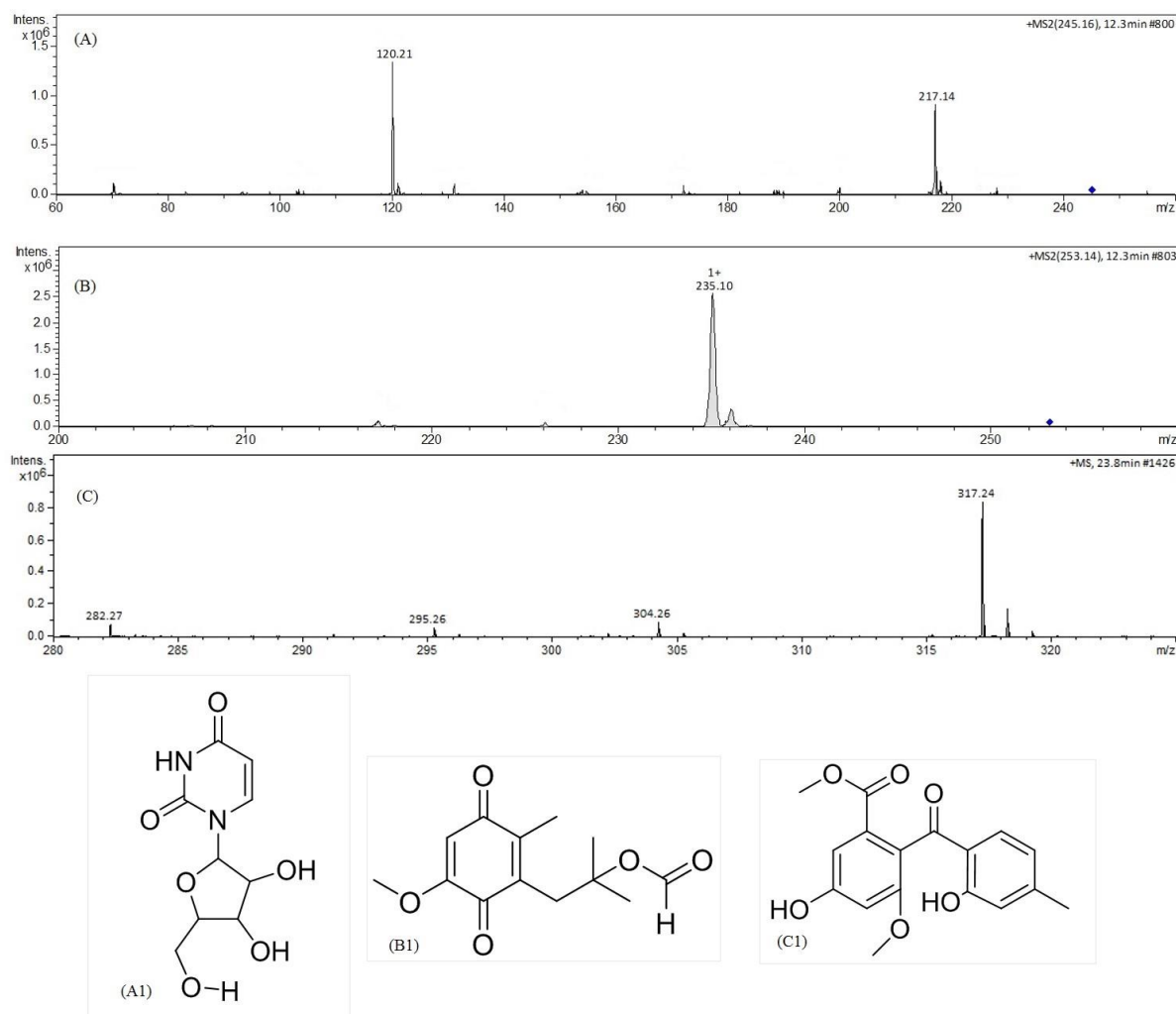


Figura 101: Espectros de Massas (A-C) dos íons MS/MS ESI(+) m/z 245, 253 e 317. Estruturas da uridina, milanserina B e benzofenona, A1-C1 respectivamente.

Com relação a importância biológica dos compostos apresentados na figura 41, a literatura relata que uridina é um nucleosídeo que ao tornar-se um nucleotídeo, por meio da ligação com um grupo fosfato, compõem o RNA que é uma macromolécula de extrema importância para todos os organismos visto que é responsável pela transmissão de informações gênicas (Storck, 1965). Para a milanserina B são relatadas atividades contra *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* e citotóxica (Drae, et al., 2022). As benzofenonas apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* em concentrações menores que 20 $\mu\text{g/ml}$ (Zheng, et al., 2018; Bai, et al., 2021). A descrição da atividade antibacteriana de benzofenonas contra *S. aureus* reforça a possibilidade de haver um composto desta classe nas frações de *P. citrinum* em SB.

Outros compostos presentes nas frações, foram caracterizados como alcaloides piperazinas com base no estudo de Goes (2021). São eles os íons $[M+H]^+$ m/z 197 sendo a L-prolina-L-valina, $[M+H]^+$ m/z 211 como a L-leucina-L-prolina e por fim $[M+H]^+$ m/z 261 a L-fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina. Os espectros de MS/MS e as estruturas dos compostos caracterizados, estão descritos na figura 42.

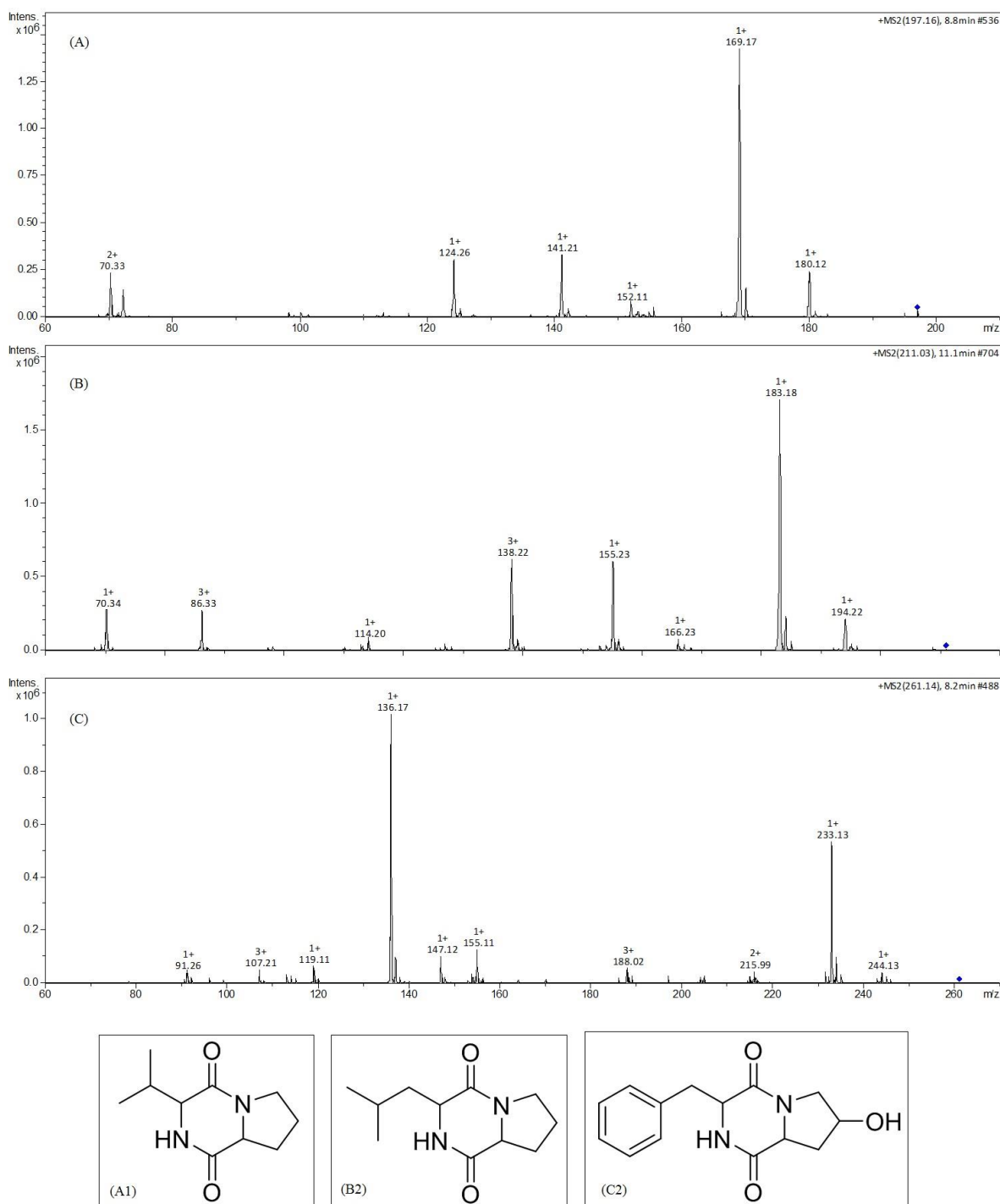


Figura 102: Espectros de Massas (A-C) dos íons MS/MS ESI(+) m/z 197, 211 e 261. Estruturas da L-prolina-L-valina, L-leucina-L-prolina e L-fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina, A1-C1 respectivamente.

3.2.4 *Penicillium oxalicum*

Os espectros de massas em ESI modo positivo das frações revelaram a presença dos íons majoritários de $[M+H]^+$ m/z 420, 434 e 389. Os perfis de massas observados no presente estudo foram comparados com perfis de outros estudos envolvendo a busca de compostos bioativos de *P. oxalicum* e outros fungos pertencentes ao gênero. Ao observar o espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ m/z 434 (figura 43A) têm-se as perdas de 31 Da (m/z 434 → 403), 37 Da

(m/z 403 $\rightarrow$ 366), 31 Da (m/z 366 $\rightarrow$ 334) e 37 Da (m/z 334 $\rightarrow$ 278). Após uma pesquisa detalhada na literatura sobre os metabólitos produzidos por *P. oxalicum*, o íon $[M+H]^+$ m/z 434, detectado no presente estudo, foi caracterizado como a meleagrina (figura 43B) devido a similaridade dos dados de espectrometria de massas observados nos estudos realizados por Kawai e colaboradores (1984) e Pimenta (2011).

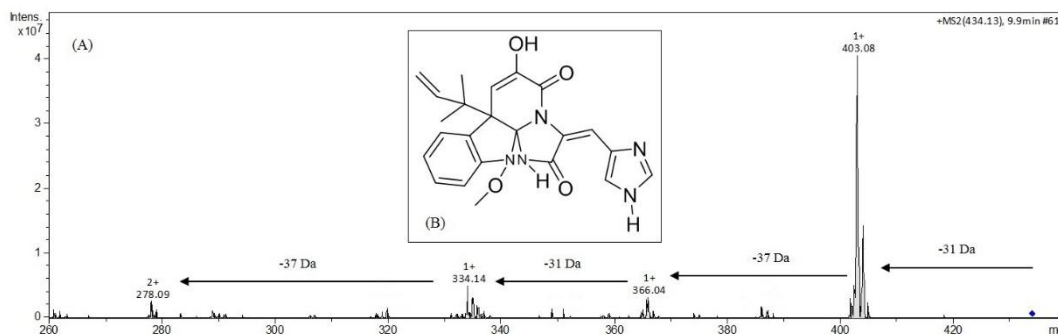


Figura 103: Espectros de Massas do íon MS/MS ESI(+) m/z 434. B- Meleagrina.

A literatura reporta que a meleagrina e seus derivados apresentam atividades antimicrobianas, antiviral e citotóxica (Du, et al., 2010; Goes, 2021). Outros íons caracterizados no presente estudo, com base nos dados de espectrometria de massas da literatura sobre os metabólitos de *P. oxalicum*, foram o íon $[M+H]^+$ m/z 420 como a roquefortina I (Du, et al., 2010; da Silva-Filho, et al., 2021) e o íon $[M+H]^+$ m/z 390 como a roquefortina C (Kozlovsky, et al., 1994; Tor, et al., 2006). Os espectros de MS/MS e as estruturas propostas estão apresentadas na figura 44.

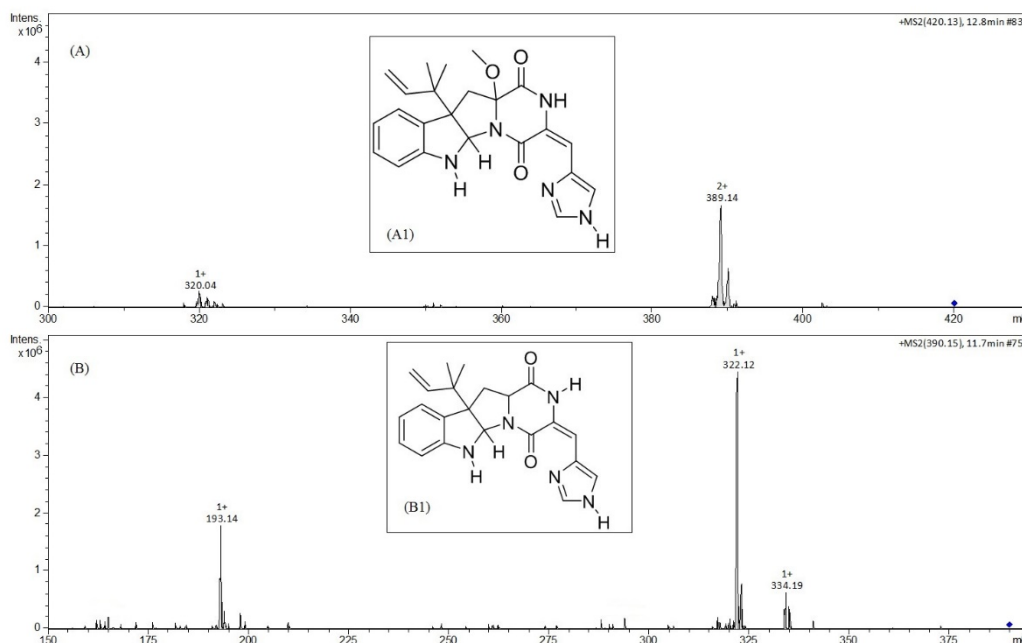


Figura 104: A - Espectros de Massas do íon MS/MS ESI(+) m/z 420. A1 - Roquefortina I. B - Roquefortina C. B1 - Roquefortina C.

O *P. oxalicum* revelou-se um bom produtor de alcaloides indólicos. Estes compostos são derivados do triptofano que contém um sistema de anel indólicos proveniente da rota do ácido

chiquímico (Oliveira, Freitas, Mathias, Braz-Filho, & Vieira, 2009). Tais substâncias apresentam diversas propriedades biológicas, dentre elas a antimicrobiana, antiviral, citotóxica, analgésica, antipirético, dentre outras (Carroll, Copp, Davis, Keyzers, & Prinsep, 2019).

4. Considerações Finais

Com base nos resultados obtidos no presente estudo sobre a identificação de compostos com atividade antibiótica dos fungos *Penicillium* spp, têm-se que os extratos de *P. purpurogenum* apresentaram ação contra *C. albicans*, cultivado em SB, YES e ISP₂ com atividades de 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Vale ressaltar que, os extratos em SB do *P. purpurogenum* apresentaram ação contra outras linhagens sendo elas a *C. tropicalis* (CIM = 250 µg/mL), *P. aeruginosa* (CIM = 1000 µg/mL), *S. aureus* (CIM = 125 µg/mL) e *E. feacalis* (CIM = 500 µg/mL). Os resultados sobre o potencial antibiótico dos extratos de *P. citrinum* e *P. oxalicum* foram publicados em estudo anterior.

Os compostos químicos identificados de *P. purpurogenum* são um sesterpeno, um policetídeos, uma ftalida e duas oleamidas. Do *P. citrinum* foram caracterizados três derivados da citrinina, três alcaloides piperazinas, duas benzofenonas e um nucleosídeo. E do *P. oxalicum* teve-se a presença de três alcaloides indólicos, sendo um deles descrito pela primeira vez em estudos realizados no Amazonas.

Por fim, a abordagem de determinação do perfil químico por UPLC-ESI-MS/MS mostrou-se eficiente para identificar os compostos com potencial biológico presentes nas linhagens de *Penicillium* spp estudadas. Salienta-se que as linhagens utilizadas no presente estudo foram isoladas em um lago localizado no interior do Amazonas, logo o presente estudo contribui para o conhecimento químico e biológico das linhagens aquáticas isoladas em regiões distantes da capital. Posteriormente, serão realizadas análises complementares de HRMS para confirmar a presença dos compostos químicos observados no presente estudo nas frações de *P. citrinum* e *P. oxalicum*.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer as instituições Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane – FioCruz Amazonas e Universidade do Estado do Amazonas pela infraestrutura e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

O presente estudo foi financiado com recursos oriundos das instituições financeira Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. Este trabalho é parte da tese de doutorado de Paulo Alexandre Lima Santiago (Universidade Federal do Amazonas - 2022).

Referências

- Afiyatullo, S. S., Leshchenko, E. V., Sobolevskaya, M. P., Gerasimenko, A. V., Khudyakova, Y. V., Kirichuk, N. N., & Mikhailov, V. V. (2015). New 3-[2(r)-hydroxybutyl]-7-hydroxyphthalide from marine isolate of the fungus *Penicillium claviforme*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1), Doi: 10.1007/s10600-015-1214-y.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, pp. 51-66.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, pp. 51-66, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>.
- Au, T. K., Chick, W. S., & Leung, P. C. (2000). The biology of ophiobolins. *Life sciences*, pp. 733-742. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00668-8.
- Bai, M., Gao, C., Liu, K., Zhao, L., Tang, Z., & Liu, Y. (2021). Two new benzophenones isolated from a mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. *The Journal of Antibiotics*, pp. 1-4, <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00464-9>.
- Cai, R., Jiang, H., Mo, Y., Guo, H., Li, C., Long, Y., She, Z. (2019). Ophiobolin-Type Sesterterpenoids from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. ZJ-68. *Journal of Natural Products*, pp. 1-11, Doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00462.
- Cairns, J., Ruokolainen, L., Hultman, J., Tamminen, M., Virta, M., & Hiltunen, T. (2018). Ecology determines how low antibiotic concentration impacts community composition and horizontal transfer of resistance genes. *Communications Biology*, 1 (1), pp. 35. doi:10.1038/s42003-018-0041-7.
- Calixto, C. M., & Cavaleiro, É. T. (2012). Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico. *Química Nova na Escola*, 34(3), pp. 118-123.
- Canuto, K. M., Rodrigues, T. H., de Olivei, F. A., & Gonçalves, F. J. (2012). Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2019). Produtos naturais marinhos. *Natural Product Reports*, (36), pp. 122-173, Doi: 10.1039/C8NP00092A.
- Castillo, L. M., Moya, P., Cantin, S. A., Miranda, A. M., Primo, M. J., Hernández, E., & Primo, Y. E. (1999). Insecticidal, Anti-Juvenile Hormone and Fungicidal Activities of Organic Extracts from Different *Penicillia* Species and their Isolated Active Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), pp. 2120-2124, doi:10.1021/jf981010a.
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., & Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, pp. 62(6):929-37. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00713-6.
- Chaimbault, P. (2014). The Modern Art of Identification of Natural Substances in Whole Plants. In book: Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products. From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture, pp. 31-94, Doi:10.1007/978-94-017-8953-03.

- Chiba, R., Minami, A., Gomi, K., & Oikawa, H. (2013). Identification of Ophiobolin F Synthase by a Genome Mining Approach: A Sesterterpene Synthase from *Aspergillus clavatus*. *Organic Letters*, pp. 594–597, DOI: <https://doi.org/10.1021/ol303408a>.
- Clark, B. R., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., & Gill, J. H. (2006). Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, pp. 1520-1528, Doi: 10.1039/b600960c.
- da Silva, C. M. (2010). Minimização da geração de resíduos líquidos através da mudança de metodologia cromatográfica para determinação de deslizantes em polipropileno. Porto Alegre.: Trabalho de conclusão de curso do curso de química industrial.
- da Silva-Filho, F. A., de Souza, M., Rezende, G. O., da Silva, F., da Cruz, J., da Silva, G. F., de Souza, A. (2021). Screening of Alkaloid-Producing Endophytic *Penicillium* Strains from Amazon Medicinal Plants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) and Principal Component Analysis (PCA). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32(9), pp. 1832-1839, doi: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210074>.
- de Lima, A. K., Ribeiro, J. S., de Souza, I. d., Rodrigues, J. C., de Souza, T. C., Maia, C. R., & Fernandes, O. C. (2017). Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: potencial patogênico. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 12(6), pp. 1017-1024.
- de Oliveira, G. P. (2019). Indução metabólica de fungos filamentosos pelas técnicas de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética: produção de metabólitos secundários com atividade neuroprotetora. Belo Horizonte: Tese de doutorado em Química da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Ding, W., Uvarani, C., Wang, F., Xue, Y., Wu, N., He., L., Tang, J. (2020). New Ophiobolins from the Deep-Sea Derived Fungus *Aspergillus* sp. WHU0154 and Their Anti-Inflammatory Effects. *Marine drugs*, pp. 575, Doi: 10.3390/md18110575.
- Donio, M. S., Ronica, F. A., Viji, V. T., Velmurugan, S., Jenifer, J. C., Michaelbabu, M., Citarasu, T. (2013). Halomonas sp. BS4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. *Springerplus*, pp. 2(1), 149, Doi: 10.1186/2193-1801-2-149.
- dos Reis, C. L., Morandini, L. M., Bevilacqua, C. B., Bublitz, F., Ugalde, G., Mazutti, M. A., & Jacques, R. S. (2018). First report of the production of a potent biosurfactant with α , β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian Journal Microbiology*, pp. 185-192, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.004>.
- dos Santos, R. M. (2003). Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium* moniliforme isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). São Carlos: Tese de doutorado em química orgânica.
- Dramae, A., Intaraudom, C., Bunbamrung, N., Boonyuen, N., Auncharoen, P., & Pittayakhajonwut, P. (2022). Antimicrobial tanzawaic acid derivatives from the endophytic *Penicillium citrinum* BCC71086. *Tetrahedron*, pp. 132645, doi: 10.1016/j.tet.2022.132645.

- Du, L., Feng, B., Zhao, B., Li, D., Cai, S., Zhu, T., Gu, Q. (2010). Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. *The Journal of Antibiotics*, 63, pp. 165-170.
- Dutton, M. V., & Evans, C. S. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, pp. 881-895.
- Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., & Charudattan, R. (2006). Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1779–1783.
- Farha, A. K., & Hatha, A. M. (2019). Bioprospecting potential and secondary metabolite profile of a novel sediment-derived fungus *Penicillium* sp. ArCSPf from continental slope of Eastern Arabian Sea. *Mycology*, pp. 10:2, 109-117, Doi:10.1080/21501203.2019.1572034.
- Ferreira, I. M. (2016). Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise. São Carlos: Tese de Doutorado em Ciências da Universidade de São Paulo.
- Fill, T., Pallini, H., Amaral, L., Silva, J., Bidóia, D., Peron, F., Rodrigues-Filho, E. (2016). Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. *Sociedade Brasileira de Química*.
- Florencio, M. (2014). Estudo da produção e aplicação da enzima extracelular nuclease p1 do fungo *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994.
- Franco, C. M., Fente, C. A., Vasquez, B., Cepeda, A., Lallaoui, L., Prognon, P., & Mahuzier, G. (1996). Simple and sensitive highperformance liquid chromatography fluorescence method for the determination of citrinin - Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *Journal of Chromatography A*.
- Frisvad, J. C. (1987). High-performance liquid chromatographic determination of profiles of metabolites of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography A*, (392), pp. 333-347.
- Goes, G. C. (2021). Análise de alcaloides indólicos antitumorais produzido por *Penicillium chrysogenum* guiada por Espectrometria de massas e Molecular Networking. Manaus: Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFAM.
- Gonçalves, F. J., Freire, F. d., & Lima, J. L. (2013). Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. *Essentia*, 15(1), pp. 71-92.
- Guimarães, D. O. (2010). Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "*Caenorhabditis elegans*". Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Guimarães, D. R., Souza, T. F., Angolini, C. F., Souza, A. L., da Silva, F. M., de Souza, A. L., Koolen, H. F. (2019). Produção de pigmentos do tipo azafilonas por *Penicillium sclerotiorum*. Em L. Oliveira, J. Oliveira, L. Gasparotto, M. Jesus, L. Rocha, J. Bentes, S. Andrade, *Diversidade Microbiana da Amazônia*. Manaus: Editora INPA.

- Hetherington, A. C., & Raistrick, H. (1931). On the Production and Chemical Constitution of a New Yellow Colouring Matter, Citrinin, Produced from Glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*.
- Hotopp, J. D. (2011). Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends in Genetics*, 27 (4): pp. 157–163. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.005.
- Houbraken, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. *Studies in Mycology*, 70, pp. 53-138.
- Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44, pp. 117-133.
- Huang, J. N., Zou, Q., Chen, J., Xu, S. H., Luo, D., & Zhang, F. G. (2018). Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, *Penicillium citreonigrum* SP-6. *Phytochemistry Letters*, 27, pp. 114-118.
- Intaraudom, C., Punyain, W., Bunbamrung, N., Dramaee, A., Boonruangprapa, T., & Pittayakhajonwut, P. (2019). Antimicrobial drimane-phthalide derivatives from *Hypoxylon fendleri* BCC32408. *Fitoterapia*, 138, p.104353 Doi: 10.1016/j.fitote.2019.104353.
- Jayashree, M., & Wesely, E. G. (2019). The Impact of Weather on the Fungal Abundance and Richness in Sorghum Grains in Selected Districts of Tamil Nadu, India. Infokara Research.
- Junior, G. P., da Silva, K. N., Santiago, P. A., Santiago, S. R., Ohse, K. O., Martim, S. R., & de Aquino, P. F. (2021). Prospecção enzimática e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* isoladas do bioma Amazônico. *Brasilina Journal of Development*.
- Kawai, K., Nozawa, K., Nakajima, S., & Itaka, Y. (1984). Studies of fungal products. VII The structures of meleagrins and 9-O-p-bromobenzoylmeleagrins. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 32, pp. 886-887, doi: <https://doi.org/10.1248/cpb.32.94>.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews – Microbiology*, 3(12), pp. 937-947.
- Khalidi, N., Seifuddin, F., Turner, G., Haft, D., Nierman, W., Wolfe, K., & Fedorova, N. (2010). Smurf: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, pp. 736-741.
- Kim, W. G., Song, N. K., & Yoo, I. D. (2001). Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. *The journal of antibiotics*.
- Kima, S., Chapman, D. K., & Blancaflor, B. E. (2010). Fatty acid amide lipid mediators in plants. *Plant Science*, 178, (5), pp. 411-419, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.017>.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N., Reshetilova, T. A., Sakharovskiy, V. G., Baskunov, B. P., & Seleznyov, S. G. (1994). New metabolites of *Penicillium glandicola* var. *glandicola* – glandicolin A and B. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 30, pp. 410-414.
- Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V., Adanin, V. M., Ozerskaya, S. M., Kochkina, G. A., Gräfe, U. (2003). Quinocitrinins A and B, new quinoline alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a permafrost fungus. *The journal of antibiotics*.
- Kubyshev, V., Acevedo-Rocha, C., & Budisa, N. (2018). On universal coding events in protein biogenesis. *Biosystems*, 164, pp. 16-25, doi: 10.1016/j.biosystems.2017.10.004.

- Kumar, P. G., & Suneetha, V. (2021). Microbial pectinases: Wonderful enzymes in fruit juice clarification. *International Journal of MediPharm Research*, pp. 12-20.
- Li, E., Clark, A. M., Rotella, D. P., & Hufford, C. D. (1995). Microbial metabolites of ophiobolin A and antimicrobial evaluation of ophiobolins. *Journal of natural products*, pp. 74-81. Doi: 10.1021/np50115a009.
- Lima, J. M., Pereira, J. O., Costa Neto, P. Q., Batista, I. H., Santos, J. C., Araújo, S. P., Azevedo, J. L. (2015). *Avaliação de fungos endofíticos e epifíticos com potencial para produção de biossurfactantes, isolados de macrófitas aquáticas do rio Negro em Manaus, Amazonas*. Em L. A. Oliveira, O. C. Fernandes, M. A. Jesus, J. L. Bentes, S. L. Andrade, A. Q. Souza, & C. Santos, *Diversidade Microbiana da Amazônia*. Editora INPA.
- Liu, X.-H., Miao, F.-P., Qiao, M.-F., Cichewicz, R. H., & Ji, N.-Y. (2013). Terretinin, ophiobolin, and drimaneterpenes with absolute configurations from an algicolous *Aspergillus ustus*. *RSC Advances*, pp. 588-595. Doi: <https://doi.org/10.1039/C2RA22701K>.
- Liu, Y., Wang, L., Jung, J. H., & Zhang, S. (2007). Sesterterpenoids. *Natural Product Reports*, pp. 1401-1429, DOI: <https://doi.org/10.1039/B617259H>.
- Makoto, K., Kaoru, Y., Mayumi, S., Kazunaga, Y., Hirokazu, A., Tomoyuki, O., & Daisuke, U. (1997). Tanzawaic Acids A, B, C, and D: Inhibitors of Superoxide Anion Production from *Penicillium citrinum*. *Chemistry Letters*.
- Marinho, A. d., Filho, E. R., & Santos, L. (2005). Estudo Químico de *Penicillium* sp, fungo associado a *Murraya paniculata* (Rutaceae). 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas - MG.
- Martín, J., Casqueiro, J., & Liras, P. (2005). Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, pp. 282-293.
- McKinney, M. K., & Cravatt, B. (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), pp. 411-432, doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133450.
- Molinari, G. (2009). Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. *Pharmaceutical Biotechnology*, 655, pp. 13-27.
- Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, pp. 85-89.
- Nagel, D. W., Pachler, G. R., Steyn, P. S., Wessels, P. L., Gafner, G., & Kruger, G. J. (1974). X-Ray structure of oxaline: a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 1021-1022.
- Narita, K. (2018). Mineração do genoma de sesterpenos derivados de fungos filamentosos por abordagem biológica sintética. Hokkaido: Universidade de Hokkaido, Tese de Doutorado em Ciências.
- Nozoe, S., Morisaki, M., Tsuda, K., Iitaka, Y., Takahashi, N., Tamura, S., Shirasaka, M. (1965). The Structure of Ophiobolin, a C₂₅ Terpenoid Having a Novel Skeleton. *Journal of the American Chemical Society*, pp. 4968-4970.

- Oliveira, V. B., Freitas, M., Mathias, L., Braz-Filho, R., & Vieira, I. (2009). Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(1), Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000100015>.
- Park, M. S., Oh, S. Y., Fong, J. J., Houbraken, J., & Lim, Y. W. (2019). the diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Scientific Reports*, 9, pp. 13540, Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>.
- Pastre, R., Marinho, A. M., Rodrigues-Filho, E., Souza, A. Q., & Pereira, J. O. (2007). Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova*, 30(8), pp. 1867-1871.
- Pi, C., Zhang, Z., Xiang, B., Tian, H., Liao, Q., Chen, Y., Hu, S. (2020). Constructing a novel expression system by specific activation of amylase expression pathway in *Penicillium*. *Microbial Cell Factories*.
- Pimenta, E. P. (2011). Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum*. São Carlos.
- Pimentel, P. S. (2014). Caracterização de enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo filamentoso *Penicillium citrinum*. Manaus: Dissertação do Programa multi-institucional de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.
- Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press.
- Premjanu, N., & Jaynthy, C. (2015). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Lansea corammendalica*. *International Journal of ChemTech Research*, pp. 7(1), 369-374.
- Rasmussen, R. R., Storm, I. L., Rasmussen, P. H., Smedsgaard, J., & Nielsen, K. F. (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, pp. 765–776, Doi: 10.1007/s00216-010-3545-7.
- Roberts, S. C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature chemical biology*, pp. 387-995. Doi: 10.1038/nchembio.2007.8.
- Robinson, K. M., Sieber, K. B., & Dunning, H. C. (2013). A review of bacteria-animal lateral gene transfer may inform our understanding of diseases like cancer. *PLOS Genetics*, Doi:10.1371/journal.pgen.1003877.
- Rodríguez, J., Copa-Patiño, J. L., & Pérez-Leblic, M. L. (1995). Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Letters in Applied Microbiology*, pp. 46-49.
- Romano, S., Jackson, S., Patry, S., & Dobson, A. (2018). Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) Principle to Marine Microorganism. *Marine Drugs*, p. 224.
- Rundberget, T., & Wilkins, A. L. (2002). D etermination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, pp. 189-197.
- Santiago, P. L., Santiago, S. S., de Aquino, P. A., Nunomura, S. M., & Nunomura, R. S. (2022). Evaluation of the antimicrobial potential of extracts from fungi *Penicillium* spp. *Research, Society and Development*. 11(3), doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26457>.

- Seetharaman, P., Gnanasekar, S., Chandrasekaran, R., Chandrakasan, G., Syed, A., Hodhod, M., Sivaperumal, S. (2017). Isolation of limonoid compound (Hamisonine) from endophytic fungi *Penicillium oxalicum* LA-1 (KX622790) of *Limonia acidissima* L. for its larvicidal efficacy against LF vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Science Pollution Research*, pp. 21272-21282.
- Song, W., Han, X., Qian, Y., Liu, G., Yao, G., Zhong, G., & Qu, Y. (2016). Proteomic analysis of the biomass hydrolytic potentials of *Penicillium oxalicum* lignocellulolytic enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*.
- Steyn, P. S. (1970). The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron*, pp. 51-57.
- Storck, R. (1965). Composição de nucleótidos de ácidos nucleicos de fungos. I. Ácidos ribonucleicos. *Revista de Bacteriologia*, 90(5), pp. 1317-1323, Doi: 10.1053/meta.2002.34041.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., & Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, pp. 9-19.
- Thomas, R. (2001). *Spectroscopy*.
- Tor, E. R., Puschner, B. P., Filigenzi, M. S., Tiwary, A. K., & Poppenga, R. H. (2006). LC-MS/MS Screen for Penitrem A and Roquefortine C in Serum and Urine Samples. *Analytical Chemistry*, 78, pp. 4624-4629.
- Tsipouras, A., Adefarati, A. A., Tkacz, J. S., Frazier, E. G., Rohrer, S. P., Birzin, E., Schaeffer, J. M. (1996). Ophiobolin M and analogues, noncompetitive inhibitors of ivermectin binding with nematocidal activity. *Bioorganic e medicinal chemistry*, pp. 531-536.
- Tsuda, M., Kasai, Y., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., Mikami, Y., & Kobayashi, J. (2004). Citrinadin A, a Novel Pentacyclic Alkaloid from Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Organic Letters*.
- Tsuda, M., Sasaki, M., Mugishima, T., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., Kobayashi, J. (2005). calusamides A-C, New Pyrrolidine Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Products*, 68(2), pp. 273-276, Doi: 10.1021/np049661q.
- Valente, A. M., Ferreira, A., Daolio, C., Rodrigues-Filho, E., Boffo, E. F., Souza, A. Q., Melo, I. S. (2013). Production of 5-hydroxy-7-methoxy-4-methylphthalide in a culture of *Penicillium crustosum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(2), pp. 487-496, Doi: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000024>.
- Venil, C. K., Velmurugan, P., Dufossé, L., Devi, P. R., & Ravi, A. V. (2020). Fungal Pigments: Potential Coloring Compounds for Wide Ranging Applications in Textile Dyeing. *Jornal of Fungi*.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Okada, K., Takaki, G. d., Yaguchi, T., Kawai, K. (2006). New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Medicines*, 60, pp. 279-28. Doi 10.1007/s11418-006-0001-2.
- Wang, Y., Hong, F. K., Hwang, F. T., & Fan, C. (1947). Citrinin as an antibiotic. *Science*.
- Warren, H. H., Dougherty, G., & Wallis, E. (1957). The synthesis and antibiotic activity of analogs of citrinin and dihydrocitrinin. *Journal of American Chemistry Society*.

- Xu, L., Cao, F., Tian, S., & Zhu, H. (2017). Alkaloids and polyketides from the soil fungus *Aspergillus terreus* and their antibacterial activities. *Chemistry of Natural Compounds*, pp. 1212-1215. Doi: 10.1007/s10600-017-2243-5.
- Xue, J., Wu, P., Xu, L., & Wei, X. (2014). Penicillitone, a Potent in Vitro Anti-inflammatory and Cytotoxic Rearranged Sterol with an Unusual Tetracycle Core Produced by *Penicillium purpurogenum*. *Organic Letters*, 16, 5, pp. 1518–1521, doi: <https://doi.org/10.1021/ol500418f>.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjari, N., Saxena, A. K. (2018). Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.*, pp. 1-16, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Yuan, W. H., Wei, Z. W., Dai, P., Wu, H., Zhao, Y. X., Zhang, M. M., Zheng, W. F. (2014). Halogenated Metabolites Isolated from *Penicillium citreonigrum*. *Chemistry & Biodiversity*, 11.
- Yuan, W. H., Zhang, Y., Zhang, P., & Ding, R. R. (2017). Antioxidant Sesquiterpenes from *Penicillium citreonigrum*. *Natural Product Communications*, 12(12), pp. 1827-1829.
- Zhang, D., Fukuzawa, S., Satake, M., Li, X., Kuranaga, T., Niitsu, A., Tachibana, K. (2012). Ophiobolin O and 6-Epi-Ophiobolin O, Two New Cytotoxic Sesterterpenes from the Marine Derived Fungus *Aspergillus* Sp. *Natural Product Communications*, pp. 1411–1414. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11030-012-9400-3>.
- Zheng, C. J., Liao, H. X., Mei, H. Q., Huang, G. L., Yang, L. J., Zhou, X. M., Wang, C. Y. (2018). Two new benzophenones and one new natural amide alkaloid isolated from a mangrove-derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Natural Product Research*, pp. 1-9, doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460832>.

Capítulo III

Potencial antimicrobiano de *Penicillium purpurogenum* isolado no Amazonas e identificação de derivados da citrinina

Potencial antimicrobiano de *Penicillium purpurogenum* isolado no Amazonas e identificação de derivados da citrinina

O presente capítulo está relacionado aos dois últimos objetivos desta tese. Foi elaborado um manuscrito em língua portuguesa que, foi traduzido para o inglês e está formatado de acordo com o modelo da revista. Pretende-se submeter este trabalho no periódico Revista Brasileira de Farmacognosia, Qualis A4.

Paulo A. L. Santiago^{1,2*}; Sarah R. S. da S. Santiago¹; Bruna R. de Lima⁵; Edizon V. Lopes³; Sergio M. Nunomura; Priscila F. de Aquino⁴; Rita CS Nunomura³

¹Universidade Federal do Amazonas. Departamento de Química. Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos. 69080-900. Manaus, Brasil.

²Universidade do Estado do Amazonas. Centro de Estudos Superiores de Tabatinga. 69640-000. Tabatinga, Brasil.

³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Coordenação de Tecnologia e Inovação. Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia. 69067-375. Manaus, Brasil.

⁴Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas, Laboratório Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, 69057-070, Manaus, Brasil.

⁵Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, UNESP, 18610-034, Botucatu, Brasil.

*Autor correspondente: Paulo A. L. Santiago. e-mail: psantiago@uea.edu.br

Declarações

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer as instituições Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia e Universidade do Estado do Amazonas pela infraestrutura e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço ainda a Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) por ceder o material biológico para

a execução do trabalho e ao programa de Pós-Graduação em Química pela formação.

O presente estudo foi financiado com recursos oriundos das instituições financeiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ através do Edital Nº 28/2018, Projeto Universal Nº 432533/2018-4 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM através do Edital no. 002/2018 – Universal Amazonas, Nº 062.01321/2018.

Contribuições dos Autores

Todos os autores contribuíram para a concepção e desenho do estudo. Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago contribuiu realizando os testes de determinação da concentração mínima inibitória. Bruna Ribeiro de Lima e Edizon Veiga Lopes contribuíram na interpretação de dados de RMN e Espectrometria de Massas. Priscila Ferreira de Aquino coordenou o cultivo da linhagem fúngica utilizada no presente estudo para obtenção dos metabólitos secundários e leitura crítica do manuscrito. Rita de Cássia Saraiva Nunomura e Sergio Massayoshi Nunomura contribuíram na coordenação da análise cromatográfica e espectroscópica dos dados e leitura crítica do manuscrito. Todos os autores leram o manuscrito final e aprovaram a submissão.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado por recursos oriundos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ através do Edital Nº 28/2018, Projeto Universal Nº 432533/2018-4 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM através do Edital no. 002/2018 – Universal Amazonas, Nº 062.01321/2018.

RESUMO

Os fungos do gênero *Penicillium* produzem metabólitos secundários que são utilizados como modelo para a síntese e desenvolvimento de diversos compostos com atividades bactericida, fungicida, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, dentre outras. Com base nessas informações, foi conduzido um estudo de investigação do perfil metabolômico e do potencial antimicrobiano do *Penicillium purpurogenum* (CFAM – 214). Verificou-se que a concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos obtidos do caldo de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) em ISP2, SB e YES contra *Candida albicans* foi de 500 µg/mL, 31,25 µg/mL e 62,5µg/mL, respectivamente. No teste contra *Candida tropicalis* e *Staphylococcus aureus*, a CIM para os extratos cultivados em SB foi de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente. Devido ao bom desempenho do extrato de *P. purpurogenum* em SB, realizou-se um cultivo em larga escala que levou ao isolamento de duas substâncias, cujas estruturas foram determinadas por métodos espectroscópicos como RMN de 1D (^1H RMN e ^{13}C RMN) e 2D (HMBC e HSQC), HRMS e MS/MS. As substâncias isoladas foram identificadas como dois derivados da citrinina, dihidrocitrinina (1) e 1-metildihidrocitrinina (2). Os resultados obtidos no presente estudo contribuem pra o conhecimento sobre os metabólitos secundários produzidos por *P. purpurogenum* e revelam a possibilidade de obter-se a 1-metildihidrocitrinina por uma via biossintética.

Palavras-chave: *Penicillium purpurogenum*, metabólitos secundários, citrinina, antimicrobiano.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos classificados como eucariontes de relações ecológicas diversas com elevada importância para o equilíbrio de ecossistemas devido a sua capacidade de degradar matéria orgânica (Oliveira, 2009). Estes organismos produzem metabólitos secundários, que apresentam elevada diversidade química estrutural, especificidade bioquímica e afinidade de ligação com receptores celulares (Molinari, 2009; Guimarães, 2010).

Com base na literatura o *P. purpurogenum* é amplamente explorado quanto ao seu potencial de produção de enzimas de interesse industrial como as β -glicosidases, endoxilanses, acetil xilano esterase e α -L-arabinofuranosidase (Musalem, Steiner e Contreras, 1984; Fritz, et al., 2008;

Hidalgo, Steiner e Eyzaguirre, 1992; Chavez, et al., 2002; Egana, et al., 1996). As substâncias relatadas nessa linhagem, são da classe das quinonas, policetídeos, esteroides, terpenos e xantonas (Frisvad et al., 2004; Mapari, Meyer e Thrane, 2006; Khethr, 2008). Alguns destes compostos são utilizados como pigmentos naturais e outras substâncias apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas, antiviral e antitumoral (Sokovic et al, 2009; Wang et al., 2011; Ghanbari, Mohammadkhani e Babaeizad, 2014; XUE, 2014; Murshid, Badr, e Youssef, 2016).

A citrinina (Figura 45) é um metabólito secundário pertencente à classe das micotoxinas que são biossintetizadas por fungos através da rota dos policetídeos pela condensação de unidades de acetil ou malonil mediadas pelas sintases de policetídeos (PKS) (Pastre, et al., 2007; Paulo, Sigrist, & de Oliveira, 2019). O principal produtor da citrinina é o *Penicillium citrinum*, um fungo de ocorrência comum em regiões tropicais sendo encontrado no solo, cereais, especiarias tropicais, raízes, caules e folhas (Samson e Pitt, 2000; Houbraken, Frisvad e Samson, 2010). Este composto pode ser produzido por *P. corylophilum* e fungos pertencentes a outros gêneros como o *Aspergillus*, *Pythium* e *Cercosporidium*. (Damodaran, Ramados e Shanmugasundaram, 1973; Houbraken et al., 2011; Santos, Costa e Figueroa-Villar, 2012). A citrinina e seus derivados são explorados quanto ao seu potencial biológico por apresentarem atividades antimicrobianas, citotóxica, hipocolesterolêmica, imunossupressor, inibidor enzimático e da síntese de ácidos nucleicos (Wang, Hong, et al., 1947; Warren, Dougherty e Wallis, 1957; Betina e Baráthová, 1968; Deruiter, Jacyno, et al., 1992; Carvalho, Fernandes e Freire, 2005).

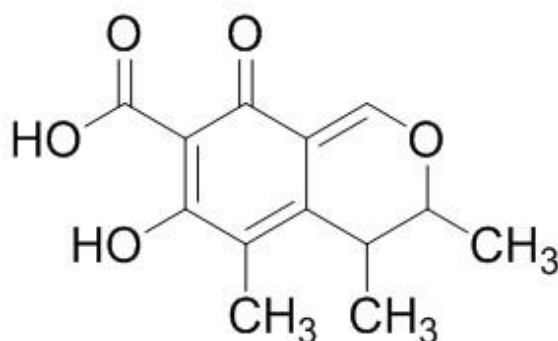


Figura 106: Estrutura da citrinina

Conforme exposto, muitos estudos envolvendo a citrinina revelam que determinados organismos são considerados padrão ouro para sua obtenção e

exploração, em especial o *P. citrinum*, no entanto não há relatos da obtenção deste composto e seus derivados em linhagens de *P. purpurogenum*. Sendo assim, o presente estudo teve como principais objetivos determinar a atividade antimicrobiana dos extratos de *P. purpurogenum* e isolar os seus principais constituintes químicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimentos experimentais gerais

Os dados de espectrometria de massas foram obtidos por meio do espectrômetro Bruker Daltonics Amazon Speed (Ion-trap e microTOF Q-II), equipado com a fonte ESI e operando no modo negativo de aquisição. Os espectros de RMN 1D e 2D foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Biospin, Fourier 300 UltraShield (Bruker, Billerica, USA), operando com 7 Tesla (300 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente), utilizando como solvente metanol deuterado (CD_3OD , 99.8%). A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) semi-preparativa foi realizada em um sistema Shimadzu UFLC (bomba LC-6 AD; degaseificador DGU-20A5; detector SPD-20AV UV; comunicação modular CBM-20A) (Columbia, MD, USA) equipado com a coluna Shimadzu (shim pack) C18 ($5\mu\text{m}$, 250 mm x 20 mm). Para separação cromatográfica em coluna aberta (CC) foi utilizado sílica gel 60 (230–400 mesh; Merck). Todos os solventes usados na cromatografia líquida e espectrometria de massas foram de grau HPLC e adquiridos de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), e a água foi purificada usando um sistema Mili Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Reativação da linhagem fúngica

A linhagem de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) foi cedida pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), sendo proveniente do mesmo ambiente amazônico que outras linhagens conforme estudo realizado por Lima e colaboradores (2017).

A reativação da linhagem foi realizada em uma placa de petri contendo meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA) sendo incubado em DBO à 28 °C por 7 dias. Após este período, a cultura pura seguiu para o cultivo em escala laboratorial.

2.3 Obtenção dos extratos e determinação da concentração inibitória mínima – CIM

O cultivo em escala laboratorial da linhagem de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) ocorreu em 12 erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL dos seguintes meios de cultura BDL (Batata – Dextrose - Extrato de Levedura) – Batata 200 g/L, Dextrose 20 g/L e Extrato de Levedura 4 g/L; YES (Extrato de levedura – Sacarose)–Sacarose 150 g/L e Extrato de Levedura 20 g/L; ISP₂ (International Streptomyces Project 2) – 10 g/L de Amido, 4 g/L de Extrato de Levedura, 10 g/L de Glicose e 4 g/L de Malte; Sabouraud –20 g/L de Glicose e 10 g/L de Peptona.

O experimento foi realizado em triplicata ao longo de 15 dias a 28 °C. Após o tempo de cultivo, o material fermentado foi filtrado. O caldo foi extraído com acetato de etila na proporção 1:1 e o micélio com metanol por 48 horas. Após a eliminação do solvente, os extratos foram pesados e diluídos em DMSO 10% até a concentração de 2 mg/mL para determinação da CIM da atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas - *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), gram-negativas - *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC-10231) e *Candida tropicalis* (ATCC-13803). O teste foi realizado em placa de 96 poços conforme estabelecido pela Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS (2003). Para controle, utilizou-se Amoxicilina e Itraconazol. O teste foi acompanhado por 24 horas e após este tempo, foram adicionados 10 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e, foram considerados como resultados positivos os poços que não adquiriram a cor lilás após a adição do revelador. O resultado mais promissor foi selecionado para o cultivo em larga escala.

2.4 Extração em escala ampliada e isolamento dos compostos 1 e 2

Foi realizado um cultivo em escala laboratorial aumentada de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) em SB por 15 dias à 28 °C. Após este tempo o experimento foi filtrado, obtendo-se 4 L de caldo que foi extraído com acetato de etila na proporção 1:1. O extrato bruto (9,1 g) foi fracionado em coluna com sílica usando MeOH/H₂O como gradiente (30%, 60% e 100%) e dessa maneira foram

obtidas 3 frações. A fração 30% (6 g) foi purificada em fase reversa usando MeOH/H₂O como gradiente (10%, 30%, 50% e 100%), obtendo-se 4 subfrações. A subfração 30% (60,3 mg) foi purificada em CLAE preparativo usando uma coluna C18 Shim-pack CLC-ODS(M)[®] (5µm, 250 x 20 mm) com fluxo 12 mL/min e detecção de UV de 254 e 230 nm. O sistema de eluição foi isocrático com 45% Água (A) e Metanol (B) para se obter o composto **1** (4,6 mg) e **2** (2,6 mg). Posteriormente, os compostos foram submetidos as análises HRMS e 1D e 2D de RMN para a identificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos extratos de *P. purpurogenum*

A CIM para os extratos de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) foi determinada por microdiluição em multiplaca. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 4: Valores de CIM dos extratos de *P. purpurogenum* frente à diferentes patógenos.

Patógeno	Solvente de extração	Meio de cultivo	Concentração (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	Acoet	SB	31,25
	Acoet	ISP ₂	500
	MeOH	ISP ₂	1000
	Acoet	YES	62,5
<i>C. tropicalis</i>	Acoet	SB	250
<i>S. aureus</i>	Acoet	SB	125

MIC Amoxicilina: 12 µg/ml e Itraconazol: 125 µg/ml; SB – Sabouraud; ISP₂ - International Streptomyces Project 2, e YES – Extrato de levedura sacarose MeOH – Metanol e Acoet – Acetato de Etila

Dentre os resultados apresentados na tabela acima, pode-se destacar as atividades antifúngica e antibacteriana dos extratos obtidos a partir do acetato de etila em meio SB. Vale ressaltar que, de acordo com a literatura, fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela sua capacidade de produzir compostos bioativos que cessam ou inibem o crescimento de certos tipos de microrganismos (Batista, Raposo, & Silva, 2018). Do *P. purpurogenum* podem ser obtidos compostos com essa capacidade de diversas classes como os esteroides, terpenos, policetídeos, alcaloides, xantonas, dentre outros (da Silva, 2008; Chapla, Biasetto e Araujo, 2013; Yenn, Ibrahim, et al., 2017; Xue, 2020). A partir deste resultado, foi realizado o cultivo em escala ampliada, onde o extrato foi fracionado e purificado; resultando na obtenção do Composto 1 e 2.

3.2 Determinação estrutural

O composto (**1**) foi obtido como um sólido amorfo de coloração marrom escuro com HRESI(-)MS, m/z 251.0901. A fórmula molecular foi determinada como $C_{13}H_{15}O_5$ $[M-H]^-$ m/z 251.0925. Em adição, a fragmentação do composto (**1**) m/z 251, em ESI modo negativo, apresentou uma perda inicial de 44 Da originando o pico base m/z 207 (Figura 46) característico do policetídeo citrinina quando analisado em modo negativo (Marinho et al., 2005). Na figura 46B está apresentada uma proposta de fragmentação para o íon m/z 251 em ESI (-). Conforme proposto, o próton é removido do grupo carboxila da estrutura com posterior eliminação de CO_2 e o mesmo é observado para a citrinina (Marinho A. d., 2005).

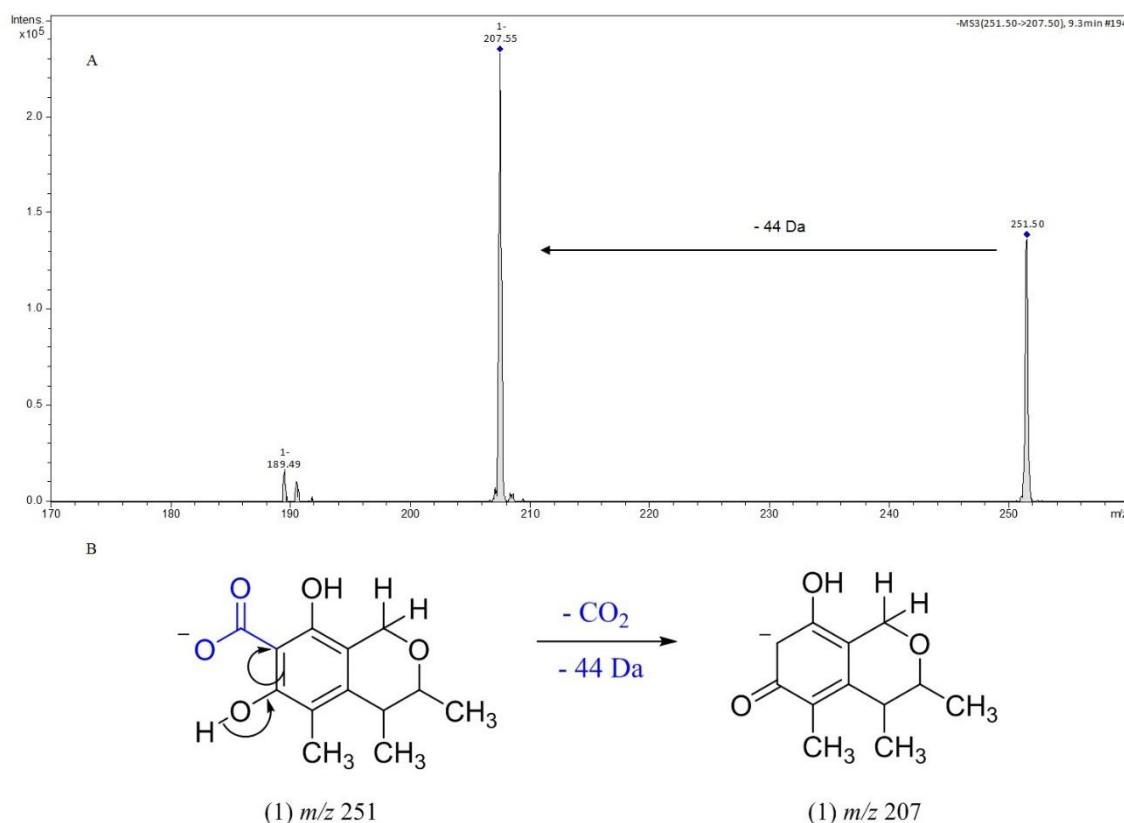


Figura 109: A - Espectro de MS/MS ESI $[M-H]^-$ do íon m/z 251. B – Proposta de fragmentação do íon m/z 251.

Todos os dados obtidos através de experimentos de RMN para o composto **1**, 1H , ^{13}C , HMBC e COSY, estão descritos na Tabela 9 e, os respectivos espectros RMN podem ser observados nas figuras suplementares 1 a 6 do material suplementar.

Tabela 5: Dados referentes aos espectros de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (300 MHz) da Dihidrocitrina (Composto1) em MeOD.

Posição	Composto 1			
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	COSY
1	4,61 (2H, d 7,2)	58,69	74,2/108,9/140,4/154,8	2,05/2,66
3	3,91 (1H, d 6,4)	74,2	19,42/58,69/140	1,27/2,66
4	2,66 (1H, q 6,4)	35,1	19,42/108/111/140	1,23
4a	-	140,0		
5	-	111,0		
6	-	157,0		
7	-	105,9		
8	-	154,8		
8a	-	108,8		
9	1,21 (3H, d 6,4)	16,7		
10	1,23 (3H, d 6,4)	19,4	35,1/74,2/140	
11	2,04 (3H, s)	8,6	111/140/157	
12*	-	-		

Ao observar os dados de RMN ^1H tem-se três sinais de hidrogênios característicos de metila em δ 1,21 (3H, d J =6,4 Hz), 1,23 (3H, d J=6,4 Hz) e um sinal mais desprotegido em δ 2,04 (3H, s), também foi observado um sinal em 4,61 (2H, J = 7,2 hz) indicando ser um metileno ligado a um oxigênio. Além destes sinais, um sinal de hidrogênio carbinólico em δ 3,91 (1H, d J=6,4 Hz) e outro em 2,66 (1H, q J=6,4Hz) que, segundo a literatura, correspondem a estrutura da citrinina e seus derivados (Haraguchi et al., 1989; Marinho et al., 2005). Com relação aos dados de RMN ^{13}C verifica-se a presença de 12 sinais de carbono, dos quais são proporcionais aos observados na literatura para a citrinina (Marinho et al., 2005; Valente, 2007) os seis sinais de carbono não hydrogenado em δ 157,0 ppm (C-6), δ 154,8 ppm (C-8), δ 140,0 ppm (C-4a), δ 111,0 ppm (C-5), δ 108,8 ppm (C-8a) e δ 105,9 ppm (C-7), três sinais de carbonos metílicos em δ 19,4 ppm (C-10), δ 16,7 ppm (C-9) e δ 8,6 ppm (C-11), um carbono metínico em δ 35,1 ppm (C-4) e um carbono carbinólico δ 74,2 ppm (C-3).

No entanto, ao observar o sinal de hidrogênio metilênico em δ 4,61 (2H, d J=7,2 Hz), que se correlaciona a longa distância (HMBC) com os carbonos δ 74,2 ppm (C-3) 108,9 ppm (C-8a), 140,4 ppm (4a), 154,8 ppm (C-8), verifica-se que este deslocamento não corresponde ao observado em espectros de RMN da citrinina (Poupko, Luz, & Destro, 1997; Marinho & Rodrigues-Filho, 2011). O mesmo acontece com o sinal de carbono metilênico em δ 58,69 ppm (C-1) (Valente, 2007). O sinal de carbono carboxílico (c-12*) não foi detectado nas análises de RMN realizadas no presente estudo, mas sua presença foi comprovada por experimentos de MS/MS. Isto ocorre pois o equilíbrio tautomérico que existe na estrutura da citrinina e seus derivados, envolvendo a

conversão da *orto*-quinina em *para*-quinona quando estão em solução, interfere nos experimentos de determinação estrutural desses compostos (Poupko, Luz, & Destro, 1997).

Considerando os dados apresentados, o composto **1** foi identificado como a dihidrocitrinina (figura 47), pois ao comparar os dados de RMN ^{13}C , ^1H e HRESI(-)MS com os descritos no estudo realizado por Deruiter e colaboradores (1992) e Clark e colaboradores (2006), observa-se que os sinais equivalentes às metilas, RMN ^{13}C δ 8,6 ppm, 16,7 ppm e 19,4 ppm, e os sinais correspondentes ao carbonos do anel aromático, RMN ^{13}C δ 111,7 ppm, 157,3 ppm e 154,2 ppm coincidem com os observados no presente estudo, bem como a fórmula e massa molecular.

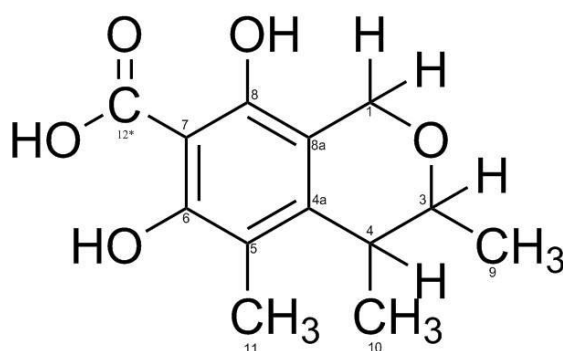


Figura 110: Estrutura química da dihidrocitrinina.

O composto **(2)**, apresentou um sólido amorfo de coloração marrom amendoado com HRESI(-)MS, m/z 265.0727. A fórmula molecular foi determinada como $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 265.0718. Ao observar os dados de fragmentação por ESI em modo negativo do composto **(2)** de m/z 265, verificou-se que o íon apresenta duas possibilidades de perda inicial (figura 48A). Uma de 18 Da que leva a formação do íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 247 e outra mais relevante de 44 Da que conduz a formação do pico base de $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 221. Na figura 48B está apresentada uma proposta de fragmentação para o íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 265 com perda de CO_2 que é característico de derivados da citrinina (Marinho A. d., 2005).

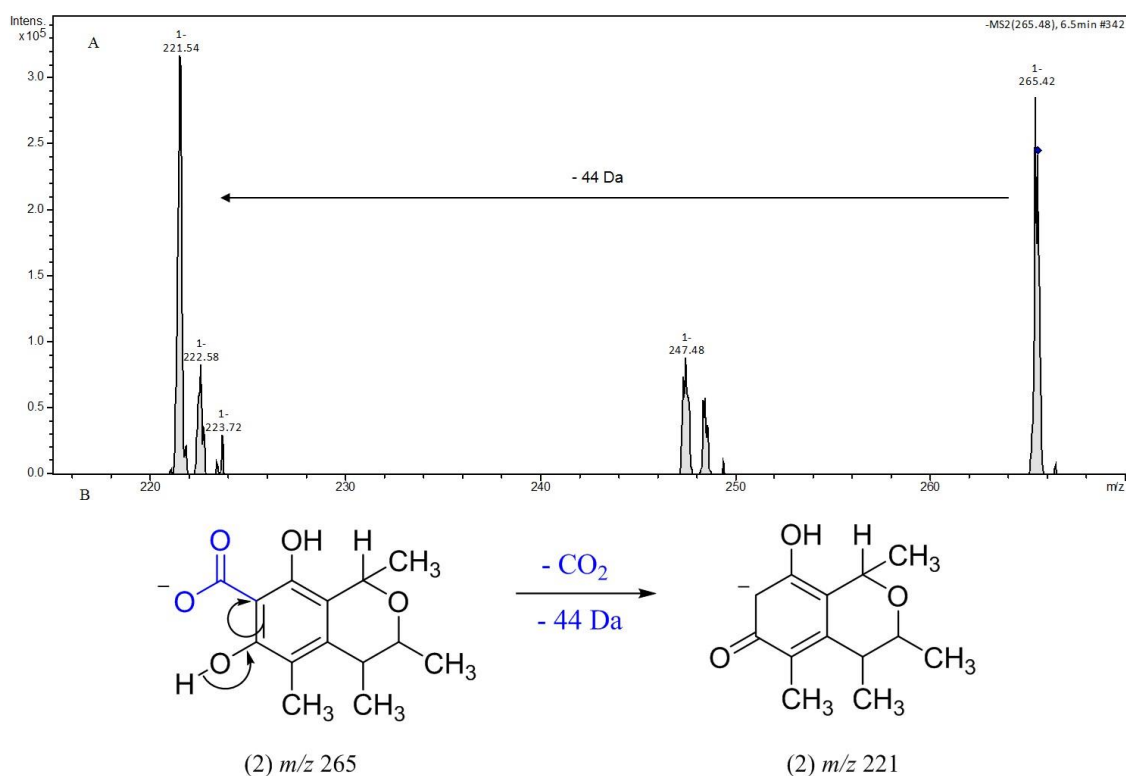


Figura 111: Espectro de MS/MS ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$ do íon m/z 265. B – Proposta de fragmentação do íon m/z 265.

Os dados obtidos através de experimentos de RMN para o composto **2**, ^1H , ^{13}C , HMBC e COSY, estão descritos na Tabela 10, os respectivos espectros RMN podem ser observados nas figuras suplementares 7 a 12 do material suplementar.

Tabela 6: Dados referentes aos espectros de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (300 MHz) da 1-Metildihidrocitrina (Composto2) em MeOD.

Posição	Composto 2			
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	COSY
1	4,54 (1H, m)	77,9	17,9/74,37/110,8/146,5/163,9	1,25
3	1,22 (1H, m)	74,3		
4	3,08 (1H, q 6,7)	35,0	17,9/146,5	1,29
4a	-	146,5		
5	-	112,4		
6	-	154,3		
7	-	-		
8	-	163,9		
8a	-	110,8		
9	1,25 (3H, d 6,7)	18,4		
10	1,29 (3H, d 6,7)	17,9	35,05/77,9/146,5	
11	1,21 (3H, d 6,7)	16,8	35,05	
12	2,09 (3H, s)	8,5	112,4/146,5	
13	-	178		

Ao observar os dados de RMN ^1H observa-se alguns sinais muito similares ao da dihidrocitrinina como o sinal de metila desprotegido em δ 2,04 (3H, s). Entretanto, observa-se três sinais de metila com deslocamentos

próximos em δ 1,29 (3H, d J=6,7 Hz), δ 1,25 (3H, d J =6,7 Hz) e δ 1,21 (3H, d 6,7), e três sinais de hidrogênios metínicos em δ 4,54 (1H, m), δ 1,22 (1H, m) e δ 3,08 (1H, q J=674Hz), indicando a presença de um grupo metila na posição 1, diferente da dihidrocitrinina que tem dois hidrogênios ligados ao carbono 1. Foram observados 13 sinais carbonos no ^{13}C RMN, sendo eles cinco sinais de carbonos não hydrogenados em δ 163,9 ppm (C-8), δ 154,3 ppm (C-6), δ 146,5 ppm (C-4a), δ 112,4 ppm (C-5) e δ 110,8 ppm (C-8a), quatro carbonos metílicos em δ 18,4 ppm (C-9), δ 17,9 ppm (C-10), δ 16,8 ppm (C-11) e δ 8,5 ppm (C-12), dois carbonos metínicos em δ 77,9 ppm (C-1) e δ 35,0 ppm (C-4) e por fim um carbono carbinólico em δ 1,22 ppm (C-3).

Os sinais de RMN ^1H e ^{13}C do composto (2) são muito similares ao da dihidrocitrinina, obtida no presente estudo, e da citrinina (Haraguchi et al., 1989; Marinho et al., 2005; Valente, 2007). Porém, as diferenças entre o composto (2) e a dihidrocitrinina são a presença do sinal de hidrogênio em δ 1,25 (3H, d J=6,7 Hz), ligado ao carbono em δ 18,4 ppm (C-9), e a mudança do deslocamento químico do C-1 nas estruturas que muda de δ 58,69 ppm para δ 77,9 ppm, mostrando ser característico de grupo CH ligado a um átomo de oxigênio. Sendo assim, sugere-se que o composto (2) é a 1-metildihidrocitrinina (figura 49) (Wang et al., 1950; Warren et al. 1957). De acordo com estudo realizado por Warren e colaboradores (1957) a 1-metildihidrocitrinina foi descrita como um produto de origem sintética, sendo seu precursor a citrinina. Não sendo encontradas outras referências sobre este composto, tem-se o primeiro relato da obtenção desta substância por meio de um fungo do gênero *Penicillium*.

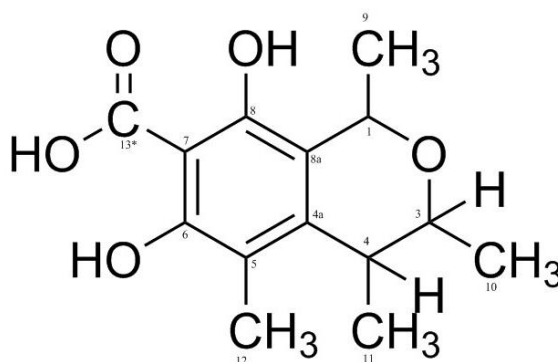


Figura 112: Estrutura química da 1-metildihidrocitrinina.

Vale ressaltar que a citrinina e seus derivados são compostos com relativa facilidade de produção, identificação e isolamento (Valente, 2007) além disso, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas a antibacteriana

(Wang, Hong, Hwang, & Fan, 1947; Warren, Dougherty, & Wallis, 1957) é uma das mais exploradas, pois atualmente certos microrganismos como o *Staphylococcus aureus* e o *Enterococcus* spp. se mostram resistentes a certos antibióticos (Cruz, Costa, & Figueroa-Villar, 2016). Logo, existe uma elevada necessidade pela busca de novos compostos antimicrobianos e os derivados da citrinina, como a dihidrocitrinina e 1-metil-dihidrocitrinina, são bons candidatos para este propósito.

Estudos em semissíntese, que utilizaram a citrinina para obtenção dos seus derivados, mostram que atividade antimicrobiana do derivado pode ser superior à atividade do seu precursor. Diante desse fato, Warren e colaboradores (1957) realizaram modificações estruturais por meio de substituições C-1 da citrinina e concluíram que substituintes alquil ou benzil podem aumentar a atividade antimicrobiana quando comparado com a citrinina não substituída.

Outras atividades biológicas descritas na literatura são a antiprotozoária, antifúngica e imunossupressora (Franco, et al., 1996; Betina & Baráthová, 1968; Carvalho, Fernandes, & Freire, 2005). Há relatos que esses compostos são inibidores da biossíntese macromoléculas como os triglicerídeos, DNA e RNA (Carvalho, Fernandes, & Freire, 2005).

Com relação aos organismos produtores da citrinina e seus derivados, a literatura reporta que fungos como o *Aspergillus candidus*, *Monascus ruber*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium citrinum* (Deruiter, Jacyno, et al., 1992; Marinho, Rodrigues-Filho, et al., 2005; Clark, Capon, et al., 2006; Lu, et al., 2008). No entanto, o presente estudo utilizou o *Penicillium purpurogenum* (CFAM – 214), como organismo produtor de metabólitos secundários que apresentaram atividade antimicrobiana que, está seguramente associada a presença da dihidrocitrinina e a 1-metildihidrocitrinina. Destaca-se que, nesta espécie não são encontrados relatos na literatura sobre os compostos obtidos no presente estudo.

4. CONCLUSÃO

Conforme apresentado no presente estudo, os testes de Concentração Inibitória Mínima – CIM dos extratos brutos obtidos a partir do cultivo de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) em diferentes meios, revelaram um elevado

potencial de inibição dos patógenos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *S. aureus*, para estudos posteriores, determinar a atividade antimicrobiana das frações.

De maneira adicional, foi possível determinar através de técnicas analíticas de elevada exatidão, a presença de dois derivados da citrinina ainda não descritos em uma linhagem de *P. purpurogenum* (CFAM – 214) isolado no Amazonas, a saber, a 1-metil-dihidrocitrinina e a dihidrocitrinina, bem como sua eventual atividade antimicrobiana. Logo, o presente estudo contribui para o conhecimento dos metabólitos secundários bioativos que podem ser obtidos a partir de fungos do gênero *Penicillium*.

5. REFERÊNCIAS

- Batista, B. N., Raposo, N. V., & Silva, I. R. (2018). Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. *Revista Fitos*. <http://DOI 10.5935/2446-4775.20180015>
- Betina, V., & Baráthová, H. (1968). Citrinin - an inducer of permeability changes in *Eremothecium ashbyi*. *The Journal of Antibiotics*. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.21.628>
- Birch, A. J., Fitton, P., Pride, E., Ryan, A. J., Smith, H., & Whalley, W. B. (1958). Studies in relation to biosynthesis. Part XVII. Sclerotiorin, citrinin. *Journal of The Chemical Society*.
- Carvalho, C. A., Fernandes, B. C., & Freire, R. B. (2005). Supressão da resposta imunitária humoral causada pela citrinina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000200005>
- Chapla, V. M., Biasetto, C. R., & Araujo, A. R. (2013). Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Rev. Virtual Quim*. <https://orcid.org/0000-0001-7616-9652>
- Clark, B. R., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., & Gill, J. H. (2006). Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, 1520-1528. <https://doi.org/10.1039/B600960C>
- Colombo, C., Gennari, C., Potenza, D., Scolastico, C., & Aragozzini, F. (1981). Biosynthesis of citrinin and synthesis of its biogenetic precursors. *Journal of the Chemical Society*. <https://doi.org/10.1039/P19810002594>
- Cruz, J. S., Costa, G. L., & Figueroa-Villar, J. D. (2016). História, Aplicações, Atividade e Modificações da Citrinina. *Revista Virtual de Química*, pp. 650-664. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160049>
- da Paz, F. S. (2020). *SELEÇÃO DE FUNGOS AUTÓCTONES PARA BIORREMEDIAÇÃO DO IGARAPÉ JUDIA DA CIDADE DE RIO BRANCO - ACRE*. Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

DA SILVA, J. C. (2008). *PERFIL DA VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE Penicillium DO ACERVO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DPUA*. Universidade Federal do Amazonas - Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica, Manaus.

Damodaran, C., Ramados, C. S., & Shanmugasundaram, R. B. (1973). A rapid procedure for the isolation, identification and estimation of citrinin. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90052-3)

de Lima, A. K., Ribeiro, J. S., de Souza, I. d., Rodrigues, J. C., de Souza, T. C., Maia, C. R., & Fernandes, O. C. (2017). Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: potencial patogênico. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 12(6), 1017-1024. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2018>

Deruiter, J., Jacyno, J. M., Davis, R. A., & Cutler, H. G. (1992). Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. i. citrinin and related benzopyran derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition*, 6(3), 201-210. <https://doi.org/10.3109/14756369209020170>

Dresch, F., Lana, D. D., & Maciel, M. J. (2019). Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 10(6). <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.006.0007>

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., Samson, R. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 201-241.

Ghanbari, M. A., Mohammadkhani, H. S., & Babaeizad, V. (2014). Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species. *Mycologia Iranica*, 1(1). <https://doi.org/10.22043/MI.2014.11594>

Guimarães, D. O. (2010). *Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "Caenorhabditis elegans"*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Hajjaj, H., Kláébé, A., Loret, M., Goma, G., Blanc, P. J., & François, J. (1999). Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.1.311-314.1999>.

Haraguchi, H., Taniguchi, M., Tanaka, T., Oi, S., & Hashimoto, K. (1989). Citrinin, an Electron Acceptor Having Antifungal Activity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(6), 1741-1742. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869532>

He, Y., & Cox, R. J. (2016). The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. *Chemical Science*, 7, 2119-2127. Doi: 10.1039/c5sc04027b

Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. *Studies in Mycology*, 70, 53-138. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.02>

Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Divers*, 44, 117-133. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0047-z>

- KHETHR, F. B. (2008). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Trichoderma* sp. growing in Tunisia. *Annals of microbiology*, 58, 303-308.
- Lu, Z. Y., L., Z. J., Wang, W. L., Du, L., Zhu, T. Z., Fang, Y. C., Zhu, W. M. (2008). Citrinin Dimers from the Halotolerant Fungus *Penicillium citrinum* B-57. *Journal of Natural Products*, 71(4), 543-546. <https://doi.org/10.1021/np0704708>
- Marinho, A. d. (2005). *Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero Penicillium associados às plantas Murraya paniculata (Rutaceae) e Melia azedarach (Meliaceae)*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos: Tese de doutorado em Ciências com ênfase em Química Orgânica.
- Mapari, S. A., Meyer, A. S., Thrane, U. (2006). Colorimetric Characterization for Comparative Analysis of Fungal Pigments and Natural Food Colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7027-7035. <https://doi.org/10.1021/jf062094n>
- Marinho, A. M., Rodrigues-Filho, E. (2011). Dicitrinol, a Citrinin Dimer Produced by *Penicillium janthinellum*. *Helvetica Chimica Acta*, pp. 835-841. DOI : <https://doi.org/10.1002/hlca.201000309>
- Marinho, A. M., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M. d., & Santos, L. S. (2005). Biologically Active Polyketides Produced by *Penicillium janthinellum* Isolated as an Endophytic Fungus from Fruits of *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc*, 16(2), 280-283. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000200023>
- Molinari, G. (2009). Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. *Pharmaceutical Biotechnology*, 655, 13-27. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1132-2_2
- Murshid, S. S., Badr, J. M., & Youssef, D. T. (2016). Penicillosides A and B: new cerebrosides from the marine-derived fungus *Penicillium* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.007>
- NCCLS. (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition, NCCLS document M2-A8*. The National Committee for Clinical Laboratory Standards., 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania.
- Poupko, R., Luz, Z., & Destro, R. (1997). Carbon-13 NMR of Citrinin in the Solid State and in Solutions. *The Journal of Physical Chemistry A*, pp. 5097-5102. <https://doi.org/10.1021/jp970681t>
- Samson, R. A., Pitt, J. I. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Harwood Academic, Amsterdam*.
- Santos, C. M., Costa, G. L., & Figueroa-Villar, J. D. (2012). Identification of citrinin as the defense metabolite of *Penicillium corylophilum* stressed with the antagonist fungus *Beauveria bassiana*. *Natural Products Research* . <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.668690>
- Sokovic, M., & al, e. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14, 238-249. <https://doi.org/10.3390/molecules14010238>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiologia* (12 ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Valente, A. M. (2007). *O uso da RMN na caracterização e quantificação de metabólitos produzidos por microorganismos com potencial biotecnológico*. São Carlos - SP

- WANG, H., & al., e. (2011). Anti-influenza Virus Polyketides from the Acid-Tolerant Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. *J. Nat. Prod*, 74, 2014-2018. <https://doi.org/10.1021/np2004769>
- Wang, Y., Hong, F. K., Hwang, F. T., & Fan, C. (1947). Citrinin as an antibiotic. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.106.2752.291>
- Wang, Y., Tu, C. T., & Ting, H. S. (1950). Citrino pinacol. *Science Record (China)*, pp. 213-220.
- Warren, H. H., Dougherty, G., & Wallis, E. (1957). The synthesis and antibiotic activity of analogs of citrinin and dihydrocitrinin. *Journal of American Chemistry Society*. <https://doi.org/10.1021/ja01571a051>
- Xue, J.; Li, H.; Wu, P.; Xu, L.; Yuan, Y.; Wei, X.; (2020). Bioactive Polyhydroxanthones from *Penicillium purpurogenum*. *J. Nat. Prod.*, 83, 1480-1487. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01071>
- Yenn, T. W., Ibrahim, D., Chang, L. K., Ab Rashid, S., Ring, L. C., Nee, T. W., & Noor, M. I. (2017). Antimicrobial efficacy of endophytic *Penicillium purpurogenum* ED76 against clinical pathogens and its possible mode of action. *Korean Journal of Microbiology*, 53, 193-199. <https://doi.org/10.7845/kjm.2017.7022>

6 MATERIAL SUPLEMENTAR

Potencial antimicrobiano de *Penicillium purpurogenum* isolado no Amazonas e identificação de derivados da citrinina

Figura suplementar 1: Espectro de RMN de ^1H da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 2: Espectro de RMN de ^{13}C da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 3: Espectro de Dept da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 4: Mapa de correlação COSY da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 5: Mapa de correlação HMBC da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 6: Mapa de correlação HSQC da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 7: Espectro de RMN de ^1H da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 8: Espectro de RMN de ^{13}C da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 9: Espectro de Dept da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 10: Mapa de correlação COSY da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 11: Mapa de correlação HMBC da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

Figura suplementar 12: Mapa de correlação HSQC da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

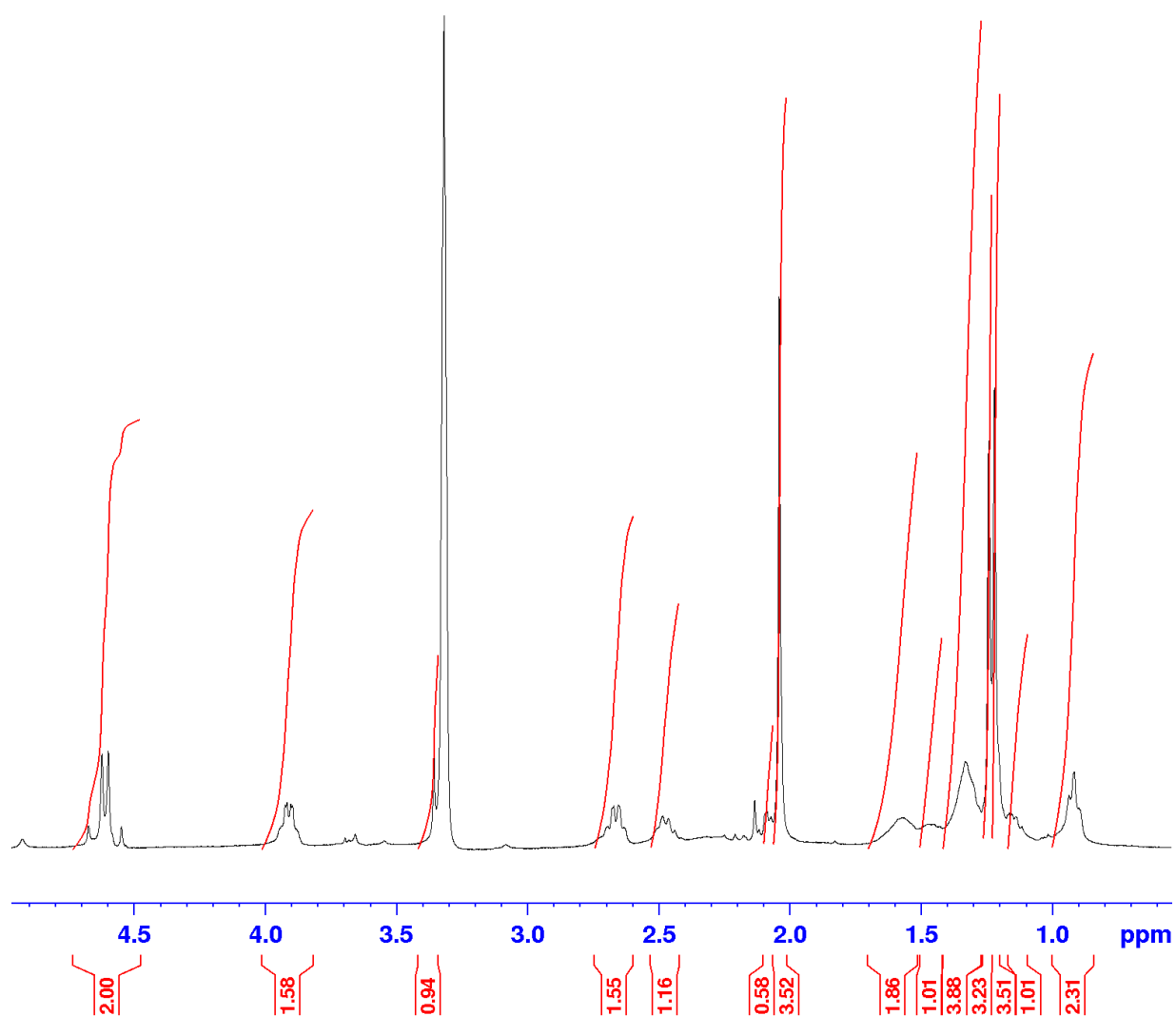


Figura suplementar 1: Espectro de RMN de ^1H da dihidrocitrinina em metanol- d_4 .

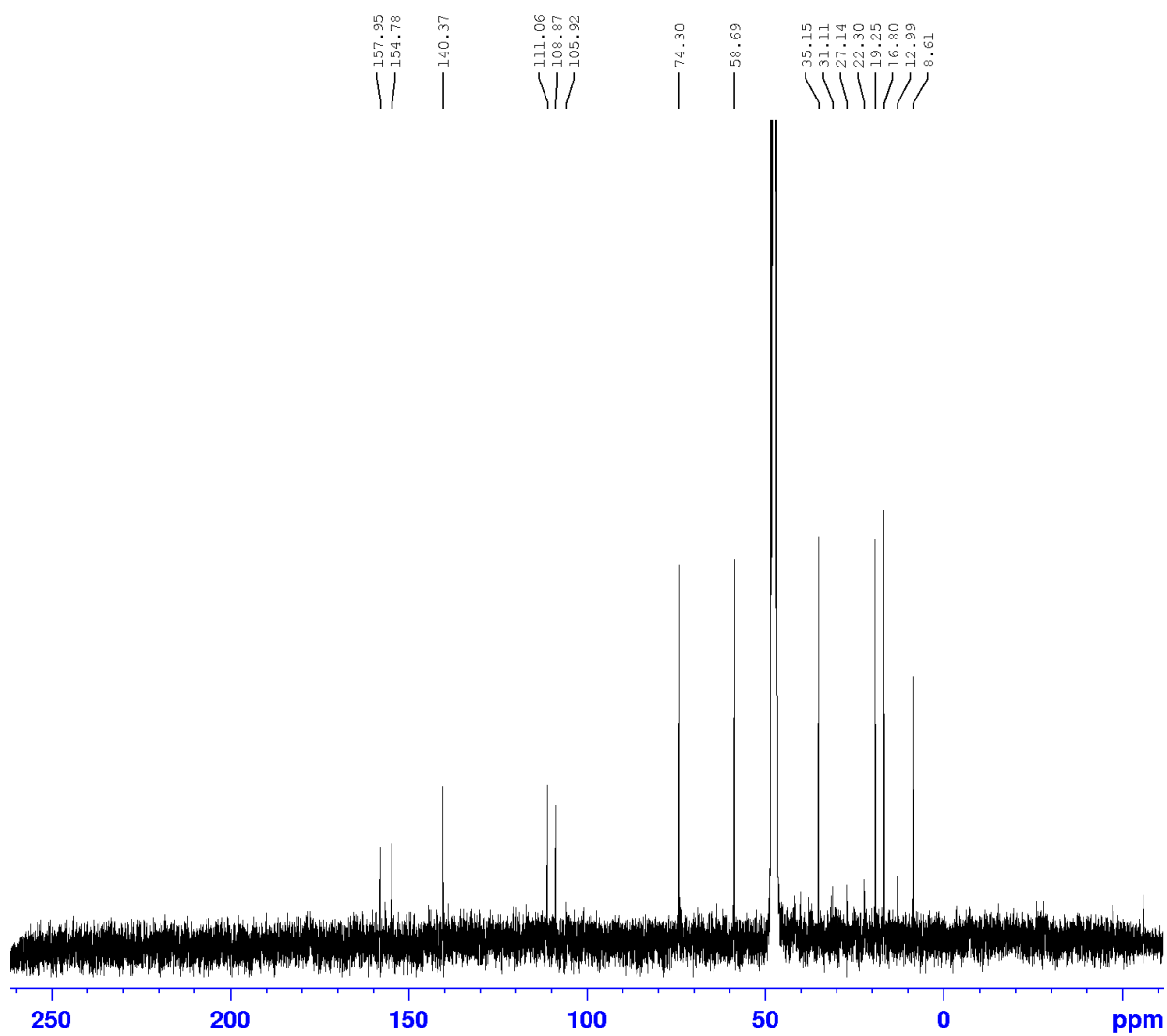


Figura suplementar 2: Espectro de RMN de ¹³C da dihidrocitrinina em metanol-d₄.

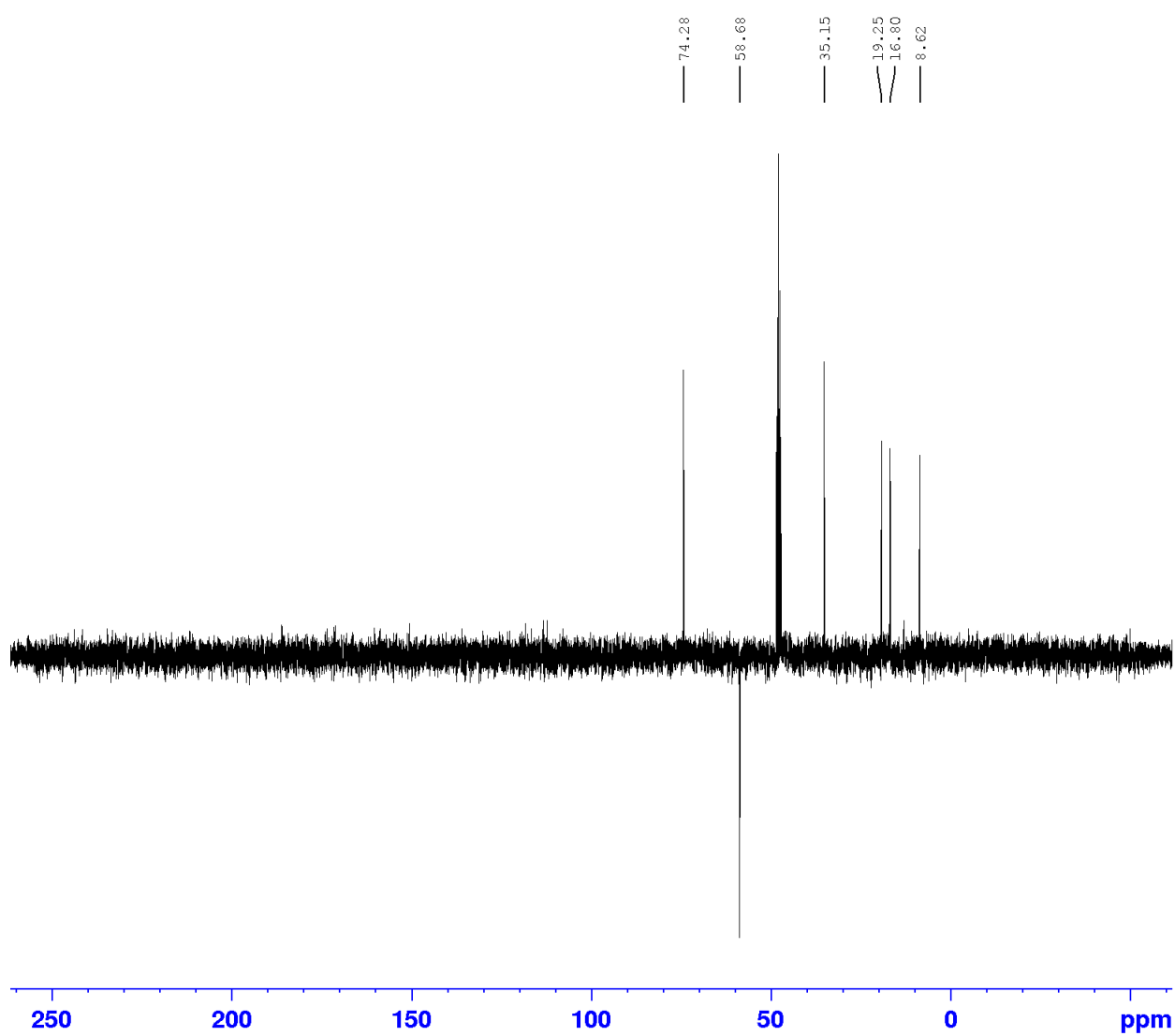


Figura suplementar 3: Espectro de Dept da dihidrocitrinina em metanol-d₄.

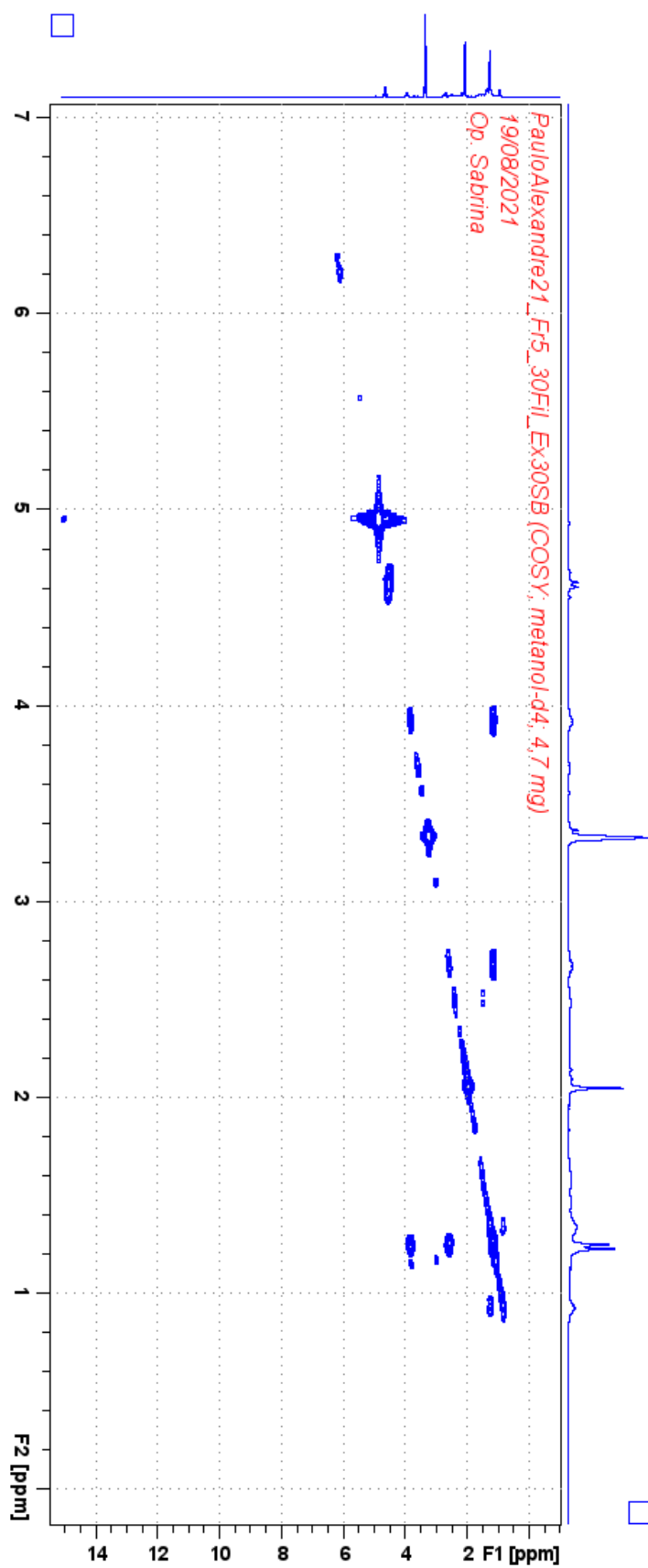


Figura suplementar 4: Mapa de correlação COSY da dihidrocitrinina em metanol-d₄.

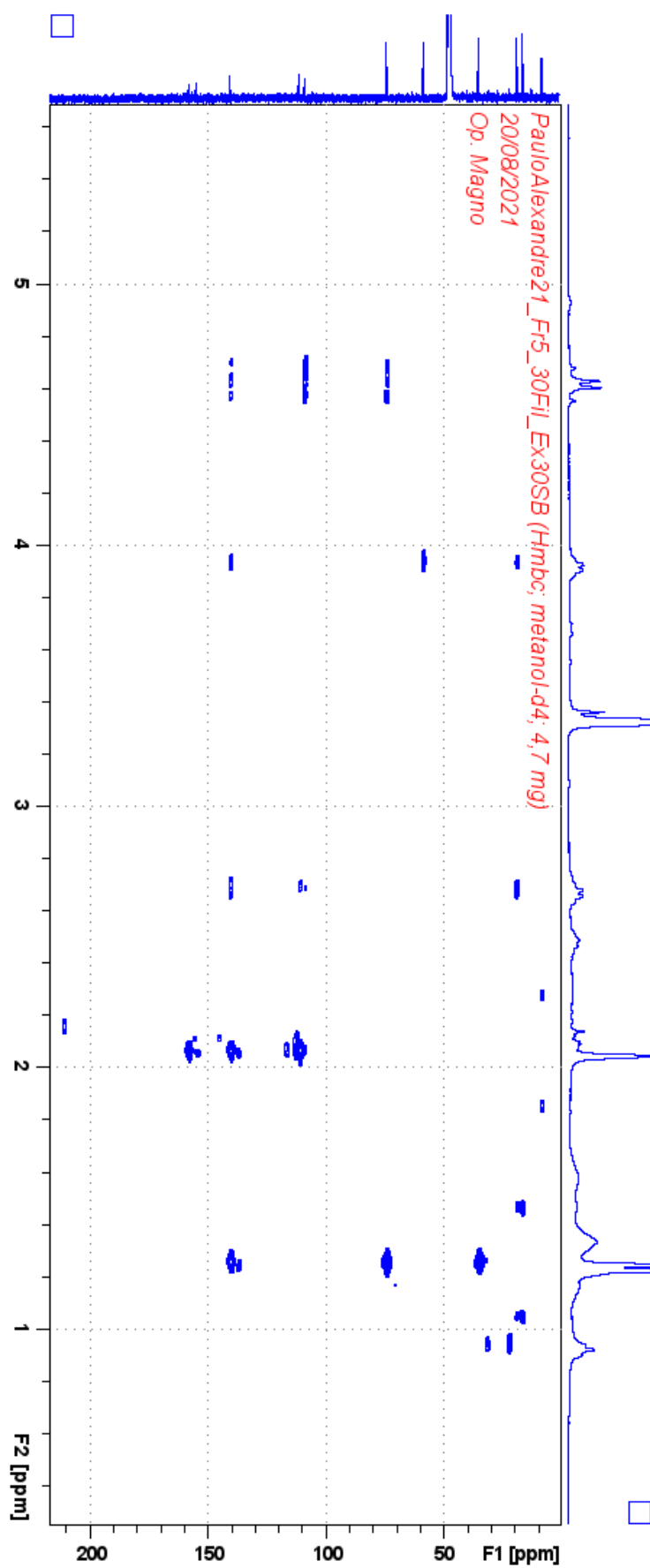


Figura suplementar 5: Mapa de correlação HMBC da dihidrocitrinina em metanol-d₄.

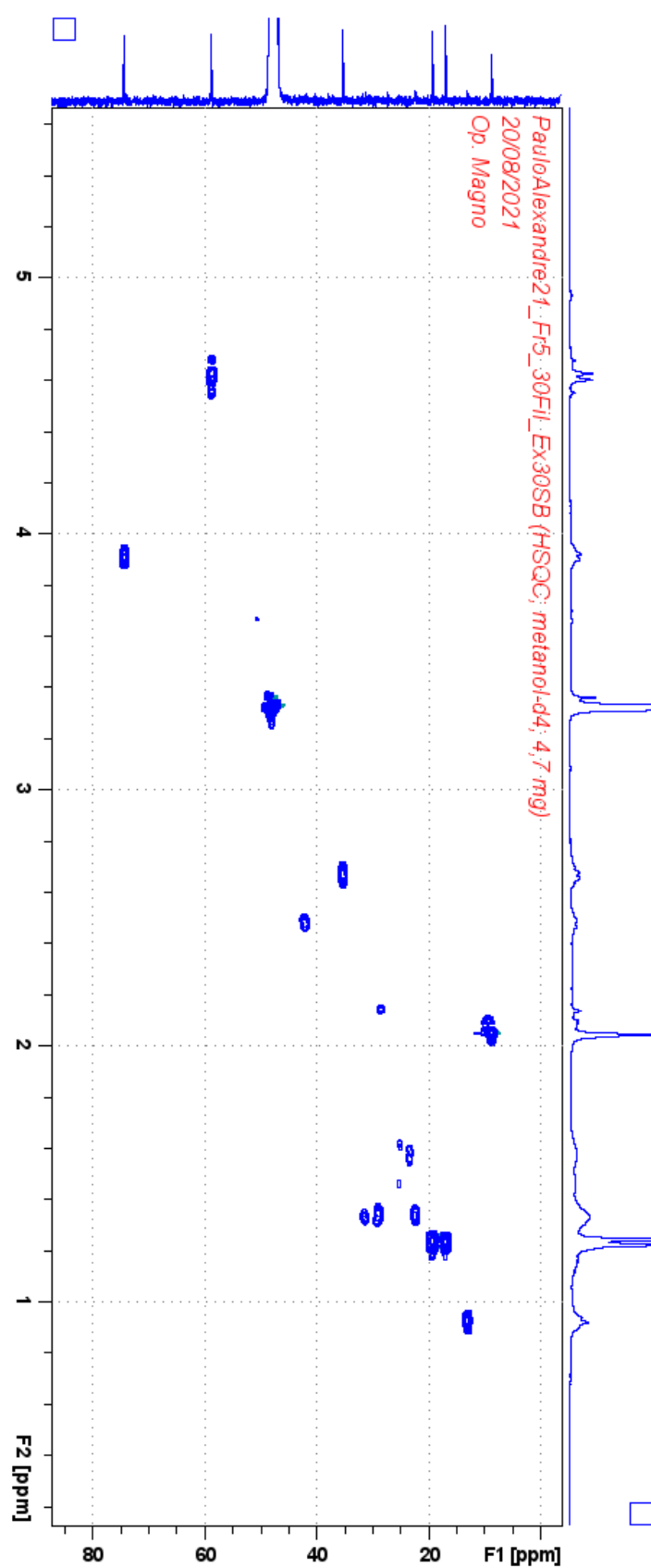


Figura suplementar 6: Mapa de correlação HSQC da dihidrocitrinina em metanol-d₄.

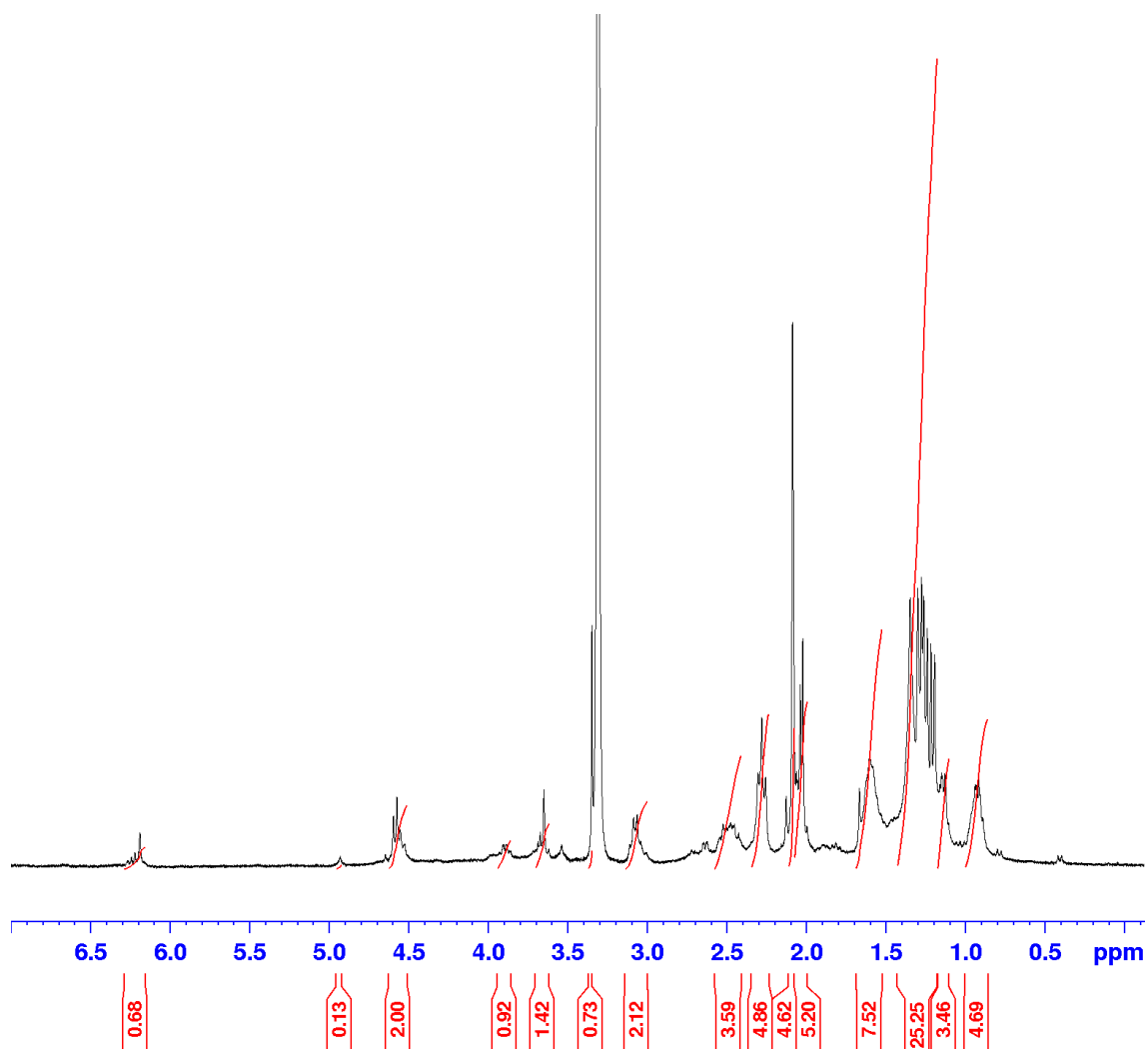


Figura suplementar 7: Espectro de RMN de ^1H da 1-metil-dihidrocitronina em metanol- d_4 .

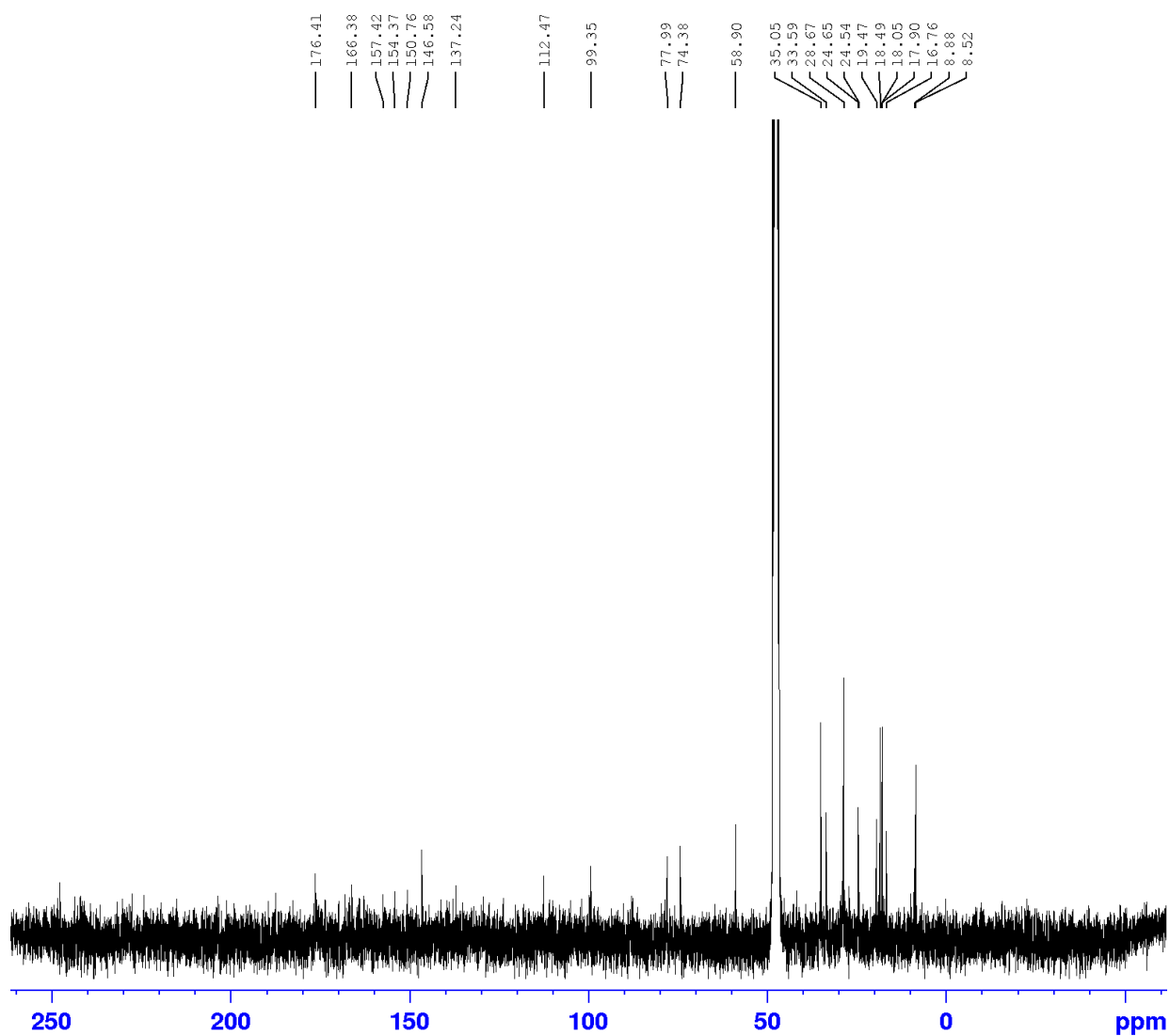


Figura suplementar 8: Espectro de RMN de ^{13}C da 1-metil-dihidrocintrina em metanol- d_4 .

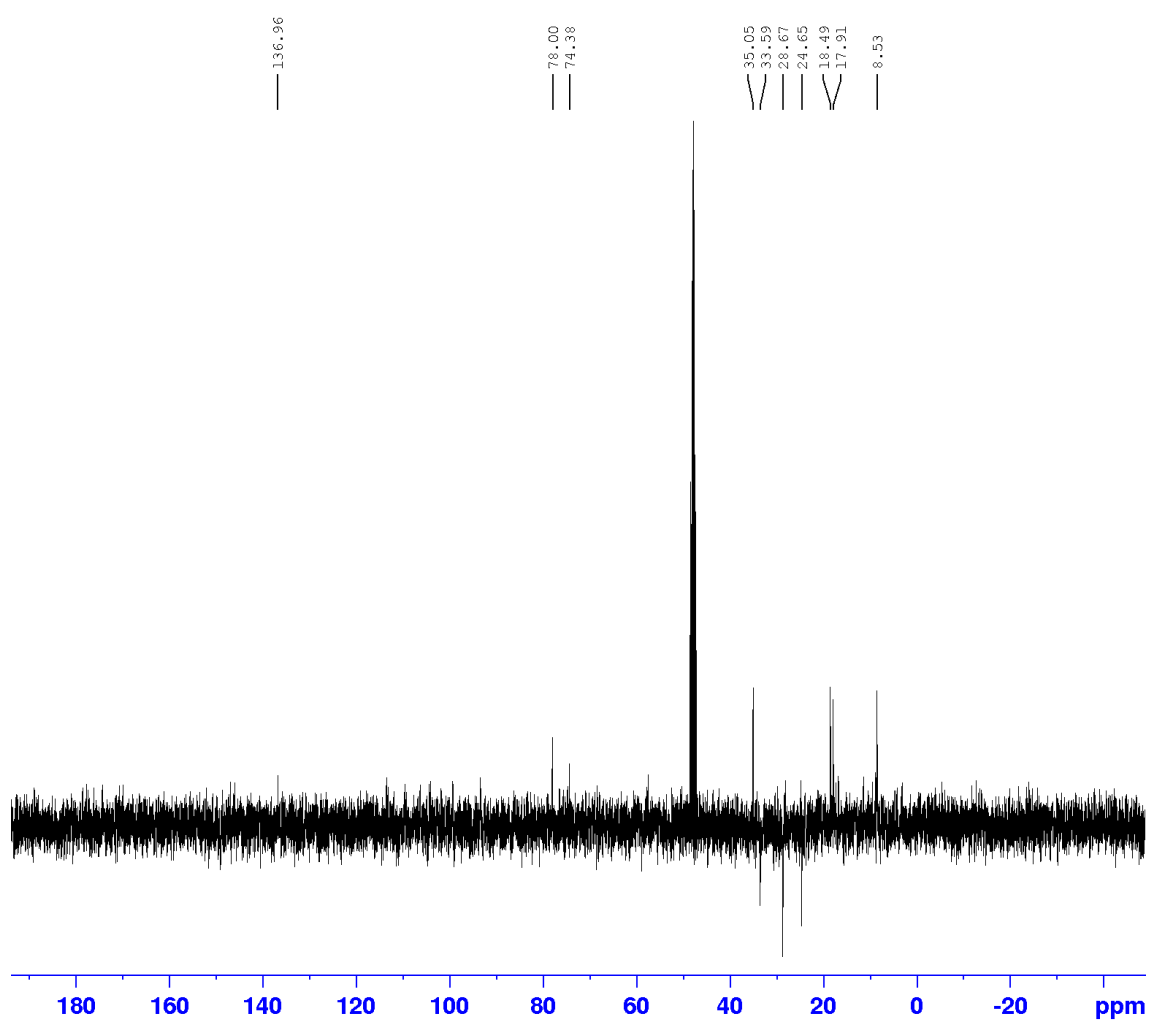


Figura suplementar 9: Espectro de Dept da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol-d₄.

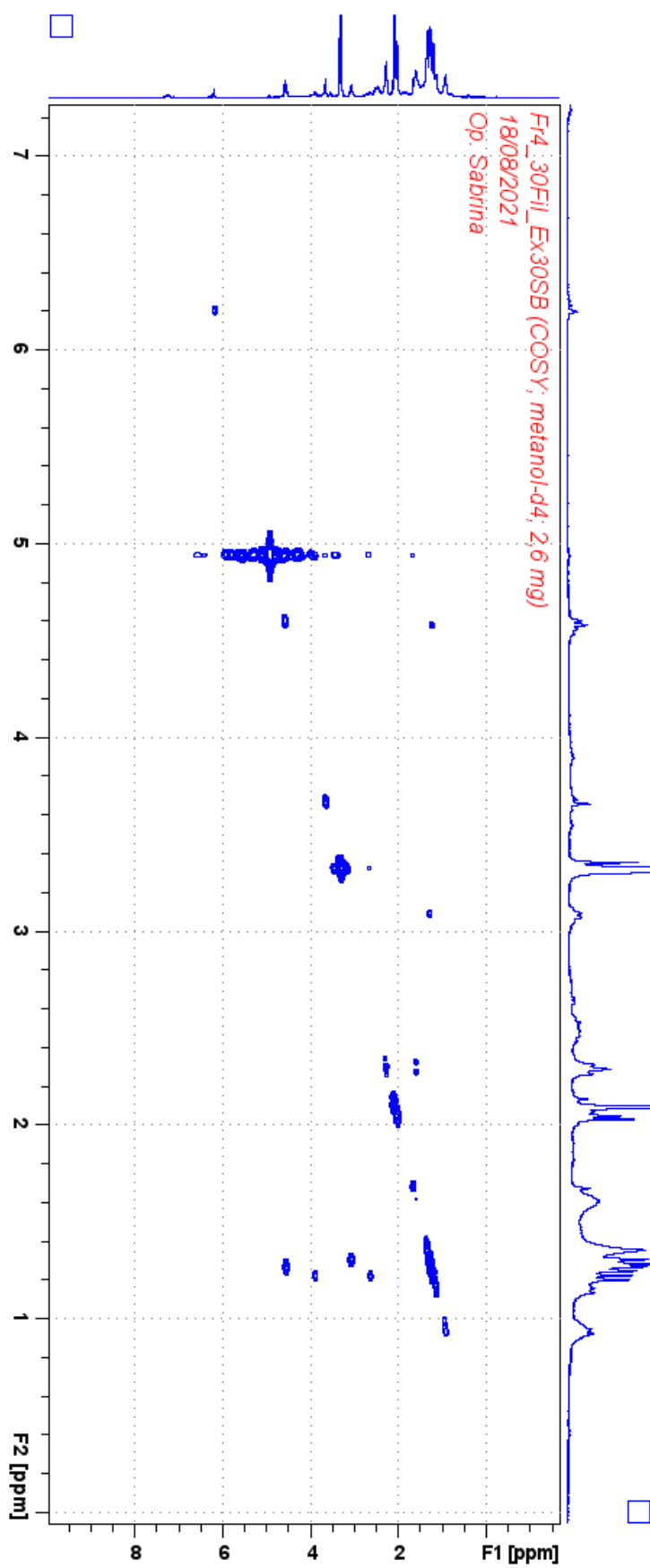


Figura suplementar 10: Mapa de correlação COSY da 1-metil-dihidrocintrina em metanol-d₄.

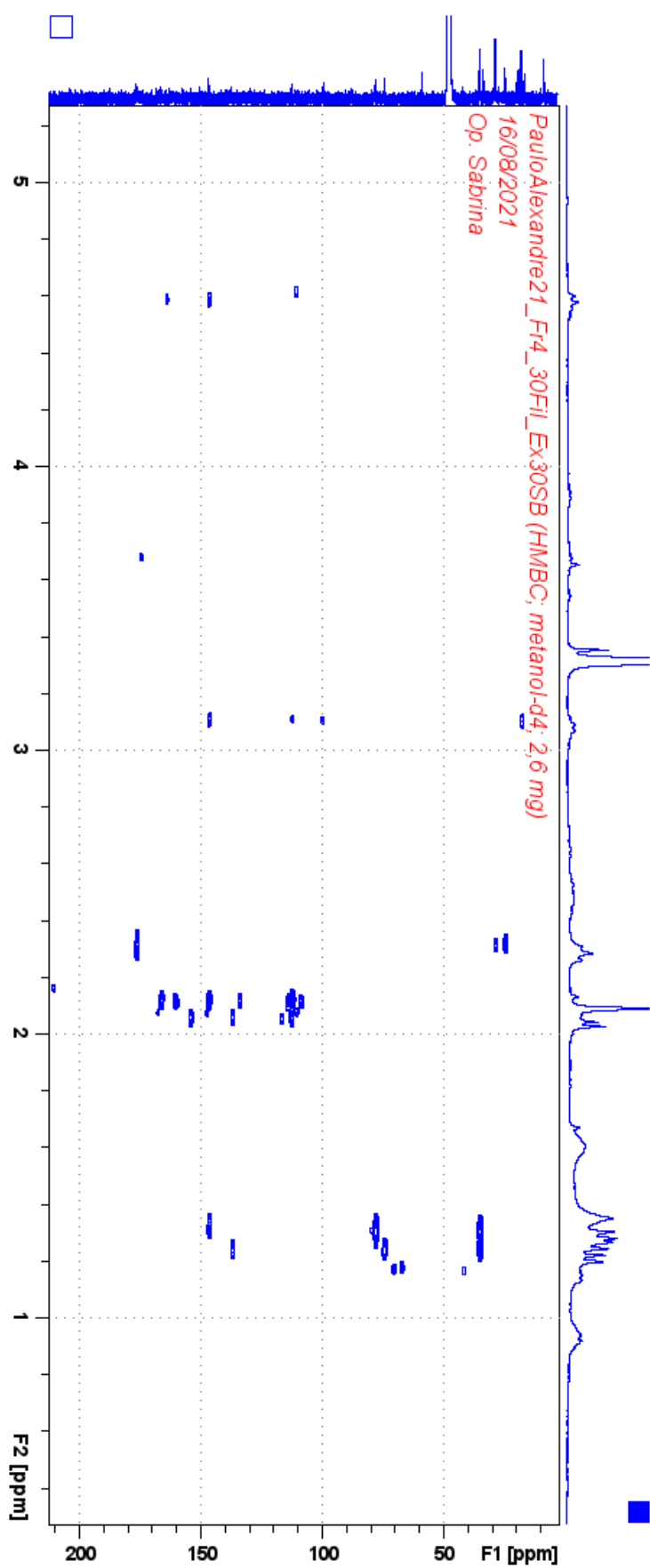


Figura suplementar 11: Mapa de correlação HMBC da 1-metil-dihidrocitrinina em metanol-d₄.

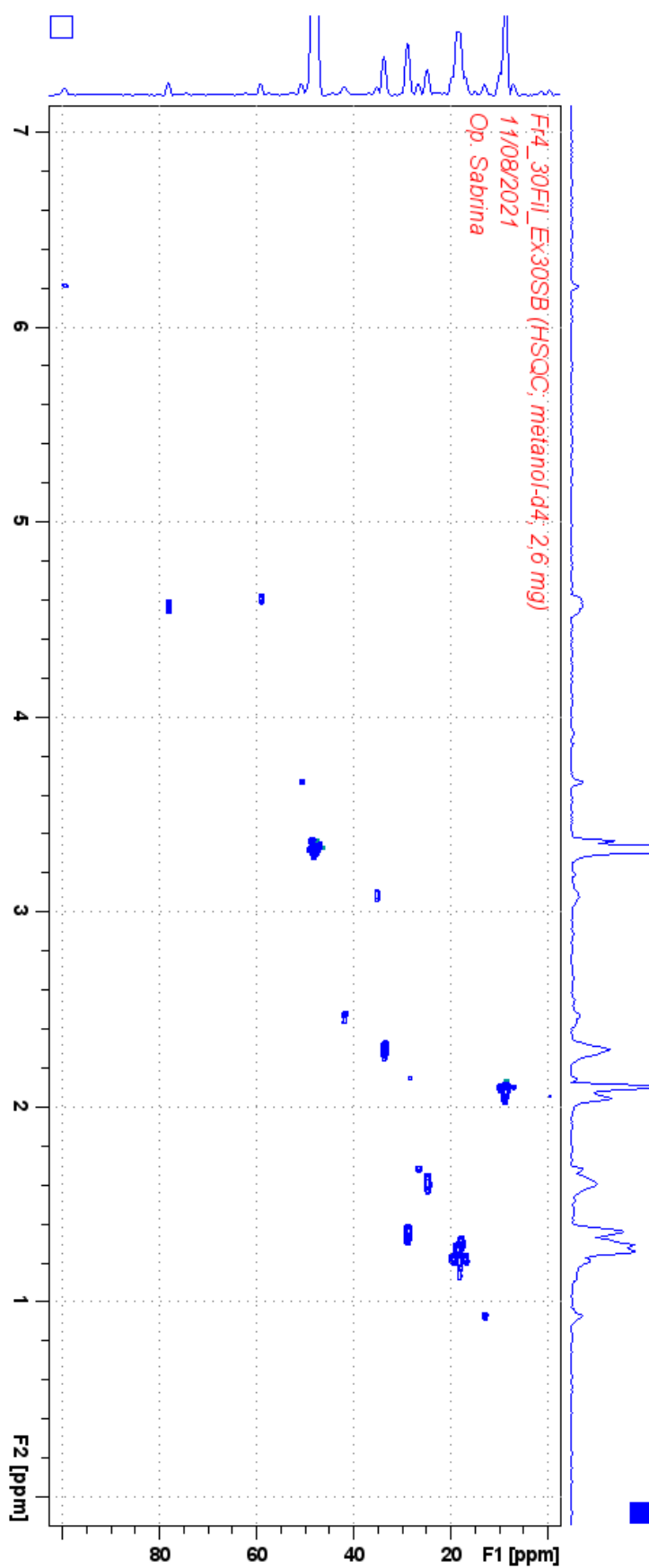


Figura suplementar 12: Mapa de correlação HSQC da 1-metil-dihidrocintrina em metanol-d₄.