

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

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE UMA LINHAGEM DO
PENICILLIUM CITREOSULFURATUM

RICHELLY DOS SANTOS ANDRADE
MESTRADO

ORIENTADOR:
DR. AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA – DQ/UFAM

MANAUS/AM

2023

RICHELLY DOS SANTOS ANDRADE

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE UMA LINHAGEM DO
*PENICILLIUM CITREOSULFURATUM***

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

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

MANAUS/AM

2023

Ficha Catalográfica

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

A553e Andrade, Richelly dos Santos
Estudo químico e biológico de uma linhagem do *Penicillium citreosulfuratum* / Richelly dos Santos Andrade . 2023
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.


1. Policetídeo. 2. Alcalóides. 3. Citreoviridina. 4. Isorugulosuvina.
5. 10Z-isocitreoviridinol. I. Souza, Afonso Duarte Leão de. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

*ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE UMA LINHAGEM
DO PENICILLIUM CITREOSULFURATUM*

RICHELLY DOS SANTOS ANDRADE

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


Aprovada em, 15 de setembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 **AFONSO DUARTE LEAO DE SOUZA**
Data: 19/09/2023 21:59:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **WALDIRENY ROCHA GOMES**
Data: 21/09/2023 10:37:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

WALDIRENY ROCHA GOMES (PPGQ/UFAM)
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA FLACH**
Data: 21/09/2023 14:36:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ADRIANA FLACH (UFRR)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 15 de setembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, por todos os ensinamentos e dedicação prestados ao longo destes anos, pela paciência, compreensão e por todo auxílio fornecido, serei eternamente grata.

À Dr^a. Antônia Queiroz Lima de Souza, que me introduziu na microbiologia com paciência e dedicação, por todos os ensinamentos fornecidos e auxílio nos momentos de necessidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa de estudos fornecida, vital para o andamento deste projeto.

À Universidade Federal do Amazonas, por fornecer o mestrado em química através do Programa de Pós-graduação em Química, dando oportunidade para a qualificação de inúmeros profissionais na região norte.

À Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas, por fornecer a infraestrutura necessária para muitos dos experimentos realizados.

Aos professores Dr. Anderson Guimarães e Dr. Geone Maia, pelas contribuições prestadas durante o exame de qualificação.

À toda equipe do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), em especial ao Dr. Felipe Moura, por todos ensaios realizados, pelos ensinamentos e conselhos fornecidos ao longo destes anos.

À equipe do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), em especial ao Me. Kidney Neves, por todos os ensaios realizados.

À equipe do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Dr. Ricardo de Melo Katak, ao Me. Juan Campos de Oliveira, a Me. Vernilce Alves Muniz e a Dr^a. Rosemary Aparecida Roque, por todos os ensaios larvicidas empreendidos.

À toda equipe do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA) do instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (ILMD), em especial a Dr^a. Patrícia Puccineli Orlandi, a Dr^a. Elizângela Farias da Silva e a Me. Ivanildes dos Santos Bastos, pela realização dos ensaios antiplasmódicos e de citotoxicidade.

À toda equipe do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LabMICRA), em especial ao Fagner, Kamila, Rosângela, Mauro, Rafael, Douglas e Elisson, por toda ajuda com os ensaios microbiológicos.

A minha mãe, Eliana dos Santos Barnett, meu padrasto Dr. Adrian Paul Ashton Barnett, pela instrução e por todo apoio prestado nas horas mais difíceis. Às minhas irmãs, Keron Andrade e Tereza Barnett e meus cunhados Renato Kuster e Leandro Lima, pela amizade, suporte emocional e apoio durante os ensaios de qualificação, o qual foi fundamental para que fosse possível chegar até aqui.

A minha amada filha, Alice Julie Andrade Silva, meu amor de outras vidas, minha força e vontade de vencer.

RESUMO

Os fungos endofíticos são uma fonte rica de produtos naturais com diversas atividades biológicas, apresentando grande potencial para a indústria alimentícia e farmacêutica. A produção de metabólitos fúngicos *in vitro* pode ser otimizada através de técnicas que envolvem a química, bioquímica e biologia molecular, com um custo associado relativamente baixo. Apesar de serem importantes fontes de compostos bioativos, a diversidade dos fungos endofíticos, especialmente os do gênero *Penicillium*, ainda é explorada de forma insuficiente no Brasil, em especial na região amazônica. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar os metabólitos secundários produzidos por uma linhagem de *Penicillium citreosulfuratum* preservado na coleção do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA) da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM. Assim, a linhagem de *P. citreosulfuratum* codificada como M167 (LabMicrA 1245) foi cultivada em meio líquido BDL a partir de esporos preservados na coleção do LABMICRA. Durante o cultivo, que contou com o monitoramento do nível de glicose e pH, alíquotas foram separadas e analisadas através de inserção direta em espectrômetro de massas (MS). As frações mais relevantes, baseado nas análises de MS, foram preparados e submetidos a fracionamentos em coluna aberta e HPLC, utilizando-se C-18 como fase estacionária. Em adição, os extratos foram submetidos a ensaios larvicida, antimicrobiano e citotoxicidade. Através das análises por MS foi possível desreplificar o policetídeo citreoviridina na fração Pc3. Por sua vez, o fracionamento cromatográfico resultou no isolamento do alcalóide isorugulosuvina e do policetídeo 10Z-isocitreoviridinol. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que *P. citreosulfuratum* é uma valiosa fonte de metabólitos secundários com atividades biológicas diversas. Essas descobertas destacam o potencial promissor dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium* presentes na região amazônica como fonte de produtos naturais para aplicações biotecnológicas. No entanto, mais pesquisas são necessárias para explorar a linhagem estudada e a diversidade e potencial biotecnológico dos fungos endofíticos existentes na região amazônica.

Palavras-chave: policetídeo, alcalóides, citreoviridina, isorugulosuvina, 10Z-isocitreoviridinol

Abstract

Endophytic fungi are a rich source of natural products with diverse biological activities, presenting great potential for the food and pharmaceutical industries. The production of fungal metabolites in vitro can be optimized through techniques involving chemistry, biochemistry and molecular biology, with a relatively low associated cost. Despite being important sources of bioactive compounds, the diversity of endophytic fungi, especially those of the genus *Penicillium*, is still insufficiently explored in Brazil, especially in the Amazon region. Therefore, the objective of the present work was to investigate the secondary metabolites produced by a strain of *Penicillium citreosulfuratum* preserved in the collection of the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon (LABMICRA) of the Analytical Center of the Multidisciplinary Support Center of UFAM. Thus, the *P. citreosulfuratum* strain coded as M167 (LabMicrA 1245) was cultivated in BDL liquid medium from spores preserved in the LABMICRA collection. During cultivation, which included monitoring the level of glucose and pH, aliquots were separated and analyzed by direct insertion into a mass spectrometer (MS). The most relevant fractions, based on MS analyses, were prepared and subjected to open column fractionation and HPLC, using C-18 as the stationary phase. In addition, the extracts were subjected to larvicide, antimicrobial and cytotoxicity assays. Through MS analysis it was possible to dereplicate the polyketide citreoviridin in the Pc3 fraction. In turn, the chromatographic fractionation resulted in the isolation of the alkaloid isorugulosuvine and the polyketide 10Z-isocitreoviridinol. In conclusion, the present work demonstrated that *P. citreosulfuratum* is a valuable source of secondary metabolites with diverse biological activities. These findings highlight the promising potential of endophytic fungi of the genus *Penicillium* present in the Amazon region as a source of natural products for biotechnological applications. However, more research is needed to explore the studied lineage and the diversity and biotechnological potential of the endophytic fungi found in the Amazon region.

Keywords: polyketide, alkaloids, citreoviridin, isorugulosuvine, 10Z-isocitreoviridinol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem microscópica de um micélio (maestrovirtuale.com).	16
Figura 2. Fluxograma filogenética do Reino Fungi, abrangendo Filos de maior destaque, Classe e Ordem (adaptado de Kirk et al., 2008).....	18
Figura 3. Alimentos e medicamentos oriundos de fungos (preparaenem.com/biologia/importância-dos-fungos).....	20
Figura 4. Estrutura do diterpenóide Taxol isolado do fungo <i>Taxomyces Andreanea</i> (Strobel, 1993).	21
Figura 5. Estrutura da citocatalasina H2 isolado do fungo <i>Xylaria</i> sp. (Yu Li et al., 2012).	21
Figura 6. Conídio do fungo do gênero <i>Penicillium</i> (preparaenem.com/biologia/penicilina).	21
Figura 7. Conidióforos monoverticilados (A), biverticilados (B e C), terverticilados (D) e poliverticilados (E) (Visagie et al., 2014).	25
Figura 8. Linha superior (esquerda para direita), CYA, MEA, YES. Linha inferior (esquerda para direita) CYA, MEA E YES reverso, <i>P. citreosulfuratum</i> (Biourge, Cellule 33: 285 ,1923).	27
Figura 9. Estrutura química da citreoviridina (Barbosa et al., 2019).....	28
Figura 10. Fungos preservados e inóculos tripontuais, respectivamente....	33
Figura 11. Acompanhamento do crescimento do fungo, linhagem M167 <i>P. citreosulfuratum</i> (LabMicrA 1245) e controle de amostras, respectivamente.....	34
Figura 12. CLC em coluna aberta C-18.....	35
Figura 13. Esquema de SPE: 1 – corpo de uma seringa dentro do qual a fase solida é compactada entre dois filtros, 2 – condicionamento, 3 – extração, 4 – lavagem, 5 – eluição: recuperou-se os analitos retidos na fase solida pela percolação de um pequeno volume de metanol.....	36
Figura 14. Extratos concentrados, separados por eluição Pc1, Pc3, Pc2, Pc4 e precipitado formado, respectivamente.	36
Figura 15. CCD das 4 amostras Pc1, Pc2, Pc3, Pc4 e precipitado do extrato do meio cultivado pela linhagem M167, respectivamente. Placas de C-18 eluídas com: H2O/MeOH/Acetona (0,5:8:1,5) (1), Hex./AcOEt/Acetona (5:4:1) (2), H2O/MeOH/Acetona (5:4:1) (3). Placa (4)	37

Figura 16. CCD das frações I (9) e J (10), eluente utilizado Hex/AcOEt (1:1) 0,3 mL de MeOH e 0,25 mL de acetona.	39
Figura 17. Coluna C-8 empacotada.	40
Figura 18. Execução da coluna C8 e frações coletadas.	40
Figura 19. CCD das frações coletadas. Eluente: Hex/AcOEt (1:1) 0,3 mL de MeOH, 0,25 mL de acetona e 0,15 mL de ácido acético.	41
Figura 20. Fração Pc3I6 (1), aplicação (2), eluição (3), pós eluição em CCDP (4).	42
Figura 21. CCDP em camara de luz UV-A 365 nm (1) e luz UV-C 254 nm (2)	42
Figura 22. Componentes retidos a placa denominados A, B, C, D, E, F, G.	43
Figura 23. Amostras retiradas da placa preparativa para posterior filtração.	43
Figura 24. SPE das frações coletadas da amostra Pc3I6C.	44
Figura 25. Fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema I.	48
Figura 26. Continuação do fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema II	49
Figura 27. Fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema III	50
Figura 28. Resultado da análise de citotoxicidade das frações frente a célula MRC5.	54
Figura 29. GRAM NEGATIVA – Pseudomonas aeruginosa. As frações correspondentes aos poços estão no quadro 1	55
Figura 30. GRAM POSITIVA – Enterococcus faecalis. As frações correspondentes aos poços estão no quadro 1	56
Figura 31. As amostras analisadas frente a Pseudomonas aeruginosa e Enterococcus faecalis.	56
Figura 32. Estrutura da micotoxina citreoviridina.	58
Figura 33. Fragmentação do íon m/z 403,3 (M+H) em fonte APCI.	59
Figura 34. Fragmentação do anel de cinco membros da citreoviridina.	59
Figura 35. Espectro de massas da amostra Pc3P5 (modo positivo).	61
Figura 36. Espectro de massas da amostra Pc3P5 (modo negativo).	62
Figura 37. Espectro de RMN de 1H (500 MHz, CD3OD) da amostra Pc3P5.	63

Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5 na região de 5-7.5 ppm.	63
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5.	64
Figura 40. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5.	65
Figura 41. Ampliação do mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5 na região de 5,5-8 ppm.	65
Figura 42. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5.	66
Figura 43. Ampliação do mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5 na região de 5,5-8 ppm.	66
Figura 44. Estrutura da isorugulosuvina devidamente numerada.....	68
Figura 45. Estrutura da isorugulosuvina e suas correlações.	68
Figura 46. Espectro de massas da amostra Pc3H2 (modo positivo).	70
Figura 47. Espectro de massas da amostra Pc3H2 (modo negativo).	71
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2.	72
Figura 49. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2 na região de 5-7.5 ppm	72
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2.	73
Figura 51. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2	74
Figura 52. Ampliação do mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2 na região de 5,5-8 ppm.	74
Figura 53. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2.	75
Figura 54. Ampliação do mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2 na região de 5,5-8 ppm.	75
Figura 55. Estrutura do 10Z-isocitreoviridinol devidamente numerada.....	77
Figura 56. Estrutura do 10Z-isocitreoviridinol e suas correlações.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos Micológicos Recentes na Amazônia envolvendo o gênero <i>Penicillium</i>	23
Quadro 2. Publicações envolvendo espécies do gênero <i>Penicillium</i>	29
Quadro 3. Métodos utilizados em análises HPLC.	46
Quadro 4. Resultados do teste antimicrobiano.....	56

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Rendimento das frações da coluna Sephadex.....	38
Tabela 2. Rendimento das frações de Pc3I.....	40
Tabela 3. Rendimento das frações de Pc3I6C.....	43
Tabela 4. Fragmentação m/z da amostra Pc3I6C7.....	45
Tabela 5. Fragmentação m/z da amostra Pc3.	47
Tabela 6. Classificação de citotoxicidade	52
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da amostra Pc3P5.....	67
Tabela 8. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da amostra Pc3H2.....	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Reino Fungi	16
2.2 Metabólitos secundários de fungos	20
2.3 O gênero <i>Penicillium</i>	21
2.4 <i>Penicillium citreosulfuratum</i>	25
3. OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Levantamento bibliográfico dos metabólitos dos fungos <i>P. Citreosulfuratum</i>	33
4.2 Reativação da linhagem e preparo da suspensão de esporos	33
4.3 Crescimento fúngico em escala preparativa laboratorial	34
4.4 Obtenção de extratos	34
4.5 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	37
4.6 Fracionamento por coluna Sephadex LH20	37
4.7 Fracionamento por CLC C-8	39
4.8. Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP)	41
4.9. Identificação dos metabólitos	44
4.9.1. Análise espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)	44
4.9.2. Análises por espectrometria de massas dos extratos	45
4.10 Ensaio de extratos	51

4.10.1 Ensaio de atividade larvicida.....	51
4.10.2 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	51
4.10.3 Teste antimicrobiano.....	53
4.10.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio em placas de microdiluição.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
5.1 Ensaio biológico.....	54
5.1.1 Ensaio de atividade larvicida.....	54
5.1.2 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
5.1.3 Teste antimicrobiano.....	55
5.2 Parte química.....	57
5.2.1 Caracterização da citreoviridina.....	57
5.2.2. Caracterização da isorugulosuvina.....	60
5.2.3. Caracterização da 10Z-isocitreoviridinol.....	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam o interior dos órgãos vegetais, podem apresentar estruturas aparentes ou não, sem causar qualquer patogenicidade a planta (Banhos et al., 2014), em troca, através de seus metabólitos secundários, fornece ao seu hospedeiro hormônios de crescimento ou antibióticos (Takahashi & Lucas, 2008).

A busca por novas fontes de substâncias com relevância farmacológica, vem dando cada vez mais visibilidade a esses microrganismos fúngicos, devido sua larga capacidade de adaptação a vários meios de cultura, curto período de vida e diversidade em métodos de manipulação. Os fungos endofíticos, em especial, sintetizam uma ampla gama de produtos naturais com diversas atividades biológicas (Pinheiro et al., 2013), os quais são produzidos na fase final do crescimento celular e, quando secretados no meio de cultura, podem ser identificados e isolados para posterior uso na indústria alimentícia ou produção de fármacos (Specian et al., 2014).

Dentre as substâncias mais conhecidas, o taxol, ácido micofenólico e as estatinas ganham destaque (Demain e Sanchez, 2009; Takahashi et al., 2013; Liu et al., 2016), devido ao uso no tratamento do câncer (Liu et al., 2016), profilaxia na rejeição de órgãos (Fleck et al., 2009) e prevenção de aterosclerose (Albuquerque et al., 2004), respectivamente.

A produção de metabólitos de origem fúngica *in vitro* apresenta baixo custo e boa otimização, os quais são utilizadas técnicas que envolvem, química, bioquímica, biologia molecular. Vale ressaltar que as condições de cultivo influenciam diretamente na produção desses metabólitos, ou seja, variando parâmetros como meio de cultura, temperatura e afins, pode-se obter os mais diversos produtos naturais (Bader et al., 2010).

Embora os fungos endofíticos sejam uma importante fonte de compostos bioativos, sua diversidade no Brasil ainda é investigada de forma insuficiente, principalmente aquelas existentes na região amazônica (Freire; Vasconcelos; De Lima Coutinho, 2014) e, com base nisso, pode-se afirmar a necessidade de estudos químicos acerca de espécies de *Penicillium*, pois conforme a literatura apresentada, este gênero é uma fonte promissora de produtos naturais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reino Fungi

Os fungos compreendem um grupo diverso de organismos eucarióticos caracterizados por paredes celulares compostas por quitina (com alguma celulose) e reprodução por esporos ou conídios. Embora algumas formas (leveduras: ascomicetos) sejam unicelulares, a maioria dos fungos é multicelular e caracterizada por um corpo constituído de filamentos (hifas), os quais têm a espessura de uma célula. Os fungos são heterotróficos, alimentando-se através de absorção por meio de uma rede de hifas em forma de teia (o micélio) (Figura 1). Os alimentos são digeridos por exoenzimas e depois absorvidos. Ao contrário das plantas e semelhante aos animais, eles armazenam alimentos como glicogênio (não amido). Os fungos são avasculares, não móveis e têm alternância de gerações. A reprodução pode ser sexuada (meiótica) e assexuada (mitótica) dependendo da espécie e das condições (Kirk et al., 2008). No que diz respeito a interação com plantas, podem ser de forma simbiótica, neutra ou antagônica, as quais induzem a produção de metabólitos úteis, promovendo resistência a estresses bióticos e abióticos, tais como, insetos-praga, fungos, bactérias, vírus e nematóides, déficit hídrico entre outros (Kogel; Franken; Huckelhoven, 2006).



Figura 1. Imagem microscópica de um micélio (maestrovirtuale.com).

As características bioquímicas adicionais incluem: a presença de um esterol único, ergosterol, nas membranas das células fúngicas (substituindo o colesterol encontrado nos animais); uma via única de biossíntese de lisina; uma forma única de proteína de microtúbulo, formada durante a divisão nuclear; a

posse de núcleos muito pequenos, com baixíssima quantidade de DNA repetitivo; a mitose é alcançada sem a dissolução do envelope nuclear (Spooner & Roberts 2005; Takahashi et al., 2013).

Como não são fotossintéticos, os fungos podem viver em áreas escuras, crescendo em qualquer direção e as hifas podem invadir o interior de um substrato para se alimentar, expandindo muito a área física sobre a qual irão se alimentar (Takahashi et al., 2017). No passado, isso levou a um sucesso notável, com enormes picos na abundância de esporos de fungos após extinções em massa no período geológico Permiano, último período da Era Paleozoicas, e na fronteira K-T (entre os períodos Cretáceo e Terciário) (Spooner & Roberts, 2005).

Os primeiros fósseis de fungos são de hifas anastomosadas com cerca de 2,4 bilhões de anos na Era Paleoproterozóica (Bengston et al., 2017). Essas formas eram aquáticas, com a colonização da terra ocorrendo no período Siluriano, como evidenciado pelos registros de *Tortotubus Protuberans* 440 my bp (Pratt et al., 1978); estes são considerados os registros mais antigos conhecidos de um organismo terrestre multicelular (Wellman 1995).

Os fungos são um dos cinco principais reinos eucarióticos, os quais fungos modernos são colocados no filo Eumycota (fungos verdadeiros); um nome usado para distingui-los dos fungos viscosos e aquáticos estruturalmente semelhantes, que formam os filios Myxomycetes e Oomycetes (protistas). Eumycota é dividido em 8 sub-reinos, dos quais Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Chytridiomycota tem maior destaque, e atualmente são conhecidas cerca de 120.000 espécies de fungos, embora as estimativas de sua verdadeira diversidade variem de 2,2 a 3,8 milhões de espécies (Hawsksworth & Lucking 2017).



Figura 2. Fluxograma filogenética do Reino Fungi, abrangendo Filos de maior destaque, Classe e Ordem (adaptado de Kirk et al., 2008).

Assim, as aproximadamente 99.000 espécies de fungos estudados até agora, representam uma porcentagem muito pequena da total diversidade dos fungos (Quevedo et al., 2012). Destas, cerca de 1000 espécies são conhecidas na Amazônia (Alfredo, 2012), embora proporcionalmente poucas tenham sido estudadas em detalhes, tais como, biotecnologia, botânica, farmacologia, ecologia, taxonomia (Cavalcante et al., 2020).

Essa falta de conhecimento é refletida pelo fato de que os fungos são um dos poucos organismos não microscópicos com espécies ainda sendo descobertas em regiões bem estudadas como Europa Ocidental e América do Norte (Duarte et al., 2016; Shearer et al., 2007; Vellinga 2004). Embora as áreas tropicais do mundo tenham uma diversidade de espécies muito maior do que as zonas temperadas (Blackwell 2011), a soma de fatores como a falta de micologistas tropicais, os desafios logísticos a serem enfrentados na realização de inventários e os desafios técnicos de identificação do material coletado (Bezerra et al., 2019), mostram que o conhecimento das espécies de fungos tropicais, sua diversidade, ecologia e bioquímica está muito aquém do existente

nas zonas temperadas (Barreiro & Bolzani 2009; Lewinsonhn & Prado 2002). Como resultado, é possível fazer contribuições significativas para a micologia, mesmo com estudos de fragmentos florestais em campus universitários (Farr 1985; Alencar et al., 2003; Pereira et al., 2005; Rocha et al., 2013), incluindo novas espécies (Gomes-Silva et al., 2013; Sousa et al., 2020).

A insipiência, de forma geral, acerca dos fungos é uma lacuna crítica em nosso entendimento, uma vez que são ecologicamente centrais para a função do ecossistema, sendo importantes na reciclagem e eliminação de ecossistemas (Maggs 1985), atuando como elementos-chave de vários ciclos minerais (nitrogênio, carbono, fósforo, por exemplo) (Killham 1994), além de serem amplamente responsáveis pela taxa de decomposição e liberação de nutrientes em ecossistemas de floresta tropical (Osono & Takeda 2002; Wardle et al., 2004; Takahashi et al., 2017). Ademais, as espécies carnívoras podem ser importantes no controle de populações de nematóides do solo; uma variedade de espécies que parasitam artrópodes (McCoy et al., 2019); eles também são extremamente importantes em associações micorrízicas com angiospermas (endomycorrizas) e gimnospermas (ectomycorrizas) estando presentes em mais de 90% das espécies de plantas vasculares investigadas (Brundrett 2009), enquanto suas associações com algas ou cianobactérias dão origem a líquens, que, enquanto presentes globalmente, são elementos chave dos ecossistemas boreais e subpolares (Ahti & Oksanen 1990; Crittenden 1991). Os papéis ecológicos dos fungos são variados, eles podem ser saprófitos, parasitas, predadores ou mutualistas (às vezes até simbioses) (Spooner & Roberts, 2005; Takahashi et al., 2017).

Os humanos usam fungos de várias maneiras, incluindo preparação e fermentação, panificação, medicamentos (*Penicillium*: antibióticos; *Claviceps Purpurea*: vasoconstritor) (Takahashi et al., 2017) com atividade antioxidante, (Huang et al., 2007), anticâncer, antiviral, imunomodulador (Verma, Kharwar, Strobel, 2009), fabricação de alimentos (ex: soja, queijo, etc.) (Figura 3) e corantes (Frisvad et al., 2013), consumo direto (huitlacoche, trufas, cogumelos e shitake) (Valverdey et al., 1996), biopesticidas entomófagos (*Beauveria*: Luz et al., 2004) e fungos nematófagos (Siddiqui & Mahmood 1996), enzimas industriais, compostagem (Pallu 2010) e como organismos modelo na comparação e

identificação de genes mutantes, auxiliando na elucidação de doenças congênitas (Lehle et al., 2006).

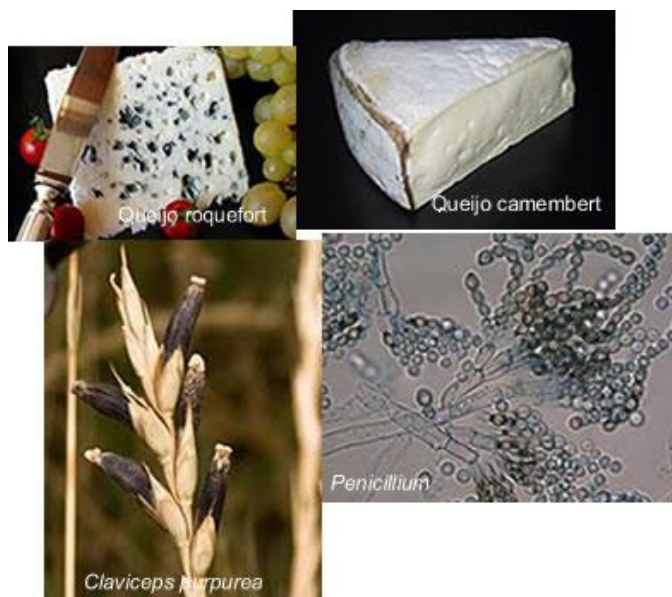


Figura 3. Alimentos e medicamentos oriundos de fungos (preparaenem.com/biologia/importancia-dos-fungos).

Segundo Escritório Técnico da Fiocruz na Amazônia, hoje Instituto Leônidas & Maria Deane (ILMD / Fiocruz Amazônia), os gêneros de fungos de maior ocorrência na região são, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, onde o *Penicillium* é um dos mais utilizados e, seus produtos e derivados geram alguns milhões de dólares anualmente em todo o mundo devido ser promissor fonte de produtos naturais bioativos (Takahashi et al., 2017).

2.2 Metabólitos secundários de fungos

Metabólitos secundários, também chamados de produtos naturais, são uma importante fonte de compostos bioativos, os quais são produzidos a partir de simbiose entre microrganismos endofíticos e plantas (Ribeiro et al., 2020). Esses compostos possuem atividades de interesse farmacêutico (ex: antifúngico, antiviral, antitumoral e etc.) e são agrupados em classes, tais como alcalóides, esteroides, terpenóides (Figura 4), isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis, ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocatalasinas (Figura 5), flavonóides, peptídeos e xantonas, podendo ser tóxicos ou até mesmo letais mediante de determinados microrganismos (Specian et al., 2014). Mesmo explorada de forma insuficiente, diversos estudos reconhecem seu papel biológico

na fabricação de produtos farmacêuticos, químicos e industriais (Gunatilaka, 2006).

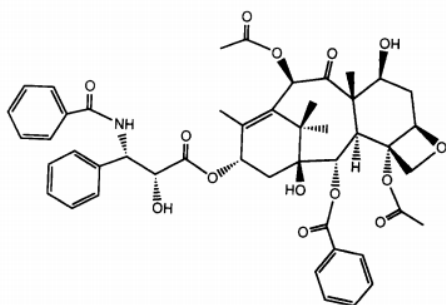


Figura 4. Estrutura do diterpenóide Taxol isolado do fungo *Taxomyces andreanae* (Strobel, 1993).

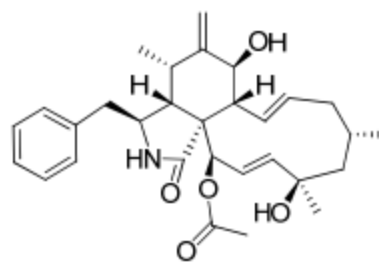


Figura 5. Estrutura da citocatalasina H2 isolado do fungo *Xylaria sp.* (Yu Li et al., 2012).

2.3 O gênero *Penicillium*

Este gênero é uma classe do subfiló Ascomycete, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, o qual possui mais de 64.000 espécies reconhecidas (Kirk et al., 2008). Existem três subgêneros: *Aspergilloides*, *Furcatum* e *Penicillium* (Samson et al., 2004). No passado, o gênero também incluiu espécies agora consideradas como membros dos gêneros *Biverticillium* e *Talaromyces* (Yilnaz et al., 2012). Sua nomenclatura tem a ver com seu conídio (estrutura assexuada produtora de esporos) em formato de pincel (Figura 6).



Figura 6. Conídio do fungo do gênero *Penicillium* (preparaenem.com/biologia/penicilina).

No geral, os membros do gênero são mais abundantes em biomas frios e temperados, onde são onipresentes como fungos do solo (Frac et al., 2018). Há, entretanto, uma série de espécies que se estendem ou são nativas dos trópicos (Wakelin et al., 2007). Em solos de floresta Neotropical, foram encontradas 17 (Cruz et al., 2013), 23 (Countinho & Maia 2018) e 32 (Fraga et al., 2010) espécies

de *Penicillium*. Até mesmo solos de áreas semiáridas (Pernambuco) foram encontrados até 13 espécies do gênero (Countinho et al., 2010), assim como em bromélias epífitas de floresta seca circundantes (Silva et al., 2018). Além disso, ao contrário de membros do gênero *Aspergillus* intimamente relacionado (Hall & Denning, 1994), as espécies de *Penicillium* não requerem a presença de altos níveis de oxigênio para sobreviver e, portanto, podem ser encontradas em ambientes relativamente anóxicos, como lama de mangue (Gomez, 2007; Park et al., 2009) e ambientes totalmente marinhos (Tsuda et al., 2004)

A maioria dos membros do gênero são saprófitas, crescendo em substâncias orgânicas biodegradáveis (Pitt 1991) e são recicladores altamente eficientes (Samson & Frisvad 2004). Muitos são fungos do solo e, por ser um ambiente altamente competitivo, produzem micotoxinas potentes (Nicoletti, Manzo & Ciavatta 2009), antibacterianos (Harris et al., 2009), bem como enzimas e ácidos orgânicos (ex: ácido cítrico) de interesse industrial (Soccol et al., 2006; Castilho et al., 2000). Várias espécies, incluindo *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. viridicatum* e *P. waksmanii* são potencialmente patogênicos para os mosquitos (da Costa et al., 1998), enquanto outros podem produzir substâncias com propriedades anticâncer (Nicoletti et al., 2009) e, espécies como *P. simplicissimum* mostram tolerância a metais pesados e podem ser agentes biossorbentes eficientes para a biolixiviação de cobre, chumbo, níquel e óxido de zinco (Burgstaller et al., 1992; Li et al., 2008; Valix et al., 2001), isso pode ser auxiliado pela capacidade quelante de tais extrólitos, como ácido pulvilórico e ácido penicílico (Houbraken et al., 2011).

Enquanto o conhecimento geral sobre o gênero *Penicillium* na Amazônia pode ser relativamente pobre (Cavalcante et al., 2018), Oliveira & Jesus (2015) relataram 111 linhagens do gênero depositadas nas coleções de Micologia Viva do INPA, as quais 95 linhagens poderiam ser identificadas como espécies. Estes incluíam: *P. aculeatum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. frequentans*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. lividum*, *P. melinii*, *P. paxilli*, *p. raistricki*, *P. roquefortii*, *P. sclerotium*, e *P. verruculosum*. Destes, Oliveira & Jesus (2015) observaram que *P. citrinum*, *P. lividum* e *P. implicatum* estavam bem representados na coleção do INPA e tinham potencial biotecnológico. Vários destes, tais como *P. citrinum*, *P.*

coryophilum, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, *P. implicatum* foram registrados em solos de outras partes do Brasil (ver Cruz et al., 2013), nos quais *P. decumbens*, *P. janthinellum* e *P. simplicissimum* são espécies amplamente distribuídas (Christiansen et al., 2000). Pesquisas micológicas recentes na Amazônia que envolveram este gênero estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1. Estudos Micológicos Recentes na Amazônia envolvendo o gênero *Penicillium*

Assunto de Pesquisa	Referência
Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de <i>Stenochironomus</i> Kieffer (Insecta: Diptera: Chironomidae)	Belmont-Montefisco et al., (2020)
Caracterização de proteases produzidas por espécies de <i>Penicillium</i> (alguns derivados de amostras Amazonense)	Brito (2018)
Estudo químico do <i>Penicillium chrysogenum</i>	de Andrade Nobre (2013)
Tolerância a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos para fungos filamentosos, incluindo <i>Penicillium</i> sp., isolados de sedimentos contaminados no Rio Amazonas	De Lima Souza et al., (2017)
Isolamento de <i>Penicillium</i> com propriedades bioativos do solo Amazônico	dos Reis Celestino et al (2014)
Uso experimental de <i>Penicillium</i> sp. no controle de cupins <i>Nasutitermes corniger</i>	dos Santos Oliveira et al., (2018)
Presença de membros do gênero <i>Penicillium</i> associado com as colmeias de abelhas sem ferrão (<i>Melipona</i>)	de Souza et al., (2018)
Ocorrência de fungos filamentosos associados a larvas de <i>Simulium goeldii</i> , incluindo <i>Penicillium bilaii</i>	Fonseca et al., (2008)
Descrição de cinco espécies novas do gênero <i>Penicillium</i> da serrapilheira da Amazônia Colombiana e a descrição de perfis químicos de ácido penicílico,	Houbraken et al., (2011)

andrastina A, ácido pulvilórico, paxilina, paspalina e jantitrem, entre outros	
Estudo das condições ideais para a produção de hipnofilinas por <i>P. strigellus</i>	Ikashiwa et al., (2012)
Análise de metabólitos (incluindo um alcaloide antimicrobiano) produzidos por uma espécie de <i>Penicillium</i> isolado da palmeira de buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	Koolen et al., (2012)
Constituintes químicos do fungo endofítico <i>Penicillium chrysogenum</i> isolado de <i>Strychnos toxifera</i> (Loganiaceae)	Koolen et al., (2014)
Presença de fungos (incluindo <i>Penicillium</i>) na água ingerida nas comunidades ribeirinhas	Lima et al., (2017)
Estudos de metabólitos ativos do <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>Gustavia elliptica</i> (Lecythidaceae)	Ohse (2019)
Avaliação do potencial de produção das enzimas celulasas e xilanases de fungos, incluído <i>Penicillium</i> , isolados dos solos da região Amazônica	Pirota et al., (2015)
Produção de enzimas termoestáveis por <i>Penicillium</i> isolado da região Amazônica	Santa-Rosa et al., (2018)
Atividade biosurfactante de fungos isolados do solo Amazonense, incluindo <i>Penicillium</i>	Sena et al., (2018)
Presença de <i>Penicillium</i> na castanha do Brasil	Sousa (2018)
Análises da toxicidade de pigmentos naturalmente produzidos por <i>Penicillium simplicissimum</i> e <i>P. janczewskii</i> do Amazonas	Texeira et al., (2012)
Presença de <i>Penicillium</i> , entre outros fungos, no ar e ambiente de escolas públicas em Manaus	Tiago et al., (2017)

Trabalhos pertinentes feitos fora do Amazonas podem incluir análises do metabolismo secundário de fungos (incluindo um *Penicillium* sp.) vivendo endofiticamente na árvore *Melia azedarach* (Meliaceae) (dos Santos 2003) e Petit et al., (2009) sobre novos metabólitos secundários derivados de uma espécie de *Penicillium* isolado do solo do Cerrado.

O gênero *Penicillium* é um dos cerca de 40 gêneros da família Eurotiales Trichocomaceae, parte da divisão Ascomycete do Reino Fungi. Desde a década de 1980, as abordagens morfológicas para a descrição das espécies foram amplamente superadas pela quimiotaxonomia, que comumente envolve perfis de zimograma em que as espécies são diferenciadas com base nos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida de isoenzimas particulares (Pitt, 1991). Além disso, padrões de ramificação, apesar de não corresponderem perfeitamente com as seções dos subgêneros, ainda são utilizados na classificação deste gênero (Pitt, 1979), são elas, conidióforos monoverticilados, biverticilados, terverticilados e poliverticilados (Figura 7). Com base nisso, o gênero tinha 406 membros em 2013 (Visagle et al. 2014), embora novas espécies estejam continuamente sendo descritas (por exemplo, Barbosa et al. 2018; Rodríguez-Andrade et al. 2021). O gênero é organizado em dois subgêneros, cada um com suas próprias seções (Tsang et al. 2018), uma dessas seções, *Exilicaulis*, contém *Penicillium citreosulfuratum*, a linhagem a seguir.

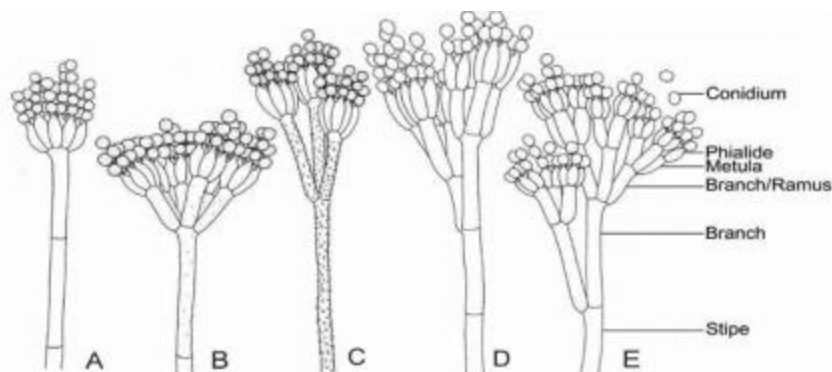


Figura 7. Conidióforos monoverticilados (A), biverticilados (B e C), terverticilados (D) e poliverticilados (E) (Visagle et al., 2014).

2.4 *Penicillium citreosulfuratum*

Uma amostra foi encontrada na França, onde foram registradas colônias na superfície e dentro da casca de sobreiros (*Quercus subor*, Fagaceae) em Portugal (Serra et al. 2008), no entanto a espécie tem ampla distribuição. Foi relatado

recentemente na Península Coreana (Park et al. 2020), além de ter sido registrado como comum no solo e no ar dos fynbos sul-africanos (um habitat semiárido semelhante ao cerrado), bem como nas flores dos arbustos *Protea repens* (Proteaceae). Lá, os esporos da espécie são transportados para as flores por ácaros que se alimentam e põem ovos preferencialmente nas colônias de *P. citreosulfuratum* do que nas de outros fungos que crescem dentro das flores, o que sugere uma interação mutualística (Visagle et al. 2016).

Além disso, na República Tcheca, *P. citreosulfuratum* foi encontrado associado ao gênero de líquen *Chrysothrix*. No entanto, não tem associação endossimbiótica com algas, mas faz parte do tapete fúngico, onde hospeda crivírus que também podem estar envolvidos na associação multiespécies (Petrzik et al. 2019). A espécie também foi identificada como estando associada a algas marinhas nas águas costeiras de Bornéu (Taha et al. 2021).

No geral, a seção *Exilicaulis* é tradicionalmente caracterizada por estipes monoverticilados não vesiculados (Pitt 1979). Recentemente, com base na análise filogenética multigênica, a seção de membros do *Exilicaulis* foi redefinida para incluir espécies com conidióforos biverticilados e foi separada em seis clados (Visagle et al. 2016), com β -tubulina (BenA), calmodulina (CaM) e a segunda maior subunidade de RNA polimerase II (RPB2) usada para a identificação precisa das espécies nesta seção (Visagle et al. 2016). Em todo o mundo, 55 espécies são conhecidas, até o momento, para esta seção do gênero (Park et al. 2020).

Em sua revisão taxonômica Visagle et al. (2016) oferece a seguinte descrição acerca do *P. citreosulfuratum*:

Ágar autolisado de levedura Czapek (CYA), 25 ° C, 7d: Colônias radial e concentricamente sulcadas, moderadamente profundas; margens baixas, estreitas, inteiras; micélio amarelo; textura loccose; esporulação esparsa a moderada, conídios em massa acinzentados a verde escuro (25D6 – F6–26E6); exsudato claro, ausente em algumas cepas; pigmento solúvel amarelo; amarelo reverso (3A6–3A8) a amarelo alaranjado (4B8). Ágar de extrato de malte de Blakeslee (MEA), 25 ° C, 7d: Colônias baixas, planas; margens baixas, estreitas, inteiras; micélio branco nas margens, amarelo em outras partes; textura loccose; esporulação moderadamente densa, conídios em massa

verde opaco a acinzentado (25E4–26E5); exsudato ausente; pigmento solúvel amarelo; reverso amarelo esverdeado (1A6) no ponto de inoculação, desbotando para amarelo acinzentado (1B6–2B6). Ágar de sacarose de extrato de levedura (YES), 25 ° C, 7d: Colônias baixas a moderadamente profundas, radial e concentricamente sulcadas; margens baixas, muito estreitas, inteiras; micélios brancos nas bordas, amarelos no centro; textura loccose; esporulação esparsa, conídios em massa branco esverdeado (27A2), verde opaco (27E4) em áreas mais densas; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso do amarelo claro para o amarelo (3A4–6) para o amarelo profundo (4A8) em alguns isolados. CREA, 25 ° C, 7d: ácido não produzido

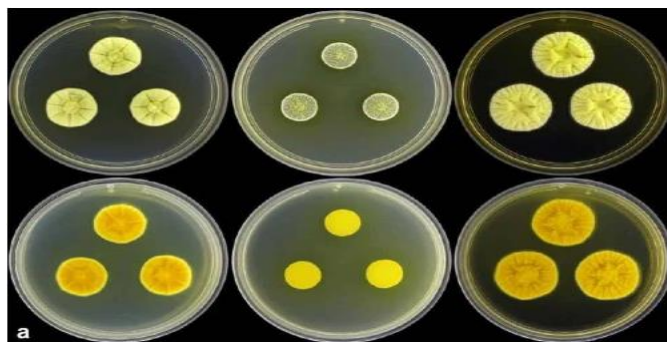


Figura 8. Linha superior (esquerda para direita), CYA, MEA, YES. Linha inferior (esquerda para direita) CYA, MEA E YES reverso, *P. citreosulfuratum* (Biourge, Cellule 33: 285 ,1923).

Conidióforos principalmente monoverticilados, mas às vezes com estipes muito curtas que podem ser interpretados como ramos subterminais, com conidióforos biverticilados às vezes presentes; Estirpes / ramos lisos, quando terminais $70\text{--}290 \times 2\text{--}2,5 \mu\text{m}$, quando carregados subterminalmente $18\text{--}90 \times 2\text{--}2,5 \mu\text{m}$; Metulas tipicamente 2, às vezes 3, divergentes, $8\text{--}29 \times 1,5\text{--}2,5 \mu\text{m}$ ($18 \pm 4,5 \times 2,1 \pm 0,2$), vesículas $2,5\text{--}4 \mu\text{m}$ ($3,4 \pm 0,3$); fiálides ampuliforme, 5–10 por métula, $5\text{--}9 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$ ($6,7 \pm 0,9 \times 2,4 \pm 0,2$); Conídios lisos, globosos, $1,5\text{--}2 \times 1,5\text{--}2 \mu\text{m}$ ($1,8 \pm 0,1 \times 1,8 \pm 0,1$), largura / comprimento médio = 0,98, $n = 50$

A análise das capacidades úteis desta espécie é complicada pelo fato de que, segundo Visagle et al. (2016), *Penicillium citreosulfuratum* é o nome correto para o clado anteriormente considerado por Serra et al. (2008) como *P. toxicarium*. No entanto, a análise filogenética molecular recente mostrou que os dois são cladus únicos, apesar de suas fortes semelhanças morfológicas (Sugiura et al. 2020). Assim, *P. citreosulfuratum* e *Penicillium toxicarium* são formas

separadas e a literatura sobre elas não pode ser combinada. Este também é o caso de *P. citreoviride* e *P. trzebinskii* que também foram confundidos com *P. toxicarium* (Sugiura et al. 2020) e, por causa da opinião de Serra et al. (2008), com *P. citreosulfuratum*. Conseqüentemente, apenas a literatura que se refere inequivocamente a *P. citreosulfuratum* será usada aqui.

Junto com *P. citreonigrum* (sinônimo = *P. citreoviride*), *P. citreosulfuratum* é um forte produtor de citreoviridina (Figura 9) (Peterson et al., 2015), uma micotoxina que tem sido associada à doença do arroz amarelo ou beribéri cardíaco agudo, ambos historicamente no Japão (Sakabe et al. 1977, Udagawa & Tatsuno 2004, Uraguchi 1969) e bem mais recentemente no Brasil (Almeida et al. 2012, Rosa et al. 2010). No entanto, a produção de citreoviridina não é exclusiva das espécies de *Penicillium* na seção *Exilicaulis*, nem apenas daquelas que crescem em arroz, visto que foi encontrada em diversas espécies, crescendo em uma variedade de substratos (Cole et al. 1981, Wicklow & Cole 1984, Wicklow et al. 1988, Wigmann et al. 2015; Shiratori et al. 2017).

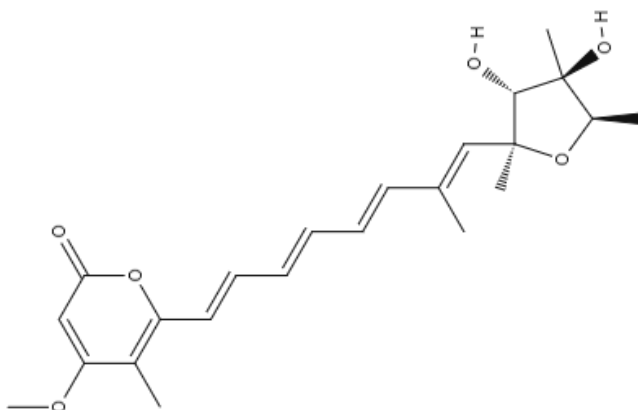


Figura 9. Estrutura química da citreoviridina (Barbosa et al., 2019).

Em um aspecto mais aplicado, *P. citreosulfuratum* foi uma das cinco espécies de fungos de solo encontrados que possuem capacidade significativa para degradar bifenilos policlorados (PCB) em solos de locais industriais altamente poluídos na França, onde os fungos de solo foram identificados por extração de DNA e PCR (Germain et al. 2021). A espécie também se mostrou resistente à poluição por sulfeto de ferro no pós-industrial (Technosols) na Polônia (Stępniewska et al. 2020).

Problemas de taxonomia complicam muito a atribuição da produção de produtos metabólicos às espécies corretas de fungo *Penicillium* (Pitt & Leisner

1991). Assim, na tabela abaixo também foram listadas publicações relacionadas ao *Penicillium toxicarium*, o fungo amarelo do arroz. Esta espécie há muito é considerada sinônimo de *P. citreosulfuratum* (Shiratori et al. 2017), mas estudos de Sugiura et al. (2020) mostraram que os dois formam clados distintos e não são sinônimos. No entanto, foram incluídas publicações que utilizam o nome *P. toxicarium* porque: (a) indicam os tipos de produtos metabólicos que também podem ser isolados de *P. citreosulfuratum* e (b), dado o nível de confusão da nomenclatura em torno das duas formas, pode de fato ter sido relatado como proveniente de *P. toxicarium*, mas foi sintetizado a partir de populações que eram, de fato, atribuíveis a *P. citreosulfuratum*.

Além disso, como *P. toxicarium* foi considerado sinônimo de *P. citreonigrum* e *P. citreoviride* (Visagie et al. 2016), material relevante publicado sobre essas duas espécies também foram incluídas. Na análise das afinidades seccionais das espécies de *Penicillium*, Visagie et al. (2016) alocaram 42 espécies para a seção *Exilicaulis*, e a análise de beta-tubulina e calmodulina e a variação da região rRNA do espaçador interno transcrito agruparam-nas em cinco grupos. Um deles incluía *P. citreosulfuratum*, juntamente com *P. cinerescens*, *P. citreonigrum* e *P. fundyense*. Assim, uma vez que espécies estreitamente relacionadas partilham frequentemente vias metabólicas semelhantes (Frisvad & Filtenborg 1990), a literatura sobre estas espécies, *P. citreoviride* e *P. toxicarium*, foi analisada para obter informações, tanto sobre o que foi isolado para *P. citreosulfuratum* e o que poderia razoavelmente ser esperado. A esta pesquisa foram adicionados mais três nomes (*P. aenum*, *P. bertai* e *P. subcinearum*), sendo estes táxons listados como sinônimos de alguns das formas listados acima por Pitt et al. (2000). Com base nesta pesquisa bibliográfica, foi relatado que as seguintes substâncias foram isoladas de membros deste clado dentro da *Penicillium* seção *Exilicaulis*:

Quadro 2. Publicações envolvendo espécies do gênero *Penicillium*.

Nome da substância	Espécie de <i>Penicillium</i>	Referência
Citrinina	<i>P. citreosulfuratum</i>	Pollock (1947)
Enzimas extracelulares	<i>P. citreosulfuratum</i>	Hanen et al. (2019)
Ácido desidrocarólico	<i>P. cinerescens</i>	Bracken & Raistrick (1947); Rosowsky (1972)

Gliotoxinas	<i>P. cinerescens</i>	Frisvad (1989)
β -frutofuranosidase	<i>P. citreonigrum</i>	Araújo et al. (2022); Nascimento et al. (2016b)
Citreoviridina	<i>P. citreonigrum</i>	da Rocha et al. (2015); Okano et al. (2020); Rosa et al. (2010); Shiratori et al. (2017); Uchiyama et al. (2019)
esclerotioramina alcalóide clorado	<i>P. citreonigrum</i>	Yuan et al. (2014)
Dicetopiperazina	<i>P. citreonigrum</i>	Huang et al. (2018)
Sesquiterpenóides Drimano	<i>P. citreonigrum</i>	Ebel et al. (2006)
Sesquiterpenos do tipo eremófilo	<i>P. citreonigrum</i>	Yuan et al. (2015)
frutooligossacarídeos	<i>P. citreonigrum</i>	Nascimento et al. (2016a,b); Nobre et al. (2019)
Gutato	<i>P. citreonigrum</i>	Wang et al. (2010)
Lapacehol e Lomatiol	<i>P. citreonigrum</i>	Silva et al. (1997)
Meroterpenóides oxigenados	<i>P. citreonigrum</i>	Ebel et al. (2006)
Fenóis	<i>P. citreonigrum</i>	Huang et al. (2018)
Pirenocina A	<i>P. citreonigrum</i>	Zou et al. (2022)
Sesquiterpenos	<i>P. citreonigrum</i>	Yuan et al. (2017)
Policetídeo Terrein	<i>P. citreonigrum</i>	Zou et al. (2022)
Antrasteróides	<i>P. citreoviride</i>	Nakada & Yamamura (2000)
Beta-Glucosidases	<i>P. citreoviride</i>	Hirte & Glath (1980)
Celulases	<i>P. citreoviride</i>	Hirte & Glath (1980)
Citreoantrasteróide	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura et al. (1995)
Citreoazopirona	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura & Yamamura (1997)
Citreobenzofuranos A, B, e C,	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura et al. (1992b)
Citreobifenil	<i>P. citreoviride</i>	Shizuri et al. (1988)
Citreopirona	<i>P. citreoviride</i>	Niwa et al. (1980)
Citroetiolactona	<i>P. citreoviride</i>	Shizuri et al. (1983)
Citreo- γ -pirona	<i>P. citreoviride</i>	Nakada et al. (1999)
Citreohibridona A e B	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura et al. (1991, 1992a); Kosemura (2002)
Citreohibridona C	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura et al. (1996); Kosemura (2002)
Citreoindol	<i>P. citreoindole</i>	Matsunaga et al. (1991)
Citreoesteroide	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura et al. (1997)
Citriotiopirano A	<i>P. citreoviride</i>	Nakada et al. (1999)
Citreoviridina	<i>P. citreoviride</i>	Ueno (1971)
Micotoxina tipo Citreoviridina	<i>P. citreoviride</i>	Datta & Ghosh (1981)

Citreoviranol	<i>P. citreoviride</i>	Shizuri et al. (1988)
Citreoviridinol	<i>P. citreoviride</i>	Niwa et al. (1981)
Metabólitos tipo Curvularina	<i>P. citreoviride</i>	Lai et al. (1991)
Ácido dipicolínico	<i>P. citreoviride</i>	Hodson & Foster (1966); Kalle & Khandekar (1983)
Demetilcitreoviranol	<i>P. citreoviride</i>	Shizuri et al. (1988)
Hemicelulases	<i>P. citreoviride</i>	Hirte & Glath (1980)
6-Hidroxi-8-metoxi-3S,5-dimetilisocroman	<i>P. citreoviride</i>	Lai et al. (1990)
6-hidroxi-8-metoxi-3S,5-dimetil-3,4-dihidroisocumarina	<i>P. citreoviride</i>	Lai et al. (1990)
Mesoterpenóides	<i>P. citreoviride</i>	Kosemura (2003)
Análogo de pestalotina (LL-P880γ)	<i>P. citreoviride</i>	Kimura et al. (1986)
Precitreobifenil	<i>P. citreoviride</i>	Shizuri et al. (1988)
Secocitreoviridina	<i>P. citreoviride</i>	Niwa et al. (1981)
Semi-Vioxantina	<i>P. citreoviride</i>	Zeek et al. (1979)
Lactona esteróide	<i>P. citreoviride</i>	Liu et al. (2006)
Vioxantina	<i>P. citreoviride</i>	Bode et al. (2007)
Citreoviridina	<i>P. toxicarium</i>	Uraguchi (1969); Ueno (1971)
Mosquitocidas	<i>P. toxicarium</i>	Jin et al. (2021)
Heanamindol	<i>P. toxicarium</i> , <i>P. citreonigrum</i> , e <i>P. cinerascens</i> (amostra mixto)	Kim et al. (2015)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Estudar química e biologicamente metabólitos secundários de uma linhagem de *Penicillium citreosulfuratum* de esporos preservados na coleção do Laboratório Labmicra da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM.

3.2 Específicos:

Analisar por espectrometria de massas os extratos de uma linhagem de *P. citreosulfuratum* em busca de íons de compostos relatados ou não para essa espécie.

Obter metabólitos do fungo, priorizando os extratos que apresentarem atividades biológicas.

Identificar metabólitos do fungo, isolados ou em mistura.

Submeter os extratos, frações e metabólitos do fungo a ensaios biológicos, inseticida, citotóxico e antimicrobiano.

4. METODOLOGIA

Para o cumprimento dos objetivos, o projeto foi constituído das seguintes etapas:

4.1 Levantamento bibliográfico dos metabólitos dos fungos *P.*

Citreosulfuratum

Foi feito um levantamento bibliográfico dos metabólitos de *P. citreosulfuratum* em bases de dados livres ou disponibilizadas pela Capes para acesso acadêmico.

4.2 Reativação da linhagem e preparo da suspensão de esporos

Neste trabalho foi estudada a linhagem M167 de *P. citreosulfuratum* (LabMicrA 1245), registrada no Sisgen sob o código AC2C1DD. As suspensões de esporos do fungo preservado na coleção de cultura foram feitas em placas de meio BDA, com a aplicação das amostras preservadas em inóculo central e tripontual (Figura 10).

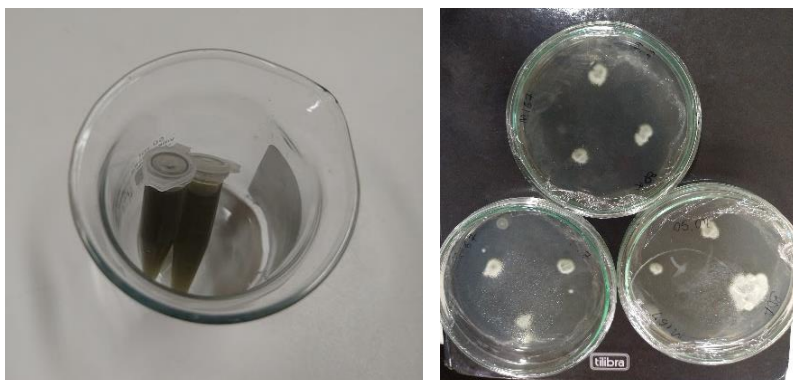


Figura 10. Fungos preservados e inóculos tripontuais, respectivamente.

Após 8 dias de crescimento, os esporos foram raspados com haste metálica, suspensos em triplicata, em 10 mL de solução de glicerol 20% contidas em tubos falcon, previamente autoclavada. Os esporos suspensos foram armazenados em um refrigerador.

Meio BDA – Batata, dextrose e ágar.

Caldo obtido de 200 g de batata cortados em cubos e levadas ao microondas em bequer com 1L de água destilada, cozidas por 10 minutos, filtrado e misturado com 20 g de dextrose e 15 g de ágar bacteriológico. Após

homogeneizado, foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C e distribuído nas placas.

4.3 Crescimento fúngico em escala preparativa laboratorial

50µL da suspensão de esporos da linhagem M167 de *P. citreosulfuratum* (LabMicrA 1245) foram adicionados em cada um de 103 frascos Erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL de meio BDL (ver abaixo), anotando-se o pH inicial. Procedeu-se o cultivo estático, a 26 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 21 dias. A cada três dias foi feito o acompanhamento do nível de glicose e pH, para isto, foram retiradas alíquotas das amostras para avaliação do perfil químico ao longo do crescimento dos fungos (Figura 11).

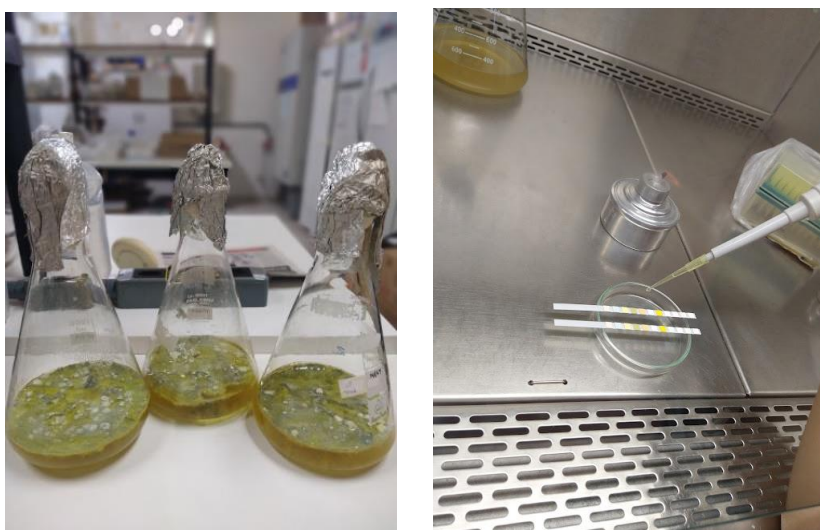


Figura 11. Acompanhamento do crescimento do fungo, linhagem M167 *P. citreosulfuratum* (LabMicrA 1245) e controle de amostras, respectivamente.

Meio BDL – Batata, dextrose e extrato de levedura.

O caldo foi obtido de 200 g de batata cortados em cubos e levadas ao microondas em bequer com 1L de água destilada, cozidas por 10 minutos e peneiradas. O caldo foi misturado com 20 g de dextrose e 2 g de extrato de levedura. Foram preparados 33L de meio e, após homogeneizado, distribuídos em frascos Erlenmeyer de 1 L, colocando-se 300 mL por frasco. Os frascos foram tapados e esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave.

4.4 Obtenção de extratos

Para a extração, foi particionado 1,1 L do meio cultivado com 900 mL de acetato de etila/propano-2-ol (9:1) 3 vezes. Este processo se repetiu para os 33 L

de meio reservados. Os extratos foram reunidos e pesados, o qual obteve rendimento de 4,5713g. Uma alíquota de 5,5 mg foi separada para ensaios biológicos.

O extrato foi submetido a um fracionamento inicial por cromatografia líquida clássica (CLC) em C-18 (octadecilsilano). Para isto, foi preparada uma pastilha da amostra, através de maceração da mesma com o mínimo de metanol e, após condicionamento da coluna com H₂O/MeOH (9:1), a pastilha foi depositada em seu interior e iniciado o processo de eluição. O gradiente utilizado foi H₂O/MeOH nas proporções 9:1 (Pc1), 7:3 (Pc2), 1:1 (Pc3) e MeOH (Pc4) (Figura 12). As frações obtidas com cada eluente foram separadas em frascos e preservadas em geladeira.

Após a pré-concentração, as frações acima que ainda continham água foram submetidas a extração em fase sólida (SPE). Após a fase líquida ter sido drenada, o analito retido foi eluído em quantidade mínima de MeOH, coletado e concentrado, conforme figura 13.



Figura 12. CLC em coluna aberta C-18.

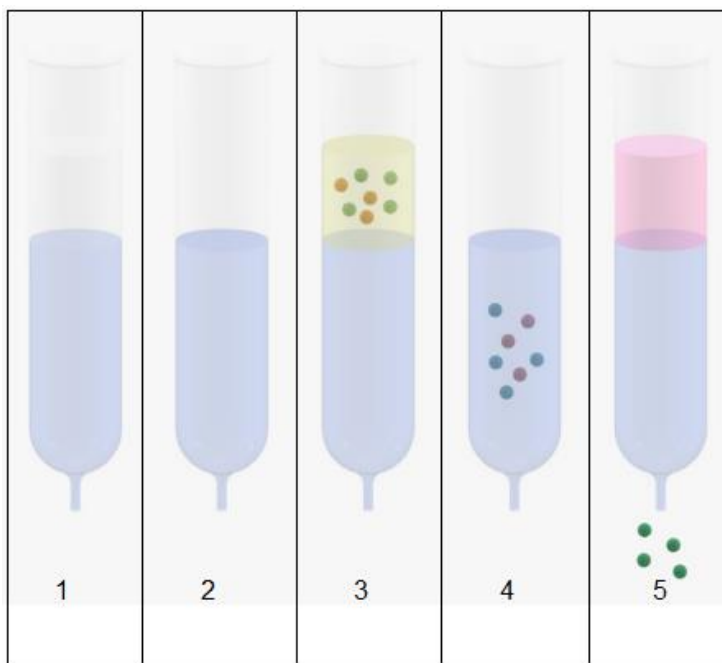


Figura 13. Esquema de SPE: 1 – corpo de uma seringa dentro do qual a fase sólida é compactada entre dois filtros, 2 – condicionamento, 3 – extração, 4 – lavagem, 5 – eluição: recuperou-se os analitos retidos na fase sólida pela percolação de um pequeno volume de metanol

Os extratos foram concentrados, identificados e armazenados. Rendimento das amostras pós SPE, Pc1 0,3747g, Pc2 0,2883g, Pc3 3,3483g, Pc4 0,5310g. Em seguida separadas alíquotas para teste de perfil químico em CCD, (Figura 14).



Figura 14. Extratos concentrados, separados por eluição Pc1, Pc3, Pc2, Pc4 e precipitado formado, respectivamente.

As placas de CCD das frações do extrato do meio cultivado (Item 4.5) revelaram um bom potencial para a obtenção de metabólitos do fungo (Figura 15),

a qual a fração Pc3 foi escolhida para ser trabalhada em coluna Sephadex (Item 4.6).

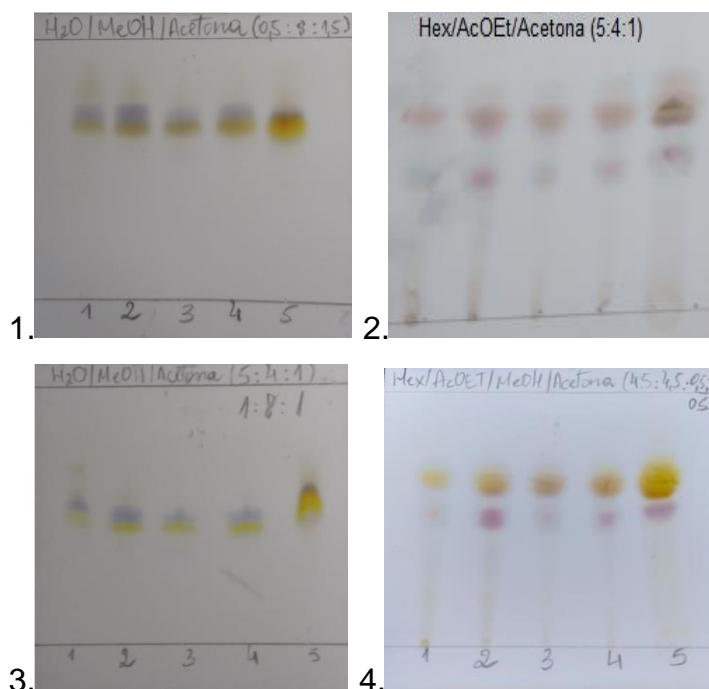


Figura 15. CCD das 4 amostras Pc1, Pc2, Pc3, Pc4 e precipitado do extrato do meio cultivado pela linhagem M167, respectivamente. Placas de C-18 eluídas com: H₂O/MeOH/Acetona (0,5:8:1,5) (1), Hex./AcOEt/Acetona (5:4:1) (2), H₂O/MeOH/Acetona (5:4:1) (3). Placa (4)

4.5 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As alíquotas dos extratos foram aplicadas através de capilar em placa de cromatografia de fase normal e modo reverso, eluídas em cuba utilizando diversos solventes como fase móvel, tais como hexano, acetato de etila, metanol, acetona e água destilada, variando suas proporções (detalhes nos procedimentos descritos no texto). Após eluição, as CCDs foram reveladas com etanol/H₂SO₄ (9,5:0,5).

4.6 Fracionamento por coluna Sephadex LH20

Coluna Sephadex, já empacotada (4,0 cm x 60,0 cm), foi ativada com 500 mL de MeOH e mantida em repouso por 24h. Coluna condicionada na proporção resina/MeOH (1:4). Amostra da fração de M167 – H₂O/MeOH (1:1), denominada Pc3, foi separada, dissolvida em quantidade mínima de MeOH e, após homogeneização, com auxílio de pipeta graduada foi depositado no interior da coluna. O eluente utilizado foi o metanol, resultando em 20 frações coletadas (A-

U). Aproximadamente 1,2 g do extrato Pc3 foi utilizado para fracionamento em coluna Sephadex.

Tabela 1. Rendimento das frações da coluna Sephadex.

Amostra	Massa (g)	Rendimento (%)
Pc3A	0,0035	0,29
Pc3B	0,0041	0,34
Pc3C	0,0051	0,42
Pc3D	0,0198	1,65
Pc3E	0,0280	2,33
Pc3F	0,0442	3,68
Pc3G	0,0466	3,88
Pc3H	0,0901	7,51
Pc3I	0,6623	55,19
Pc3J	0,0493	4,11
Pc3L	0,0716	5,96
Pc3M	0,0306	2,55
Pc3N	0,0088	0,73
Pc3O	0,0041	0,34
Pc3P	0,0183	1,53
Pc3Q	0,0061	0,51
Pc3R	0,0023	0,19
Pc3S	0,0015	0,13
Pc3T	0,0068	0,57
Pc3U	0,0015	0,13
Rendimento total (%)		92,04

Posteriormente, foi executado teste de perfil químico em CCD (item 4.5), com 10 mL de eluente Hex./AcOEt (1:1) mais 0,3 mL de MeOH e 0,25 mL de acetona, onde as frações I e J demonstraram similaridade no perfil químico (Figura 16) e, portanto, foram reunidas e pesadas (0,6623g) sendo agora denominada Pc3I, para posterior fracionamento.

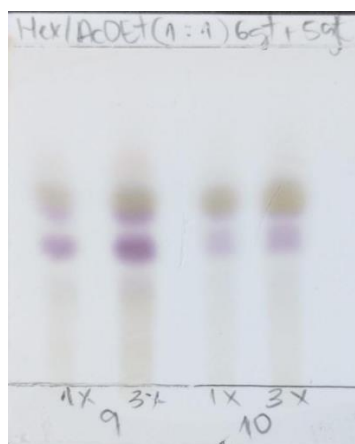


Figura 16. CCD das frações I (9) e J (10), eluente utilizado Hex/AcOEt (1:1) 0,3 mL de MeOH e 0,25 mL de acetona.

A fração Pc3I foi então submetida a cromatografia líquida clássica, CLC C-8, (Item 4.7).

4.7 Fracionamento por CLC C-8

As dimensões da coluna dependem da quantidade de analito a ser cromatografado, neste caso, foi utilizado coluna com 2 cm de diâmetro. A sílica, previamente ativada a 100°C por 1 hora, foi vertida na coluna até alcançar altura de 7 cm, e pressionada com auxílio de bomba de vácuo, afim de que estivesse bem comprimida (Figura 17). Especificações da sílica: SiliaFlash F60; tamanho da partícula 40-63 µm (230-400 mesh).



Figura 17. Coluna C-8 empacotada.

Coluna foi condicionada com 100 mL Hex/AcOEt/MeOH/Acetona (7:2:0,5:0,5) e iniciado o processo de fracionamento (Figura 18). Gradiente executado determinado a partir de teste em CCD, Hex/AcOEt/MeOH/Acetona nas proporções (7:2:0,5:0,5), (6:3:0,5:0,5), (4,5:4,5:0,5:0,5), (4:4:1:1) e metanol. A quantidade de cada eluente a ser usado foi calculado pela relação volume da coluna e altura da sílica empacotada, através da fórmula $\pi.r^2.h$. Foram coletadas 10 frações.



Figura 18. Execução da coluna C8 e frações coletadas.

Tabela 2. Rendimento das frações de Pc3I

Amostra	Massa (g)	Rendimento (%)
1	0,0035	0,53
2	0,0026	0,40
3	0,0064	0,97
4	0,1146	17,30
5	0,1200	18,20
6	0,1439	21,72

7	0,1068	16,12
8	0,0815	12,30
9	0,0557	8,41
10	0,0079	1,19
Rendimento total (%)		97,14

O material oriundo desta etapa, foi submetido a CCD (Figura 19), Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP) item 4.8 e coluna C-18 (modo reverso) com fase móvel Hex/AcOEt (1:1) 0,3 mL de MeOH, 0,25 mL de acetona e 0,15 mL de ácido acético. Posteriormente foi realizado análise em espectrometria de massa (item 4.10.2).

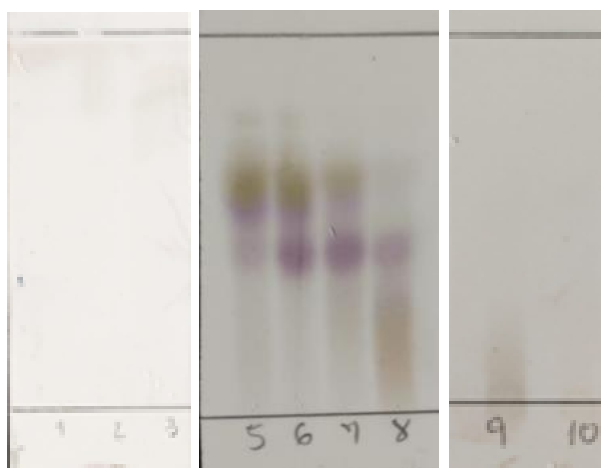


Figura 19. CCD das frações coletadas. Eluente: Hex/AcOEt (1:1) 0,3 mL de MeOH, 0,25 mL de acetona e 0,15 mL de ácido acético.

4.8. Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Após CCD frações 6 e 7 foram reunidas e denominada Pc3I6. 160 mg de Pc3I6 foi submetido Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), (Figura 20).

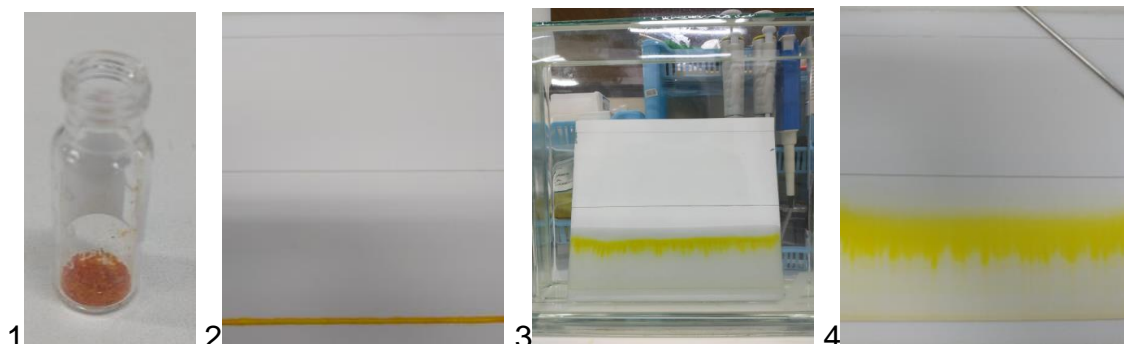


Figura 20. Fração Pc3I6 (1), aplicação (2), eluição (3), pós eluição em CCDP (4).

Visando a separação dos componentes da fração Pc3I6, foi utilizada como fase estacionária a sílica gel distribuída em placa de vidro, onde foi depositada a amostra e eluída em cuba. Placa cromatográfica de vidro pré-fabricada, com dimensões 20x20 cm, espessura da camada adsorvente entre 0,1 e 2 mm e cerca de 6 g de sílica depositada sobre a lâmina. Deve-se ter cuidado ao depositar amostra sobre a placa, quanto mais rente a linha de partida menores serão as variações de fator de retenção (R_f). Eluente usado 150 mL Hex/AcOEt (1:1) 4,5 mL de MeOH, 3,75 mL de acetona e 2,25 mL de ácido acético e, após eluição, a placa foi posta em câmara de luz UV-A (365nm) e luz UV-C (254nm) para demarcação das bandas para posterior raspagem (Figura 21).

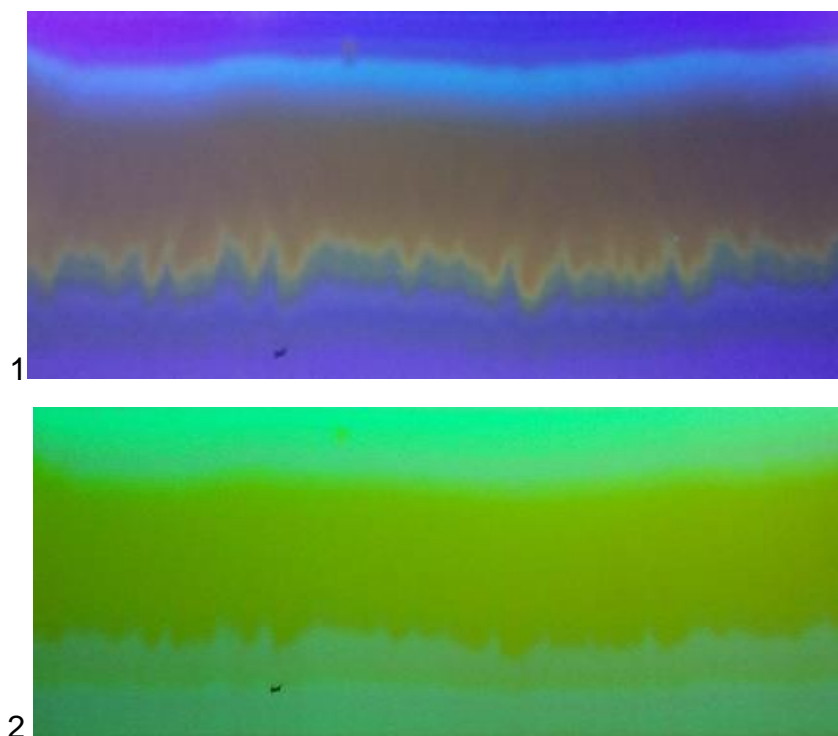


Figura 21. CCDP em câmara de luz UV-A 365 nm (1) e luz UV-C 254 nm (2)

Os componentes retidos a placa foram raspados com espatula separadamente, filtrados e reservados, (Figura 22 e 23).

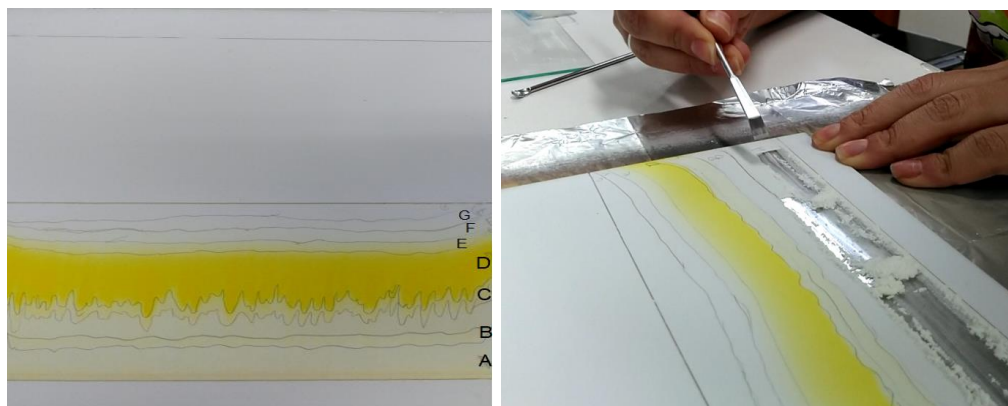


Figura 22. Componentes retidos a placa denominados A, B, C, D, E, F, G.

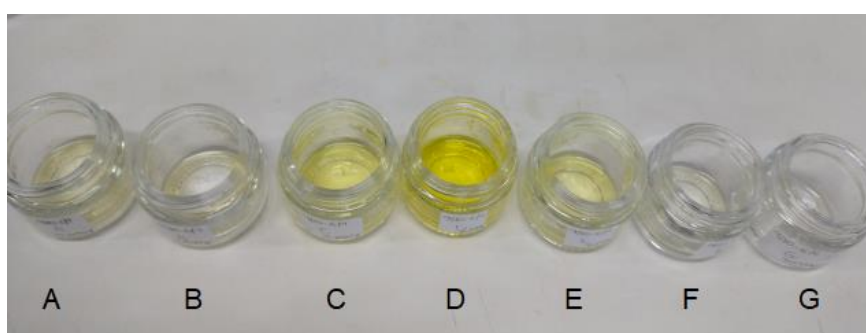


Figura 23. Amostras retiradas da placa preparativa para posterior filtração.

O material retido a sílica foi extraído com MeOH, coletado e concentrado para posterior fracionamento em C-18. Coluna C-18 foi condicionada com 50 mL H₂O/acetona (7:3), onde aproximadamente 40,6 mg da fração Pc3I6C foi fracionada. Gradiente utilizado: H₂O/acetona nas proporções (7:3), (6:4), (1:1), (2:8) e acetona. 10 frações foram coletadas e feita extração em fase sólida (SPE), (Figura 24). Amostras foram concentradas no nitrogênio e pesadas.

Tabela 3. Rendimento das frações de Pc3I6C.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
1 / 2 / 3	0	0
4 / 5 / 6	8,8	21,68
7 / 8	16,1	39,66
9	3,5	8,62
10	0	0

Rendimento total (%)	69,96
----------------------	-------

Em seguida submetidas a CCD com 10 mL de fase móvel Hex/AcOEt (7:3) mais 0,3 mL de metanol, 0,25 mL de acetona e 0,15 mL de ácido acético. Amostras 4,5 e 6 foram reunidas, denominada Pc3I6C4 e amostras 7 e 8 foram reunidas também, denominada Pc3I6C7.

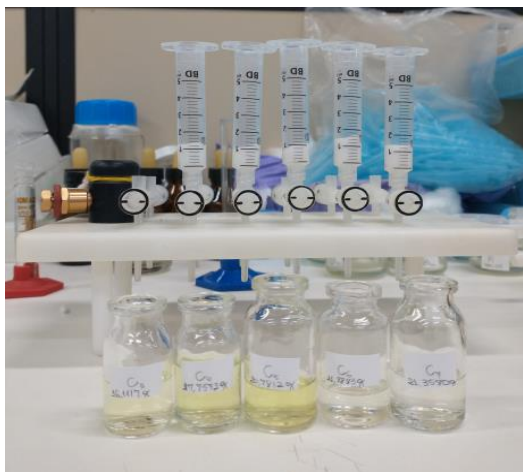


Figura 24. SPE das frações coletadas da amostra Pc3I6C.

Entre as frações coletadas, a fração Pc3I6C7 obteve resultado mais relevante após CCD, a qual uma alíquota foi encaminhada para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), item 4.9.1., onde os resultados obtidos foram inconclusivos e outra alíquota enviada para análise por espectrometria de massas, item 4.9.2.

4.9. Identificação dos metabólitos

4.9.1. Análise espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises foram realizadas no laboratório NMR da Central Analítica da UFAM. Os espectros de unidimensionais (1D - ^1H , ^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (2D - HSQC e HMBC) da UFAM foram registrados em um instrumento Bruker Avance III DRX 500, operando a 11,75 Tesla (500,13 MHz para RMN de ^1H e 125,76 MHz para RMN de ^{13}C). O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interno. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), e, quando necessário, uma pequena quantidade de metanol deuterado (CD_3OD) foi empregada para a homogeneização das soluções. As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz),

enquanto os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

4.9.2. Análises por espectrometria de massas dos extratos

Os extratos e suas frações foram solubilizados em metanol grau HPLC, sendo diluídas na concentração de 1 mg/mL e analisados em um espectrômetro de massas, modelo Accela Autosampler – Thermo Fisher Scientific, por inserção direta com fonte de ionização via ESI (electrospray) ou APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), nos modos positivo e negativo. Os espectros de massas de cada extrato (íons totais) foram analisados em busca de íons de interesse e comparado com a literatura para a espécie do fungo.

A amostra Pc3l6C7, submetida a injeção direta (Item 4.9.2), apresentou as seguintes massas (m/z) visíveis: 234, 274, 402, 418, 434, onde a m/z 418 foi a massa majoritária. Fonte APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), produzindo íons como consta na tabela 4.

Tabela 4. Fragmentação m/z da amostra Pc3l6C7.

m/z	fragmentos (+)	fragmentos (-)
234	217 / 207 / 188 / 175 / 167 / 152	219 / 209 / 190 / 177 / 169 / 154
274	257 / 240 / 228 / 196 / 152	259 / 242 / 230 / 198 / 154
402	315 / 297 / 273 / 257 / 243 / 193 / 163 / 137	317 / 299 / 275 / 259 / 245 / 195 / 167 / 139
418	401 / 383 / 373 / 357 / 339 / 313 / 301 / 275 / 259 / 243 / 217 / 193 / 165 / 137 / 125	403 / 385 / 375 / 359 / 341 / 315 / 303 / 277 / 261 / 245 / 219 / 195 / 167 / 139 / 127
434	417 / 413 / 395 / 327 / 291 / 273 / 257 / 203 / 162 / 175	419 / 415 / 397 / 329 / 293 / 275 / 259 / 205 / 164 / 177

Após resultados inconclusivos, foram realizados novos testes na matriz.

1 mg da amostra Pc3 foi solubilizada em 1 mL de MeOH e submetida à estudo exploratório por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC semi-preparativa). Tempo de aquisição: 30 minutos, vazão 1 mL/min a 40

°C e comprimento de onda 280-385 nm. Com base nos dados cromatográficos e dos espectros de massas gerados, foram realizados novos fracionamentos destas frações em colunas abertas de CLC C8 (Item 4.7), o qual pode ser visualizado no **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e posteriormente enviado para análise em RMN, onde foi possível identificar as substâncias isorugulosovina e 10Z-isocitreoviridinol, de acordo com a literatura.

A seguir métodos utilizados nas análises.

Quadro 3. Métodos utilizados em análises HPLC.

Coluna	Descrição	Fase Móvel	Anotações
C-18	Dimensões: 150x4,60 mm 5µm Luna 5u C18(2) 100A	MeOH	Não obteve boa separação
		MeOH/H ₂ O (1:1)	Não obteve boa separação
		MeOH/H ₂ O (6,5:3,5)	Exibiu menos ruídos
		EtOH/H ₂ O (1:1)	Não obteve boa separação
		EtOH/H ₂ O (2:8)	Não obteve boa separação
		EtOH/H ₂ O (4:6)	Exibiu menos ruídos
Phenyl	Dimensões: 150x4,60 mm 5µm Luna 5u Phenyl-Hexyl	MeOH	Não obteve boa separação
		MeOH/H ₂ O (1:1)	Não obteve boa separação
		MeOH/H ₂ O (9:1)	Não obteve boa separação
		MeOH/H ₂ O (6,5:3,5)	Exibiu menos ruídos
		MeOH/H ₂ O (7,5:2,5) 1% ácido fórmico	Obteve boa separação

A amostra Pc3 foi submetida a injeção direta, item 4.9.2, apresentando as seguintes massas visíveis: 220, 234, 258, 274, 298, 388, 402, 418, 434, 448, 512, sendo em seguida fragmentadas, fonte APCI, produzindo íons como consta na tabela 6. A fase móvel utilizada foi metanol/água (6,5:3,5) e 1% de ácido fórmico em coluna Luna 5u Phenyl – Hexyl 150x4,6 mm a uma vazão de 1mL/min., temperatura do forno à 40°C.

Tabela 5. Fragmentação m/z da amostra Pc3.

m/z	fragmentos (+)	fragmentos (-)
220	193 / 179 / 165 / 147 / 139 / 133 / 105	195 / 181 / 167 / 149 / 141 / 135 / 107
234	217 / 207 / 193 / 175 / 167 / 139 / 81	219 / 209 / 195 / 177 / 169 / 141 / 83
258	241 / 229 / 227 / 183 / 167 / 147 / 119 / 105	243 / 231 / 229 / 185 / 169 / 149 / 121 / 107
274	257 / 247 / 229 / 217 / 195 / 179 / 167 / 145	259 / 249 / 231 / 219 / 197 / 181 / 169 / 147
298	297 / 257 / 243 / 239 / 217 / 187 / 145 / 139	299 / 259 / 245 / 241 / 219 / 189 / 147 / 141
388	301 / 283 / 271 / 255 / 221 / 139	303 / 285 / 273 / 257 / 223 / 141
402	315 / 297 / 285 / 259 / 221 / 193 /139	317 / 299 / 287 / 261 / 223 / 195 / 141
418	401 / 383 / 373 / 357 / 339 / 313 / 301 / 275 /125	403 / 385 / 375 / 359 / 341 / 315 / 303 / 277 /127
434	417 / 329 / 291 / 273 / 235 / 209 / 175 / 163	419 / 331 / 293 / 275 / 237 / 211 / 177 / 165
448	429 / 401 / 393 / 337 / 305 / 292 / 187 / 159 / 131	431 / 403 / 395 / 339 / 307 / 294 / 189 / 161 / 133
512	495 / 477 / 451 / 323 / 283 / 191	497 / 479 / 453 / 325 / 285 / 193

A partir desses resultados, especificamente na fragmentação de 402, foi possível identificar a substância citreoviridina, de acordo com a literatura.

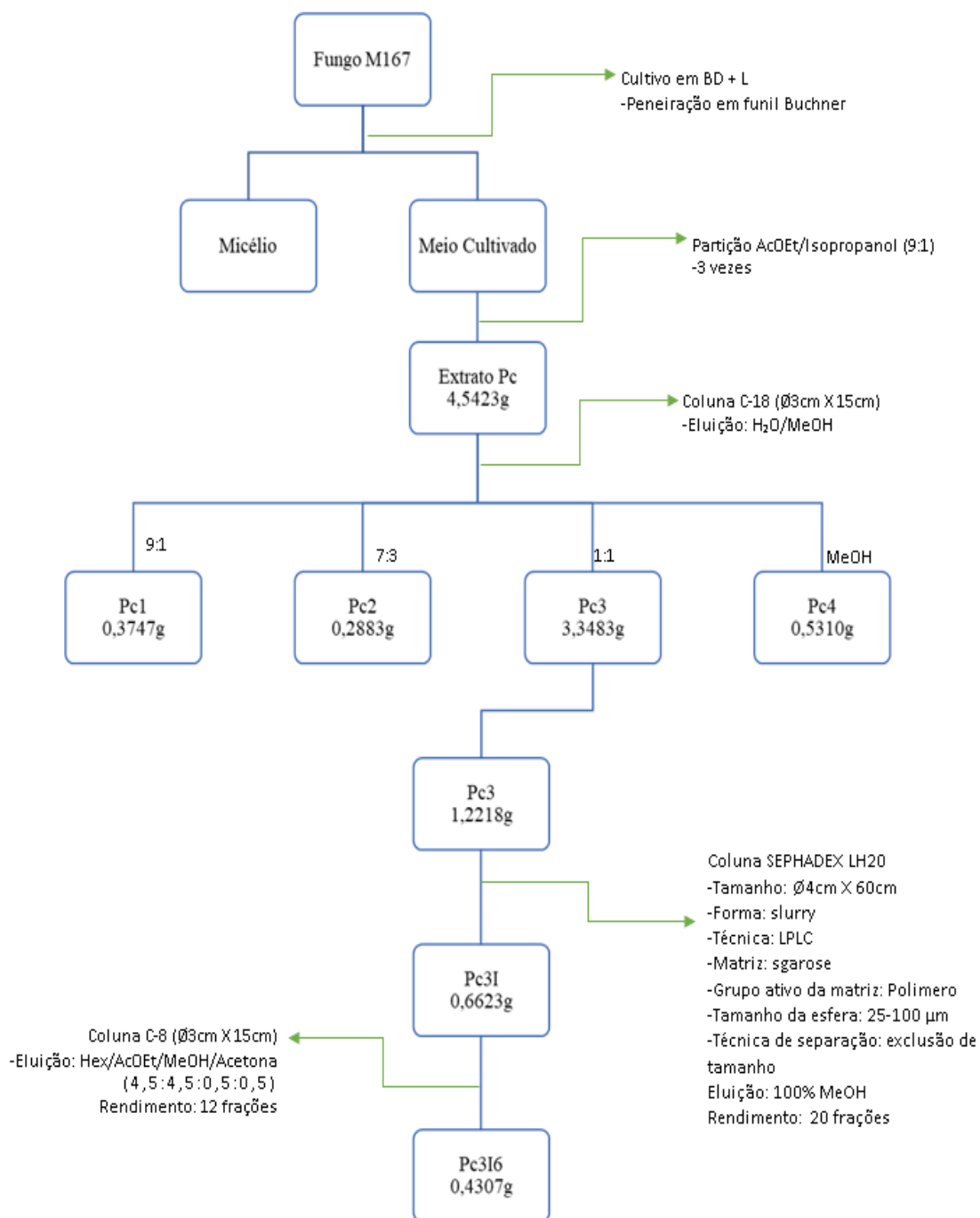


Figura 25. Fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema I.

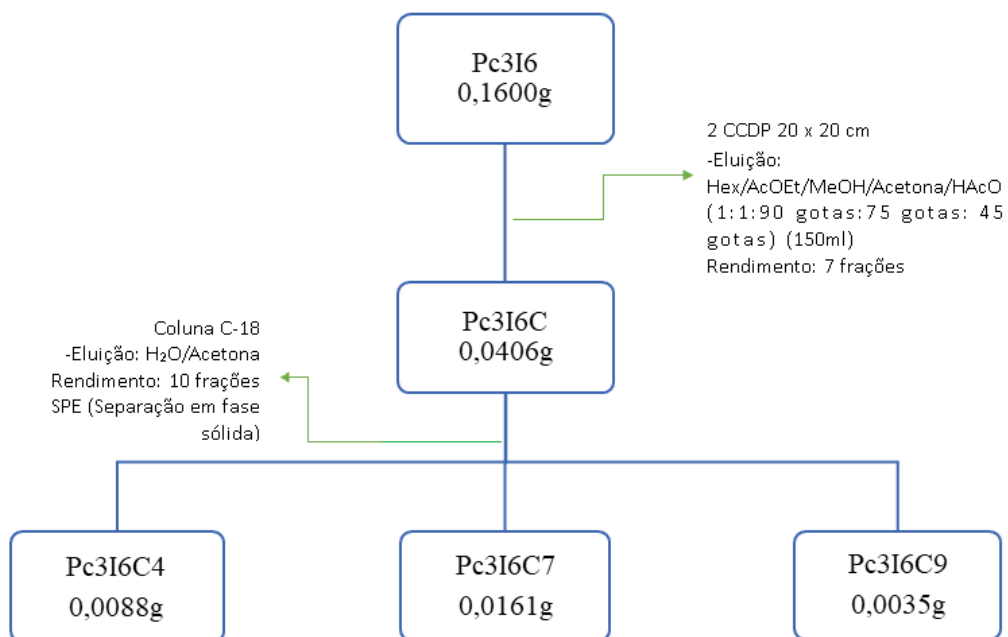


Figura 26. Continuação do fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema II

Os esquemas 1 e 2 foram as primeiras tentativas, os quais não obtiveram resultados favoráveis, conforme citados anteriormente. O procedimento representado pelo esquema 3, representa a metodologia aplicada que obteve resultado, o qual foi possível isolar e identificar as substâncias descritas nos resultados.

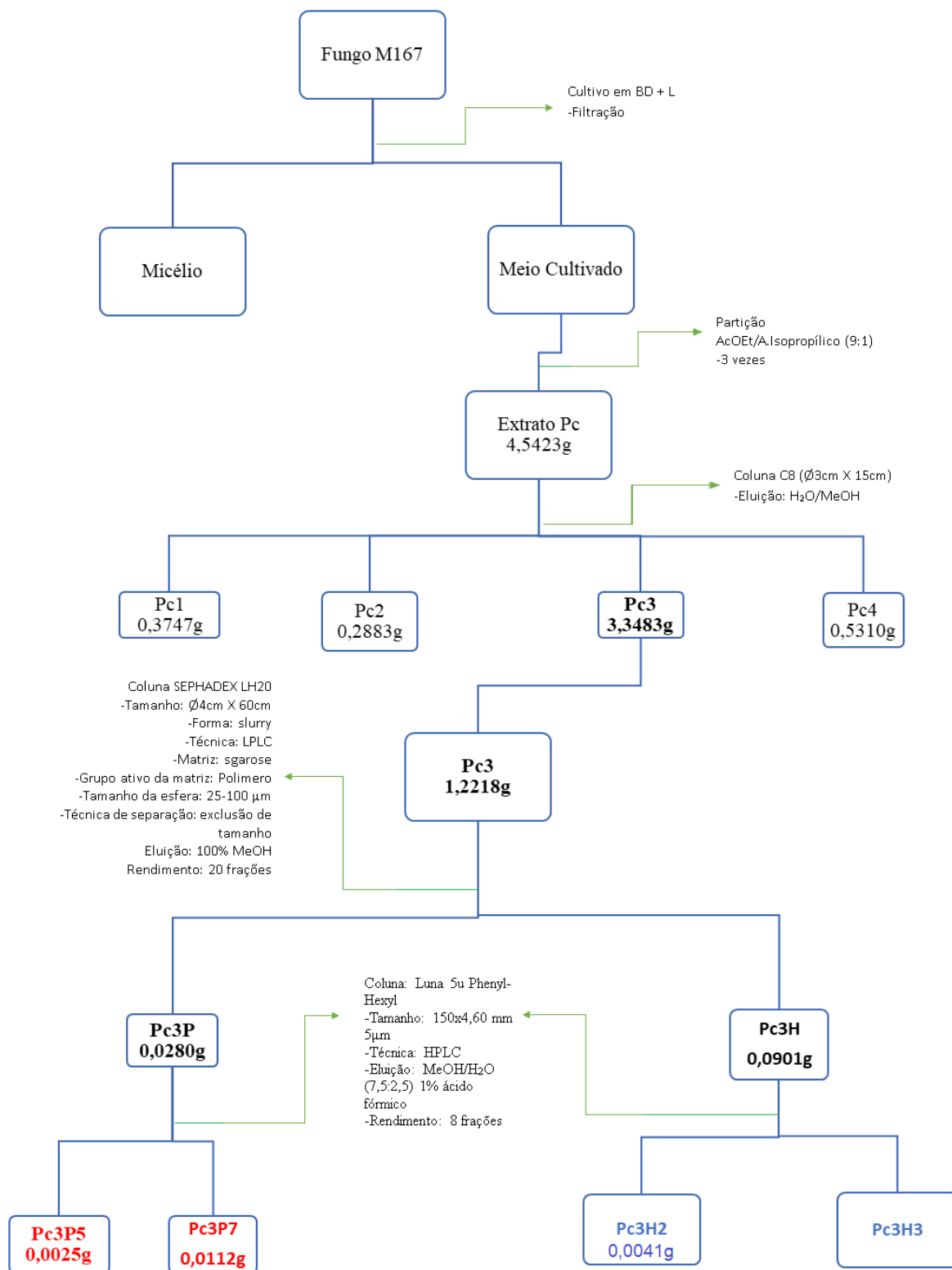


Figura 27. Fluxograma das metodologias aplicadas: Esquema III

4.10 Ensaios de extratos

4.10.1 Ensaios de atividade larvicida

Em parceria com a Fiocruz, as frações do extrato do meio líquido foram submetidos a ensaios larvicidas para *Aedes Aegypti*.

Para o ensaio larvicida do extrato bruto, foram pesados 5,5 mg da amostra e dissolvidos em 100 µL de DMSO e 20 mL de água destilada, com a adição de 1 mg de ração para alimentação das larvas em copos plásticos de 50 mL. Em seguida, foram selecionadas 10 larvas de *Aedes Aegypti*, sendo então transferidas ao meio. Estes ensaios foram realizados em triplicata. Para controle negativo, foi utilizado 100 µL de solvente DMSO em 20 mL de água destilada. A atividade foi aferida pela porcentagem de mortalidade das larvas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação, em uma temperatura de 28°C.

A porcentagem de mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade}(\%) = \left(\frac{LM}{LT} \right) * 100$$

Onde:

LM = Larvas mortas;

LT = Larvas totais

4.10.2 Teste de citotoxicidade *in vitro*

Os testes de citotoxicidade foram realizados no instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – AM), em parceria com a Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz, na subunidade de Bioensaios de Compostos Biotecnológicos. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia Alamar Blue, conforme proposto por Ahmed et. al (1994), onde cinco frações do extrato do meio cultivado, nas concentrações de 50 µg/mL a 6,25 µg/mL, foram submetidas ao teste de citotoxicidade frente a linhagem de fibroblasto humano MRC5, sendo cultivadas em *Dullbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS) e antibiótico penicilina (50 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata.

As células foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência em estufa a 5% de

CO₂ e uma temperatura de 37 °C, as células foram tratadas com as frações, previamente solubilizados em DMSO e testados nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora por um período de 72 horas, nas mesmas condições relatadas acima. Foi utilizado Doxorubicina (DOX) como controle da droga, sendo testado nas mesmas concentrações que as amostras, enquanto o controle negativo foi feito apenas com o meio de cultura. O controle positivo foi apenas o crescimento celular.

Após este período de incubação, foram adicionados 10 µL de resazurina 0,4% em cada poço. Ao término do período de metabolização de 2 horas deste composto, foi realizada a leitura de fluorescência. A fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (GloMax® Explorer). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte equação:

$$(\%)Viabilidade = \left(\frac{Ft}{Fb}\right) \times 100$$

Onde:

Ft = Fluorescência da célula + meio + amostra + resazurina

Fb = Fluorescência da célula + meio + resazurina

Os dados obtidos dos testes de citotoxicidade foram analisados de acordo com o desvio padrão (σ) da porcentagem de inibição do crescimento celular utilizando o *software* GraphPad Prism v.8. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.**⁵ apresenta uma classificação para a toxicidade das frações analisadas de acordo com a viabilidade celular determinada (SLETTEN e DAHL, 1999; LÖNROTH e DAHL, 2003).

Tabela 6. Classificação de citotoxicidade

Classificação	Viabilidade Celular (%)
Atóxico	> 90
Levemente citotóxico	> 60 a < 90
Moderadamente citotóxico	> 30 a < 60
Severamente citotóxico	<30

Fonte: Sletten e Dahl (1999); Lönröth e Dahl (2003)

4.10.3 Teste antimicrobiano

Em parceria com Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazonia na Central Analítica, dez frações, denominadas Pc1, Pc3, Pc4, C7, D, E, F, G, J e M, nas concentrações de 2 mg/mL (solução mãe) em 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90 % de H₂O destilada autoclavada foram submetidas ao teste antimicrobiano frente as cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e *Enterococcus faecalis* (E 002).

Os microrganismos testados foram cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e *Enterococcus faecalis* (E 002). As bactérias foram reativadas em Mueller Hinton (MH) ágar (HIMEDIA®) e mantidas a 36 ± 1 °C por 24 horas. Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI para bactérias posteriormente incubados a 36 ± 1 °C por 24 horas. A concentração de colônias utilizada no teste foi correspondente ao número 0,5 da escala de turbidez Mc Farland, na concentração de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) para bactérias de acordo com as recomendações da Clinicaland Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002; CLSI, 2003).

Para o preparo das amostras foram pesadas e solubilizadas na concentração de 2 mg/mL (solução mãe) em 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90 % de H₂O destilada autoclavada. Como controle negativo foi realizado com a substituição das amostras por água autoclavada. O controle positivo foi realizado substituindo as amostras por antibióticos na concentração da solução mãe de 2 mg/mL sendo administrado cloridrato de ciprofloxacino para *P. aeruginosa* e ampicilina para *E. faecalis*.

4.10.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio em placas de microdiluição

Realizou-se uma triagem (screening) das amostras para verificação da efetividade das mesmas frente aos patógenos citados anteriormente. A triagem foi realizada em microplaca de 96 poços onde foram adicionados em triplicata 100 µL do meio de cultura na concentração dobrada, 100 µL da solução mãe da amostra (2 mg/mL) e 10 µL da suspensão de células dos patógenos na concentração citada no item 1. Os ensaios foram incubados a 36 ± 1 °C por 24 h. Decorrido esse tempo as placas foram reveladas com TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolio).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaios biológicos

5.1.1 Ensaios de atividade larvicida

Após 72 horas a fração do extrato do meio líquido não demonstrou ação larvicida frente ao *Aedes Aegypti*.

5.1.2 Teste de citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da inibição do crescimento celular em ambiente de cultura *in vitro* foi conduzida através da análise da reação redox do indicador resazurina. Essa reação foi provocada pelas frações em investigação, com o propósito de determinar sua atividade citotóxica. Os resultados obtidos foram determinados em porcentagem para diferentes amostras, incluindo as frações 14 RI (precipitado formado), 15 RI1 (Pc1), 16RI2 (Pc2), 17 RI 3 (Pc3), 18 RI 4 (Pc4) (Figura 28).

As cinco frações do extrato do meio cultivado submetidas ao teste de citotoxicidade frente a linhagem de fibroblasto humano MRC5, nas concentrações de 50 µg/mL a 6,25 µg/mL, apresentaram elevada toxicidade. Isso é possível verificar no gráfico 1, em que estão representadas as viabilidades das células frente à cada fração, tendo sido considerado 100% viável o controle de células. Observa-se que a viabilidade das células MRC5 frente às amostras apresenta atividade abaixo de 50% em todas as concentrações ensaiadas. Essa porcentagem elevada de toxicidade nas concentrações testadas para todas as amostras foi superior inclusive à doxorrubicina (controle positivo), a droga de referência. Em consequência disto, as frações não foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade frente as células tumorais.

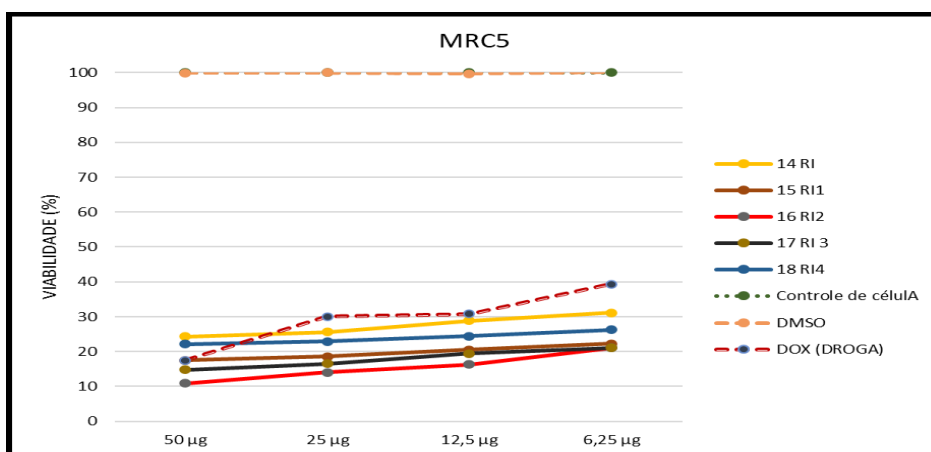


Figura 28. Resultado da análise de citotoxicidade das frações frente a célula MRC5.

5.1.3 Teste antimicrobiano

Dez amostras denominadas Pc3 (1), C7 (2), D (3), E (4), F (5), G (6), J (7), M (8), Pc1 (9) e Pc4 (10), nas concentrações de 2 mg/mL em 10 % de DMSO e 90 % de H₂O destilada, foram submetidas ao teste antimicrobiano frente as cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e *Enterococcus faecalis* (E 002), onde as amostras C7 (2), D (3), E (4), F (5), G (6), J (7), M (8) eram frações de Pc3.

As amostras M (8), Pc4 (10) e o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino (C⁺) apresentaram atividade frente a *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, enquanto as amostras D (3), E (4), G (6) e ampicilina (C⁺) apresentaram atividade somente contra *E. faecalis* na concentração de 1mg/mL (Figura 31).

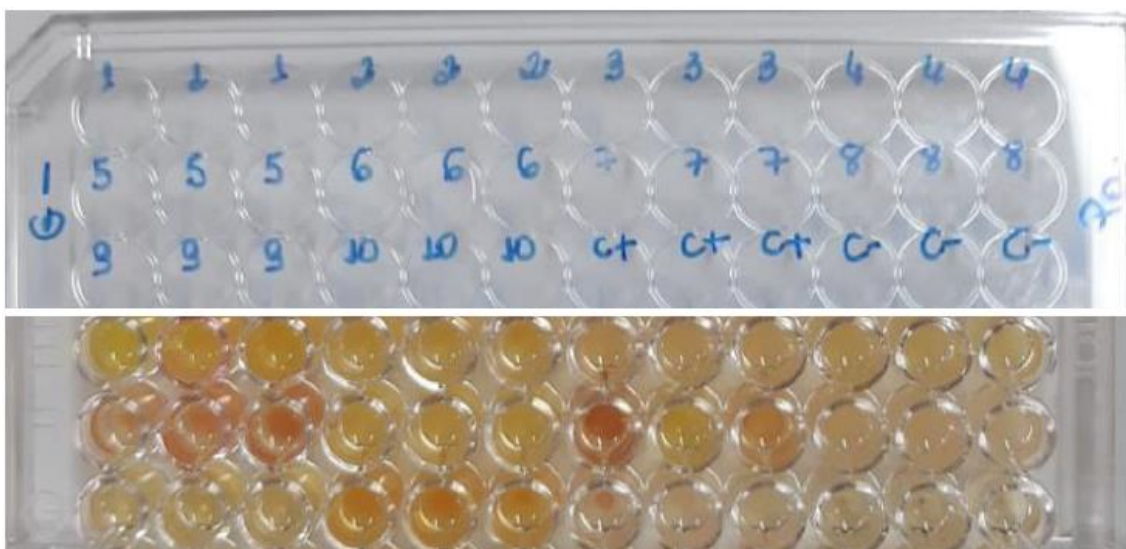


Figura 29. GRAM NEGATIVA – *Pseudomonas aeruginosa*. As frações correspondentes aos poços estão no quadro 1

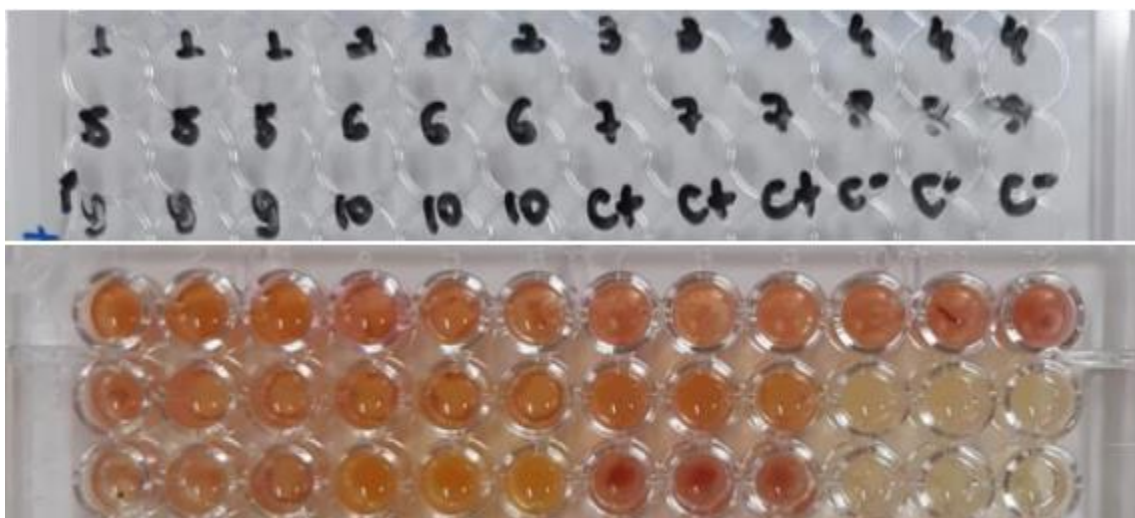


Figura 30. GRAM POSITIVA – *Enterococcus faecalis*. As frações correspondentes aos poços estão no quadro 1.

Quadro 4. Resultados do teste antimicrobiano

Patógenos/ Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C-	C+
	Pc3	C7	D	E	F	G	J	M	Pc1	Pc4	Sem	Ant
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (G-)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (G+)	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1

Legenda* 1= apresentou atividade 0= não apresentou atividade

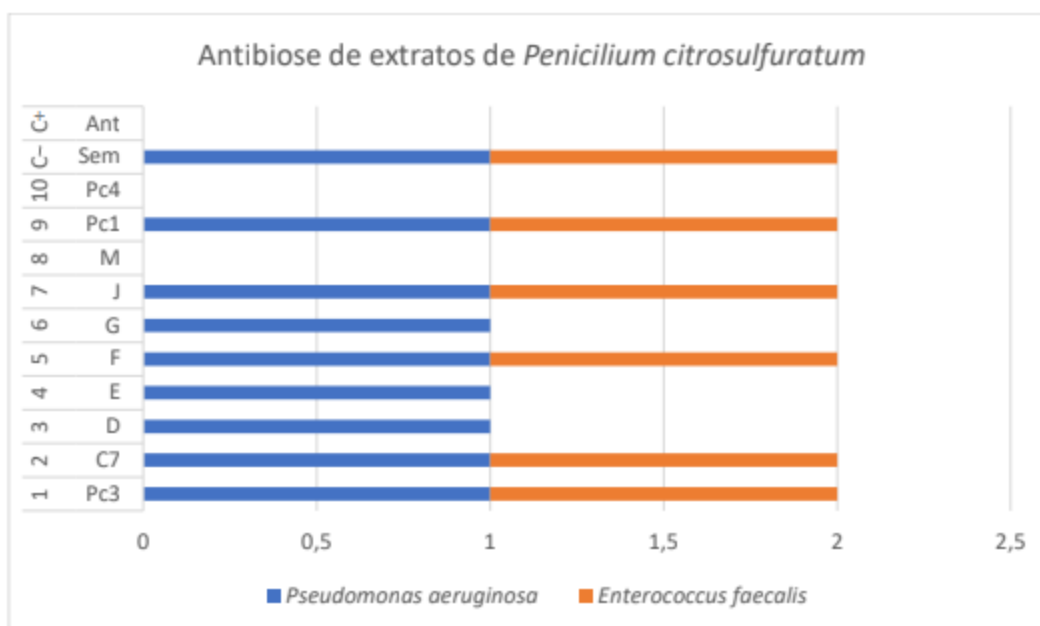


Figura 31. As amostras analisadas frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa oportunista que pode causar infecções em indivíduos com sistema imunológicos comprometidos ou em ambientes hospitalares. É conhecida por sua resistência a diversos antibióticos e sua capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes o que torna seu tratamento desafiador (Gonçalves & Goulart, 2021). Para combater a *P. aeruginosa*, é crucial considerar a escolha de antibióticos eficazes a fim de evitar o desenvolvimento de resistência, no entanto, sua resistência vem aumentando aos antibióticos, levando à necessidade de abordagens alternativas. A *Enterococcus faecalis*, por sua vez, é uma bactéria Gram-positiva que normalmente reside no trato gastrointestinal humano e, também, pode causar infecções, principalmente em ambientes hospitalares. Assim como *P. aeruginosa*, essa bactéria desenvolveu resistência a muitos antibióticos, incluindo a vancomicina e, portanto, a busca por novos agentes terapêuticos é importante para combater *E. faecalis* (Lângaro, 2020).

Para ambos os casos, a prevenção de infecções hospitalares, controle de infecções e o uso adequado de antibióticos são fundamentais para minimizar a disseminação desses patógenos, através do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como produtos naturais, que podem ser explorados como opções promissoras de combate às duas bactérias.

5.2 Parte química

5.2.1 Caracterização da citreoviridina

A citreoviridina, obtida da fração Pc3, foi caracterizada por meio de fragmentação em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS), item 4.9.2. Essa fração apresentou máximos de absorção no comprimento de onda 385 nm. A banda em 385 nm, dentro da faixa de 380-440 nm é coerente com a absorção da cor violeta e permite observar a cor complementar amarela, característica da toxina, devida à presença de suas duplas ligações conjugadas (Figura 32).

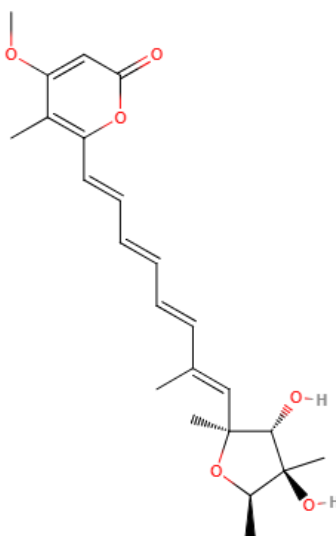


Figura 32. Estrutura da micotoxina citreoviridina.

O espectro de LC-MS apresentou o íon molecular protonado ($[M+H]^+$) em m/z 403. Através da fragmentação da molécula protonada com energia de colisão 15% foram encontrados os íons em m/z : 315, 297, 285, 259, 193, 143 e 139 (Figura 33).

Este perfil de fragmentação é semelhante ao encontrado para o padrão analítico de citreoviridina, onde os fragmentos em m/z 315,2 e 139,1 podem ser selecionados como íons de quantificação e confirmação em análises de matrizes alimentícias para esta micotoxina (Rocha, 2013).

FRAGMENTACAO_403 #416-438 RT: 2.49-2.58 AV: 23 NL: 7.78E2
T: ITMS + c APCI corona Full ms2 403.00@cid15.00 [110.00-405.00]

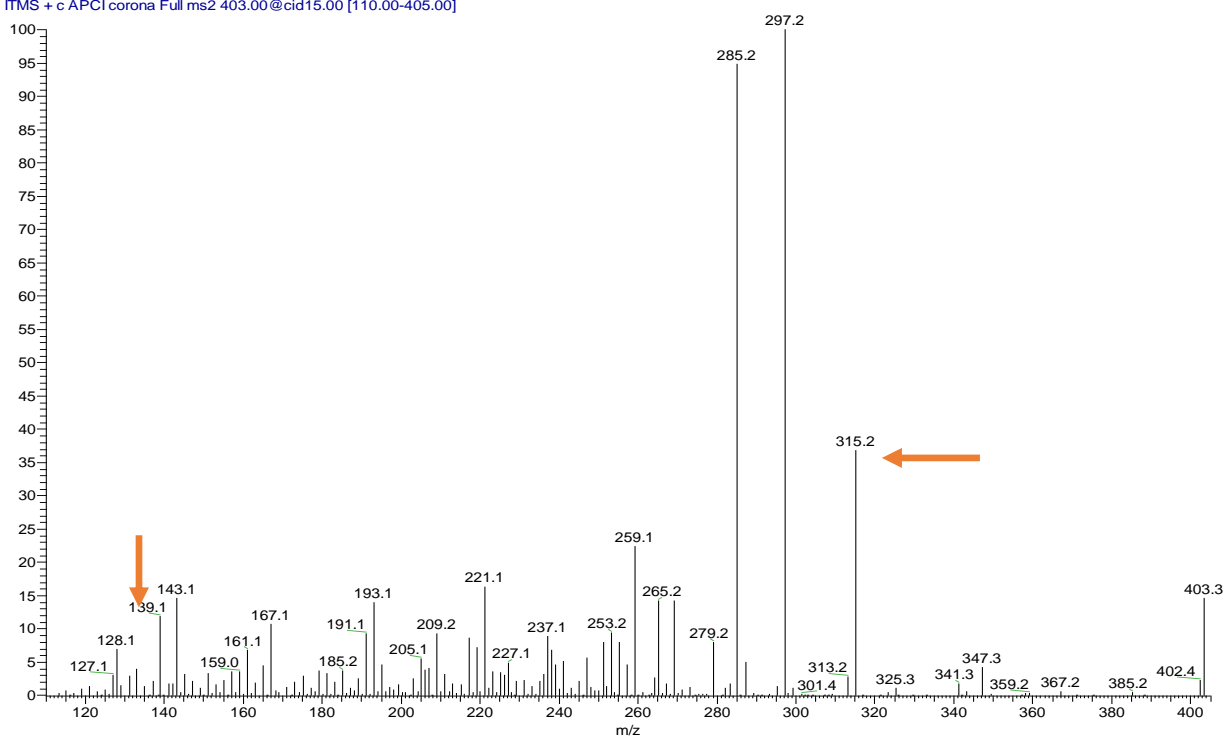


Figura 33. Fragmentação do íon m/z 403,3 ($M+H$) em fonte APCI.

O íon m/z 315,1, formado após uma perda neutra de 88 daltons (Da), correspondendo provavelmente à $C_4H_8O_2$, que é possível através da fragmentação do anel de cinco membros (Figura 34).

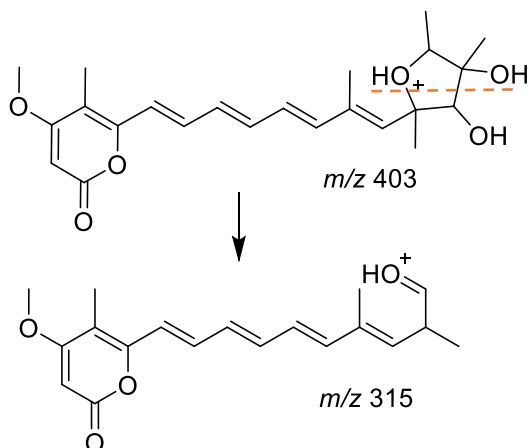


Figura 34. Fragmentação do anel de cinco membros da citreoviridina.

A citreoviridina é uma micotoxina produzida por espécies fúngicas ascomycetas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No último gênero, a produção deste inclui *P. charlesii*, *P. citreovidride*, *P. citreonigrum*, *P. pedemontanum* e *P. pulvillorum*. Esta toxina pode ser produzida quando esses fungos contaminam o

arroz úmido e outros grãos armazenados (Ivanaka et al. 2010), embora também possa afetar as culturas no campo (Wicklowsky et al. 1984). Nos seres humanos, causa beribéri cardíaco e também danifica o fígado e os rins (Rosa et al. 2010). A citreoviridina também está relacionada à doença de Keshan (Sun 2010), uma cardiomiopatia caracterizada por episódios agudos ou crônicos que afeta principalmente crianças e mulheres jovens e ocorre através do consumo de cereais mofados. Testes realizados em laboratório sobre a ação da acetilcolinesterase (AChE), enzima que atua na propagação do impulso nervoso inativando a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando em acetato e colina, e ATPase, classe de enzimas que catalisam a decomposição do trifosfato de adenosina (ATP), em cérebro de ratos (Datta & Ghosh 1981), apontaram que a micotoxina atua como um inibidor dessas enzimas, em específico ATPase em mitocôndria (Linnett et al. 1978), incluindo no coração (Sayood et al. 1989).

A Citreoviridina é altamente tóxica para os seres humanos (Nishie et al. 1988; Peraica et al. 2000), e também responsável por danos da saúde da população, especialmente em áreas onde grãos como arroz são consumidos em alto volumes (Carajal-Moreno 2015; Ivanaka et al. 2010). Isso levou à imunocromatografia, método barato de detecção de doenças infecciosas, hormônios e outros analitos em alimentos, usando anticorpos monoclonais (Li et al. 2020). É provável que os impactos em mamíferos são uma consequência acidental das ações de citreoviridina contra competidores potenciais, como *Saccharomyces*, cuja substância se liga especificamente em partes de suas ATPases (Gause et al. 1981), através da possível proteção do fungo contra a exposição a altos níveis de luz UV (Andrade 2016).

Embora altamente tóxico para os mamíferos (Ueno 2020), a citreoviridina foi julgada como um agente de controle de malária, através da capacidade de atacar especificamente as mitocôndrias de *Plasmodium* (De Flombaum & Stoppani 1981), e é conhecido por atacar especificamente células de câncer de pulmão, deixando células saudáveis ilesas (Wu et al. 2013). Atua afetando a dobragem de proteínas, o ciclo celular e a função do citoesqueleto em tais células, suprimindo o crescimento celular do câncer e a proteína quinase (ativada por mitógeno), a qual é regulada por sinalização extracelular, através de desfosforilação específica de HSP90AB1 (membro citoplasmático localizado no

retículo endoplasmático) e de serino 255 (proteína membro de uma família de enzimas proteolíticas) (Hu et al. 2015).

5.2.2. Caracterização da isorugulosuvina

A amostra codificada como Pc3P5 (2,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo turvo. No espectro de massas no modo positivo (Figura 35) foi observado um pico base de m/z 334, correspondente a um possível alcaloide. Quando submetido à fragmentação, este íon apresentou perda inicial de 59 Da, seguida de 104 e 153 Da, gerando os fragmentos em m/z 275, 230 e 181, respectivamente.

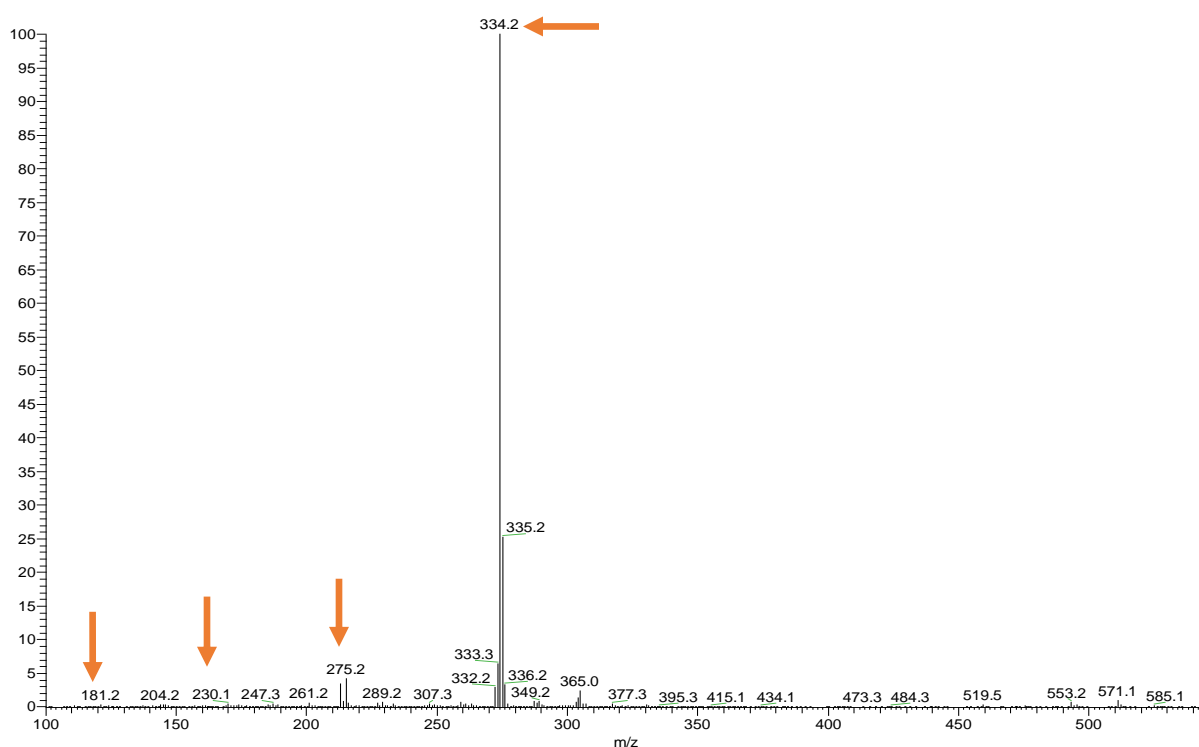


Figura 35. Espectro de massas da amostra Pc3P5 (modo positivo).

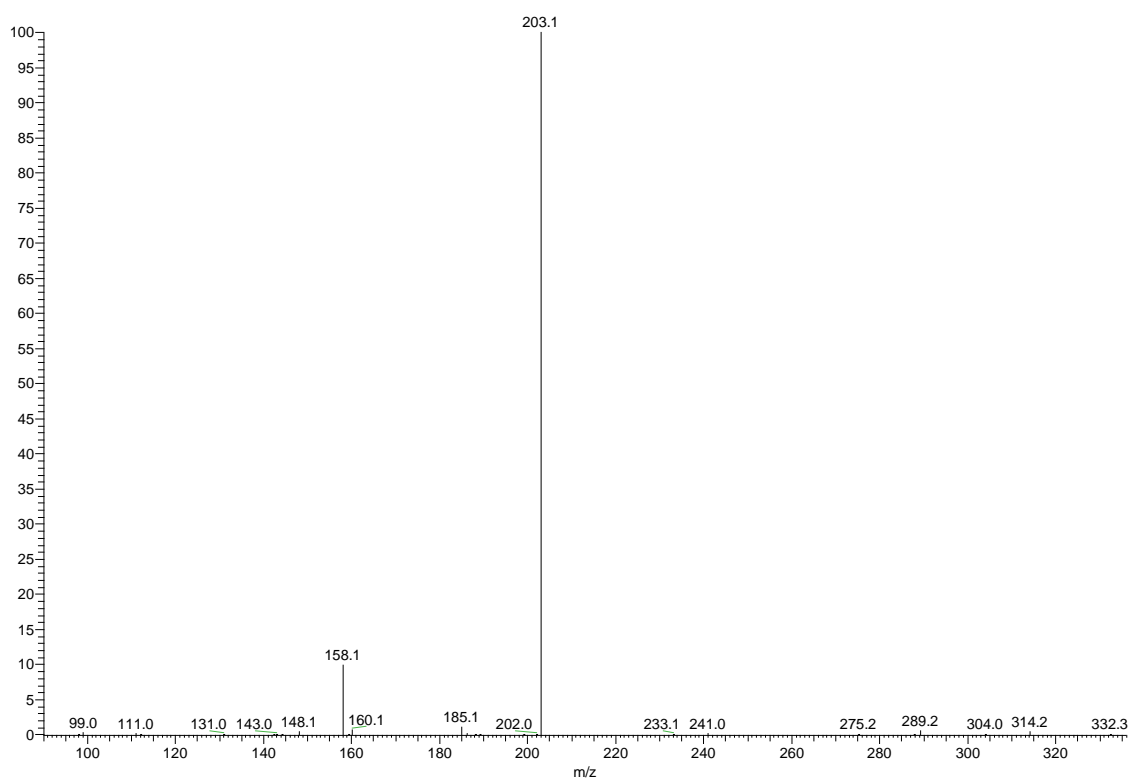


Figura 36. Espectro de massas da amostra Pc3P5 (modo negativo).

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 37 e 38), foram observados diversos sinais na região de δ 6,5-8,5, sugerindo a presença de anéis aromáticos. Ainda no espectro de RMN de ^1H foi observado um sinal desblindado em δ 10,89, além de sinais de hidrogênios metínicos em δ 3,97 (1H, m) e 3,85 (1H, m), e metilênicos em δ 2,80 (1H, dd, 14,6, 4,6) e 2,52 (1H, m), e 2,46 (1H, dd, 13,3, 4,9) e 1,84 (1H, dd, 13,4, 7).

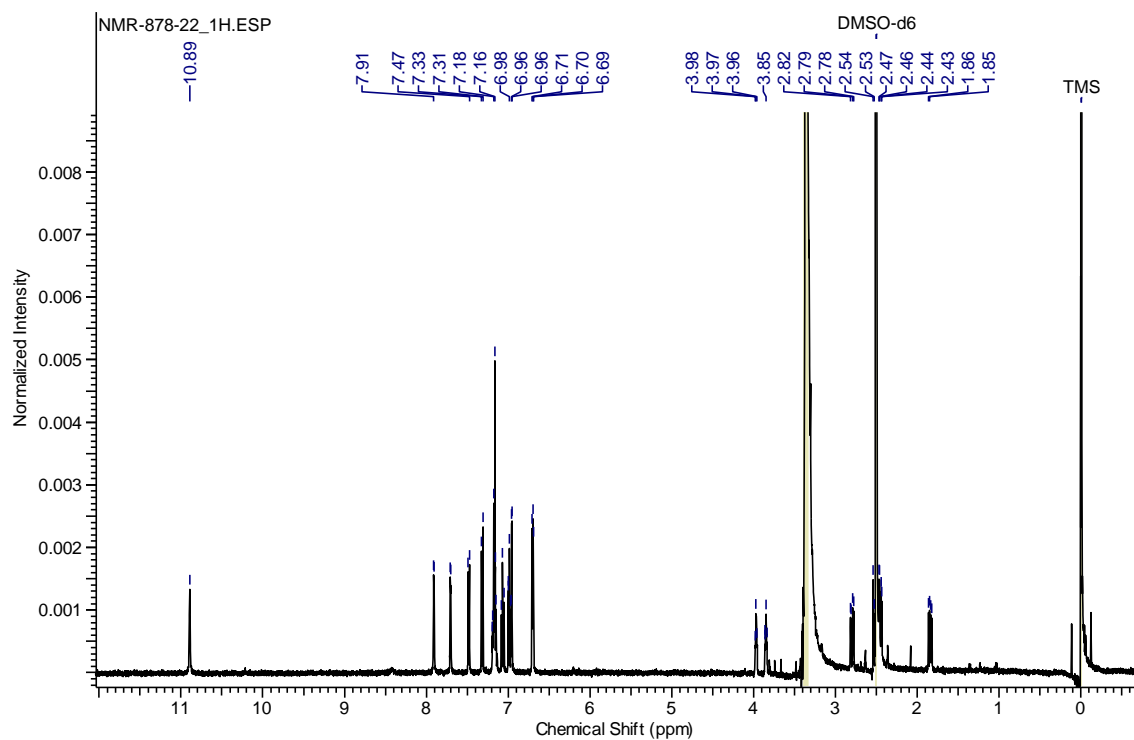


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5.

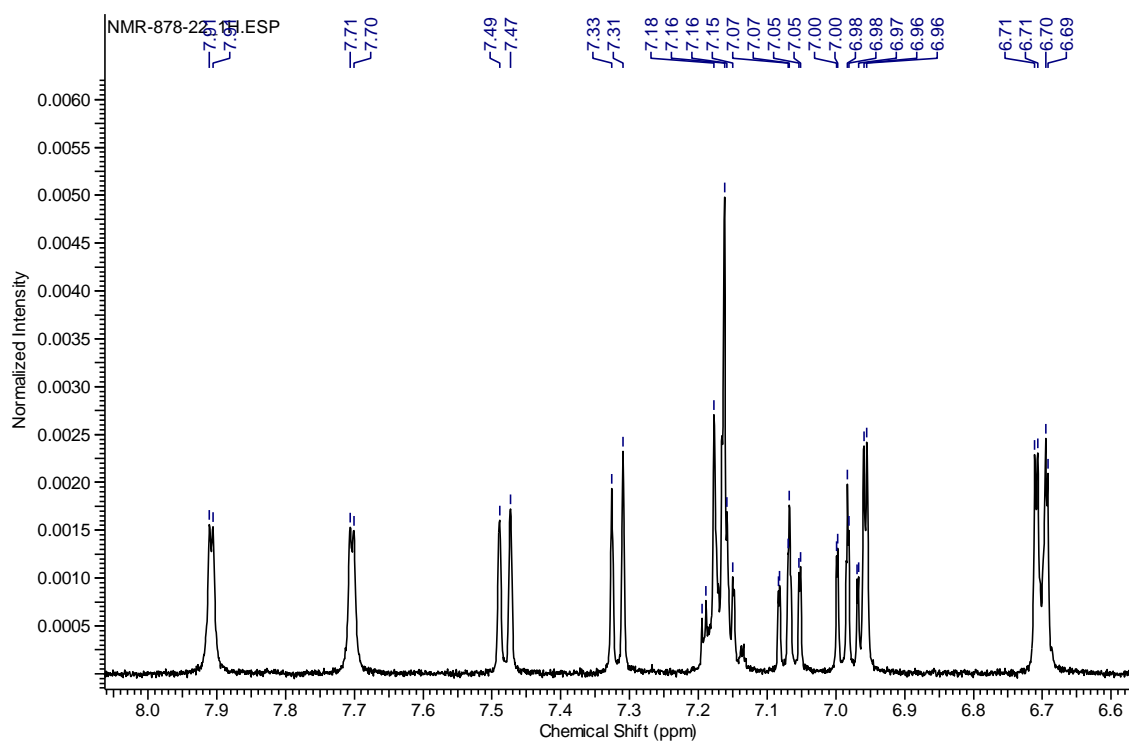


Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5 na região de 5-7.5 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) foram observados sinais de 20 carbonos, dos quais 8 se mostraram característicos de anel indólico (δ 124,2, 108,6, 135,8, 111,1, 120,7, 118,2, 118,5 e 127,3) e 4 de sistema dicetopiperazínico (δ 55,0, 55,4, 165,9, 166,6). Através do mapa de correlação HSQC (Figuras 40 e 41) foram observadas correlações do hidrogênio do anel indólico em δ 6,96 (1H, d, 2,2) com o carbono em δ 124,2. Ainda no mapa de correlação HSQC, foram observadas correlações para os hidrogênios metínicos do anel dicetopiperazínico em δ 3,97 (1H, m) e 3,85 (1H, m) com os carbonos em δ 55,0 e 55,4, respectivamente.

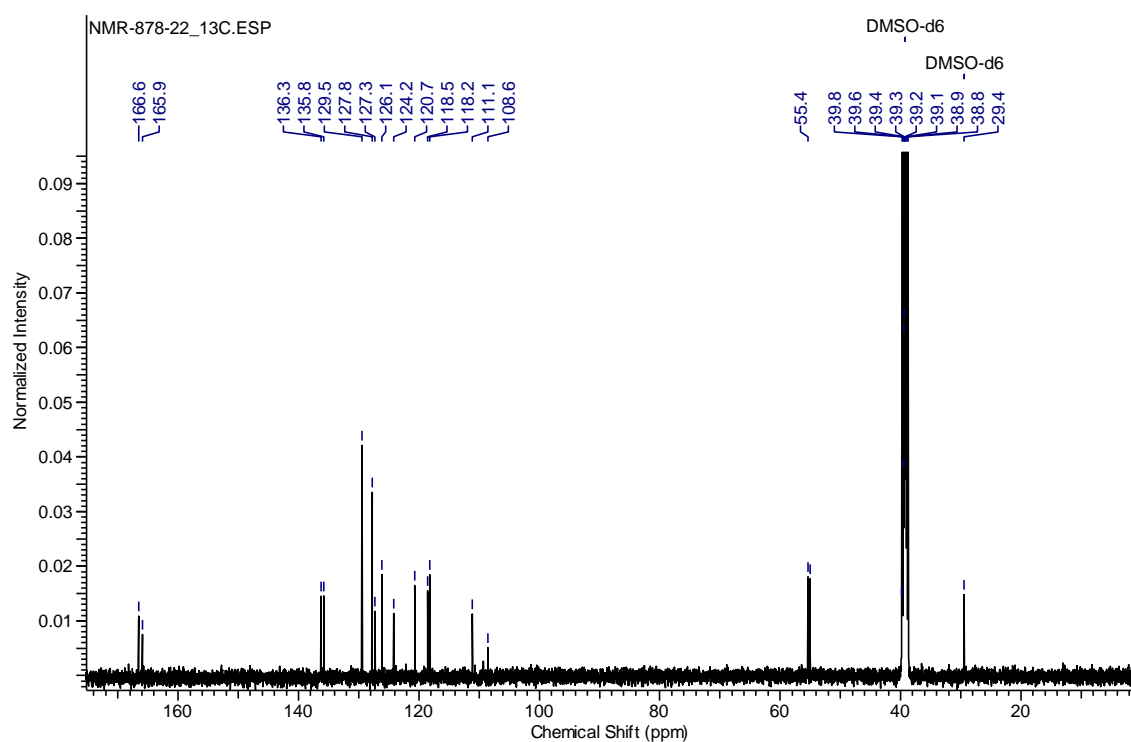


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3P5.

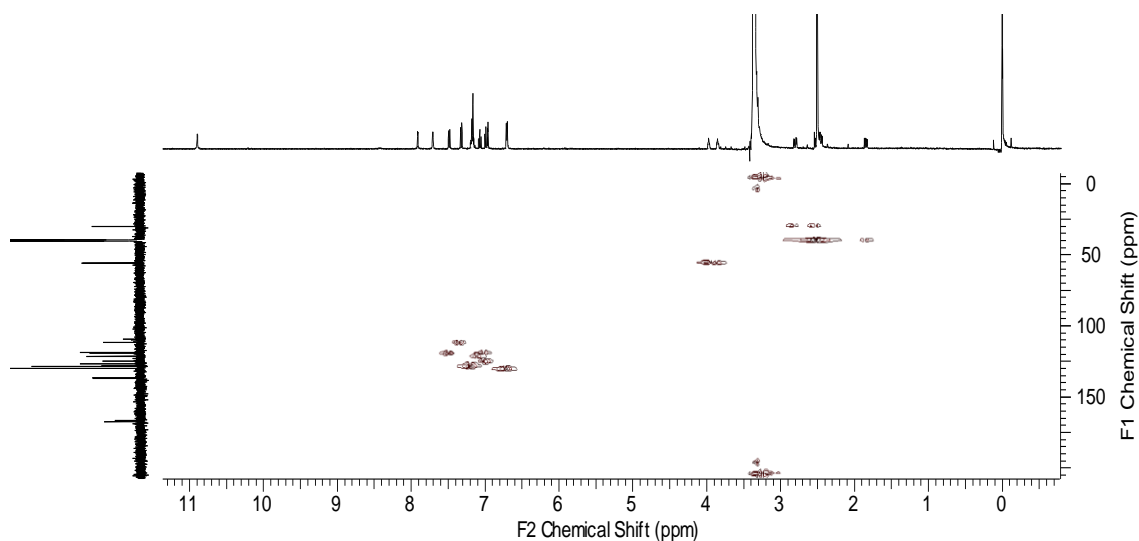


Figura 40. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3P5.

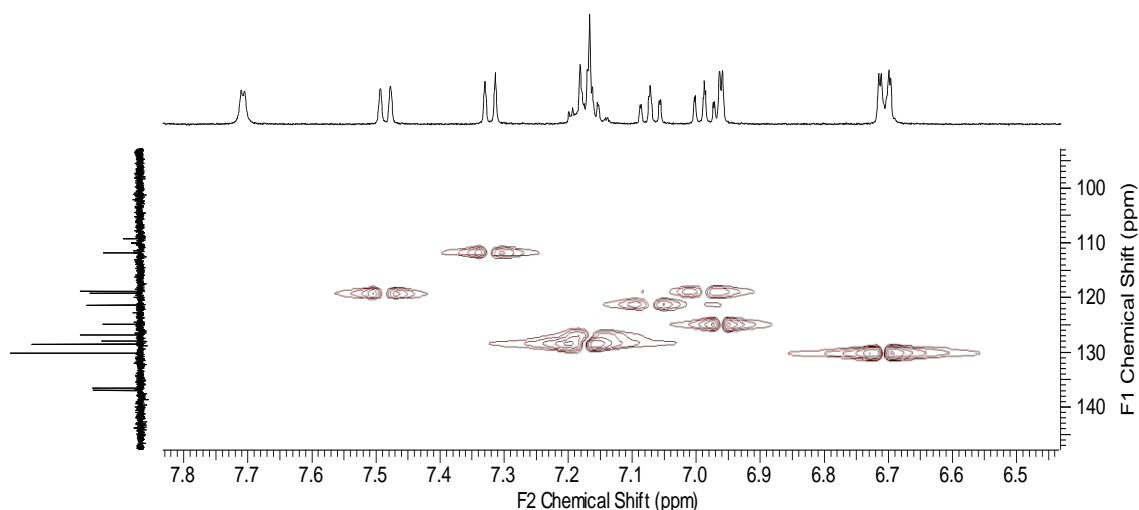


Figura 41. Ampliação do mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3P5 na região de 5,5-8 ppm.

Através do mapa de contorno HMBC (Figuras 42 e 43) foram observadas correlações para o hidrogênio em δ 6,96 (1H, d, 2.2) com os carbonos em δ 108,6, 127,2 e 135,8, confirmando assim a presença do anel indólico. Ainda no mapa de contorno HMBC foram observadas correlações para o hidrogênio metínico em δ 3,97 (1H, m) com os carbonos em δ 29,4, 108,6 e 166,6, e para o hidrogênio metínico em δ 3,85 (1H, m) com os carbonos em δ 39,5, 136,3, 165,9, confirmando assim a conectividade entre o anel indólico e o anel dicetopiperazínico. Por fim, as correlações observadas entre os hidrogênios em δ

2,46 (1H, dd, 13,3, 4,9) e 1,84 (1H, dd, 13,4, 7) com os carbonos em δ 55,4, 129,5, 136,3, 165,9 indicam a presença de um anel aromático terminal, o que pode ser confirmado através das demais correlações no mapa de contorno HMBC (Tabela 7).

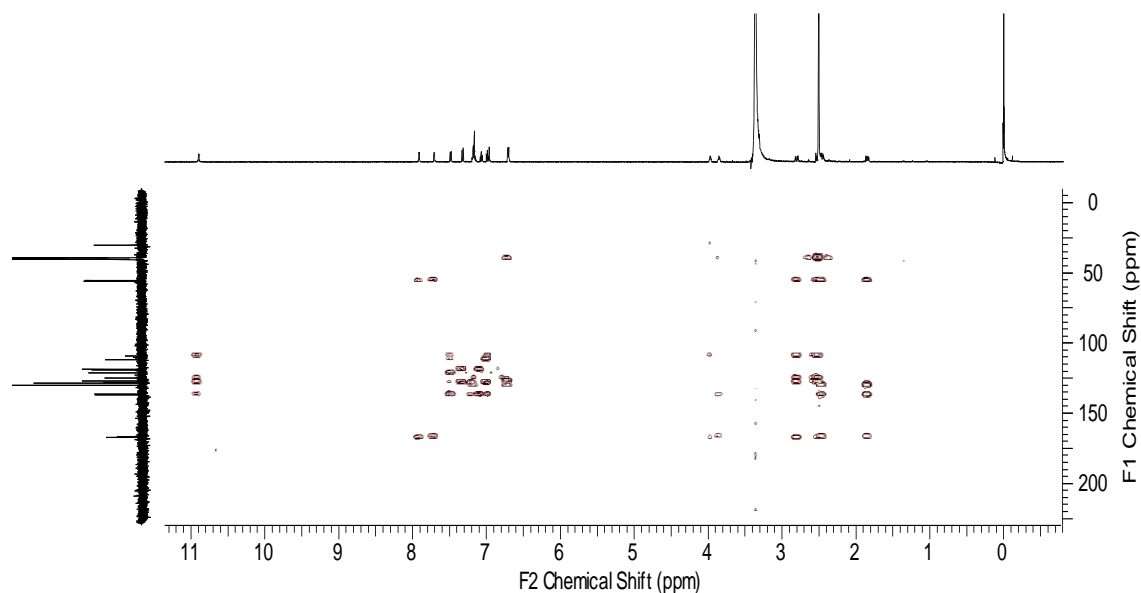


Figura 42. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3P5.

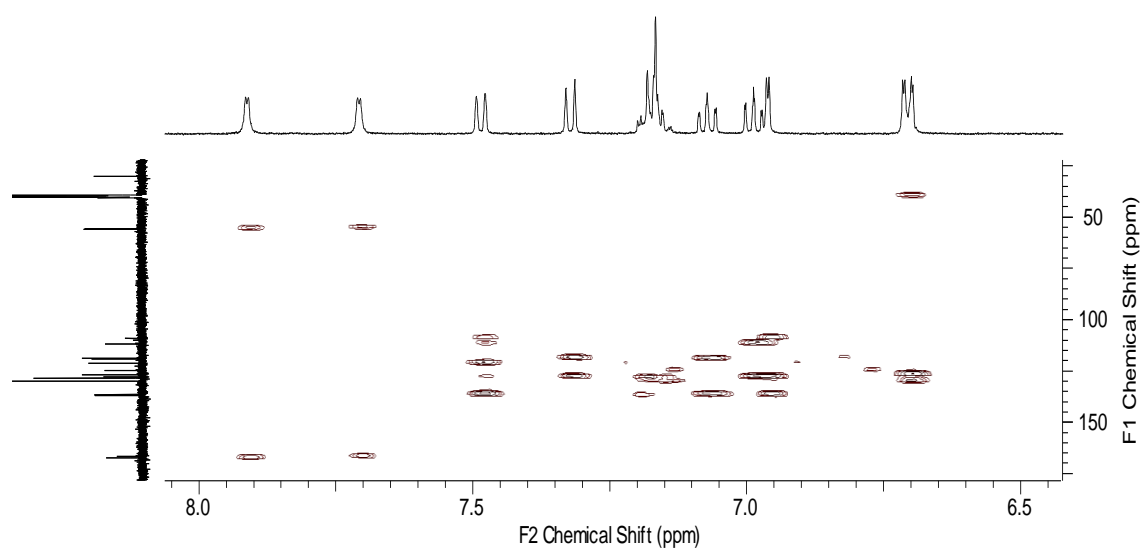


Figura 43. Ampliação do mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3P5 na região de 5,5-8 ppm.

Todas os sinais e as correlações observadas nos espectros de RMN 1D e 2D são coerentes com a estrutura do alcalóide isorugulosovina (Figura 44). Os dados de RMN de ¹H obtidos são coerentes com dados da literatura (Auckloo et

al., 2017.), embora com algumas necessárias correções destes, conforme as correlações observadas para a amostra Pc3P5 (Tabela 6). Quanto aos ensaios biológicos, no que se refere a citotoxicidade, a fração de origem Pc3 (17 RI 3) apresentou alto teor toxicidade de acordo com a viabilidade celular determinada (Item 4.10.2). Em relação ao teste antimicrobiano frente as cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e *Enterococcus faecalis* (E 002), essa fração não apresentou atividade (Item 4.10.3).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra Pc3P5.

Posição	^1H (mult., J em Hz) ^a	^{13}C ^a	HMBC ^a	^1H (mult., J em Hz) ^b
1-NH	10,89 (1H, s)	-	108,6, 124,2, 127,3, 135,8	10,89 (s, 1H; NH)
2	6,96 (1H, d, 2,1)	124,2	108,6, 127,2, 135,8	7,00–6,95 (m, 1H)
3	-	108,6	-	-
3a	-	127,3	-	-
4	7,49 (1H, d, 8,0)	118,5	108,6, 127,3, 120,7; 135,8	7,31 (d, J=8,0 Hz, 1H)
5	6,99 (1H, td, 7,5, 0,9)	118,2	111,1, 127,3	7,07 (t, J=6,8 Hz, 1H),
6	7,07 (1H, td, 7,6, 1,1)	120,7	118,5, 135,8	7,00–6,95 (m, 1H)
7	7,32 (1H, d, 8,1)	111,1	118,2, 127,3	7,48 (d, J=8,0 Hz, 1H)
7a	-	135,8	-	-
8	2,80 (1H, dd, 14,6, 4,6) e 2,52 (1H, m)	29,4	55,0, 108,6, 124,2, 127,3, 166,6	2,80 (dd, J=14,4 Hz, 4,0 Hz, 1H; AB) e 2,54–2,43 (m, 1H; AB),
9	3,97 (1H, m)	55,0	29,4, 108,5, 166,6	3,97 (br s, 1H)
10	-	166,6	-	-
11-NH	7,71 (1H, d, 2,4)	-	55,0, 165,9	7,70 (br s, 1H; NH)
12	3,85 (1H, m)	55,4	39,5, 136,3, 165,9	3,86 (br s, 1H),
13	-	165,9	-	-
14-NH	7,91 (1H, d, 2,2)	-	55,4, 166,6	7,91 (br s, 1H; NH)
15	2,46 (1H, dd, 13,3, 4,9) e 1,84 (1H, dd, 13,4, 7)	39,5	55,4, 129,5, 136,3, 165,9	2,54–2,43 (m, 1H; AB) e 1,84 ppm (dd, J=13,2 Hz, 6,8 Hz, 1H; AB)
16	-	136,3	-	-
17	6,71 (1H, 6,7, 1,8)	129,5	39,5, 126,1, 129,5	6,71–6,69 (m, 1H)
18	7,18 (1H, m)	127,8	127,8	7,19–7,15 (m, 1H)
19	7,16 (1H, m)	126,1	129,5	6,71–6,69 (m, 1H)
20	7,18 (1H, m)	127,8	127,8	7,19–7,15 (m, 1H)

21	6,71 (1H, 6,7, 1,8)	129,5	39,5, 126,1, 129,5	7,19–7,15 (m,1H)
----	---------------------	-------	--------------------	------------------

^a Experimento realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em CD3OD, utilizando TMS como padrão interno. ^bOuchaou et al., 2015.

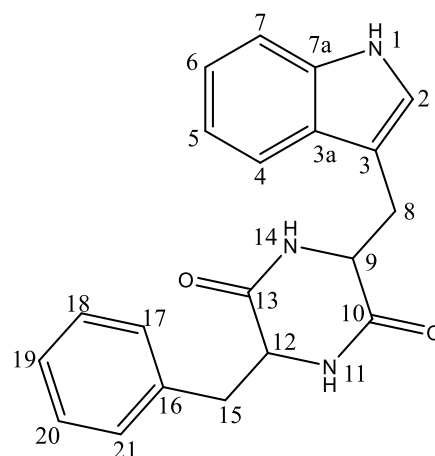


Figura 44. Estrutura da isorugosuvina devidamente numerada.

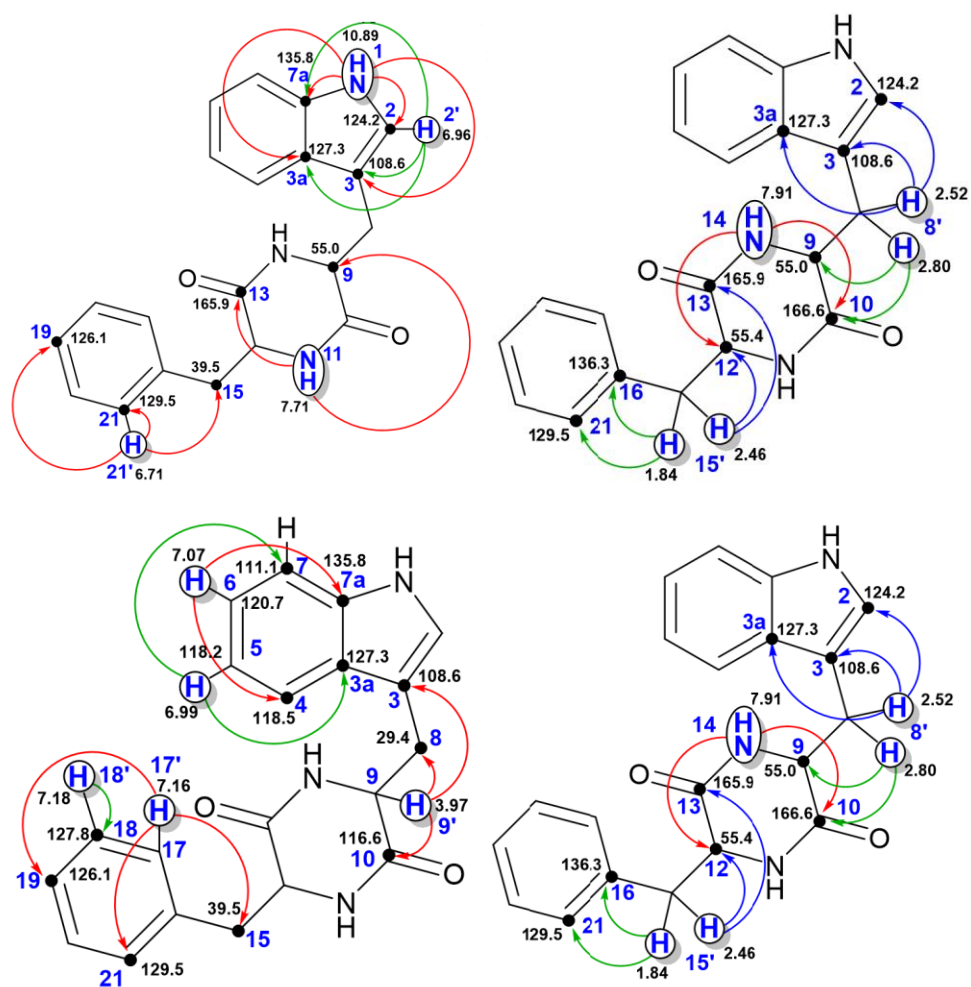


Figura 45. Estrutura da isorugosuvina e suas correlações.

A isorugulosuvina é um alcaloide dicetopiperazínico. Como grupo, os alcalóides dicetopiperazínicos são produzidos por uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, esponjas, estrelas do mar, tunicados (ascídios), algas vermelhas e até mamíferos (Huang et al. 2010). No entanto, como 90% das bactérias gram-negativas sintetizam essas moléculas, é com esse grupo que a maioria das pesquisas tem sido conduzida (de Carvalho & Abraham 2012). Em contraste, a isorugulosuvina é um isômero da rugulosuvina, um alcalóide indólico (que contém o núcleo indol) bioativo sintetizado apenas por membros da família de fungos ascomicetos Trichocomaceae (Kozlovsky, A. G. et al. 2014).

Embora originalmente considerada sintetizada apenas por fungos *Penicillium* (Dorner et al. 1980), a isorugulosuvina é agora conhecida por ser sintetizada por outros membros da família, incluindo *Emericella dentata* e *E. varicolor*, espécies marinhas com variedades que são simbióticas com esponjas (Bringmann e outros 2003; Hamed et al. 2021). No entanto, a capacidade de sintetizar isorugulosuvina parece amplamente distribuída no gênero *Penicillium* (Kozlovskii et al. 2013a), com espécies conhecidas por sintetizá-la incluindo *P. piscarium* (Kozlovskii et al. 2000); *P. canescens* e *P. janczewskii* (Nicoletti et al. 2007). A distribuição desta capacidade não é, no entanto, onipresente, e por isso tem sido usada em estudos taxonômicos baseados em fitoquímica do gênero (Kozlovskii et al. 2009; Nicoletti et al. 2007; Zhelifonova et al. 2010). Apesar de originalmente o composto isorugulosuvina seja sintetizada exclusivamente por membros do gênero *Penicillium*, não há relatos de seu isolamento na espécie *P. citreosulfuratum*.

Em mamíferos, foi demonstrado que a rugulosuvina se liga ao receptor 5-HT₁, que se liga à serotonina. Também conhecida como 5-HT, a serotonina é um neurotransmissor, e esse receptor é expresso no cérebro, baço e rim neonatal de mamíferos. Em contraste, a rugulosuvina demonstrou ter pouca afinidade de ligação para os receptores α ₁ adrenérgicos e dopaminérgicos (Bartoccini et al. 2022). Enquanto isso, estudos in vitro mostraram que a isorugulosuvina inibe o crescimento dos fungos patogênicos do solo *Rhizoctonia solani* (Nicoletti et al. 2007) e também pode prevenir a formação de biofilme em esponjas marinhas que hospedam fungos produtores de isorugulosuvina (Hamed et al. 2021). Tal

atividade é uma característica comum dos metabólitos secundários dos membros desse gênero fúngico (Kozlovskiĭ et al. 2013b; Kumar et al. 2018; Rabha & Jha 2018) e tem uma ampla gama de potenciais aplicações médicas, além do bem estabelecido uso antimicrobiano da própria penicilina (Gupta & Rodriguez-Couto 2018; Mbaoji et al. 2021).

5.2.3. Caracterização da 10Z-isocitreoviridinol

A amostra codificada como Pc3H2 (4,1 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de massas no modo positivo (Figura 46) foi observado um pico base de m/z 418. Quando submetido à fragmentação, este íon apresentou perda inicial de 18 Da, seguida de 144 e 158 Da, gerando os fragmentos em m/z 401, 275 e 261, respectivamente.

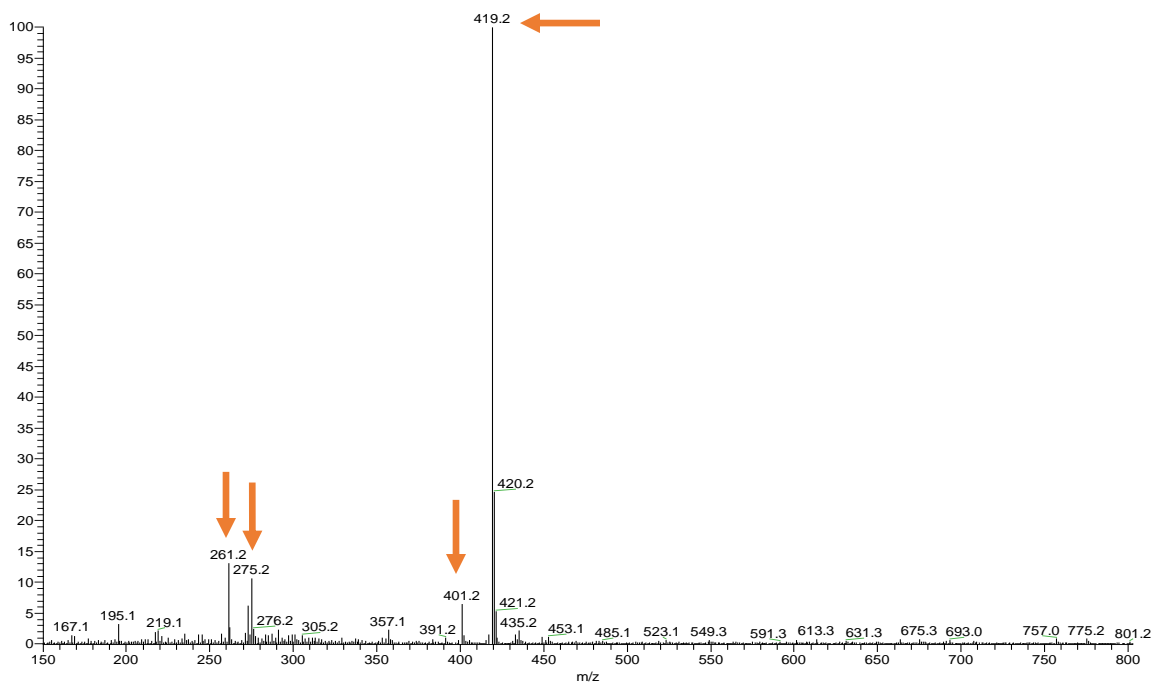


Figura 46. Espectro de massas da amostra Pc3H2 (modo positivo).

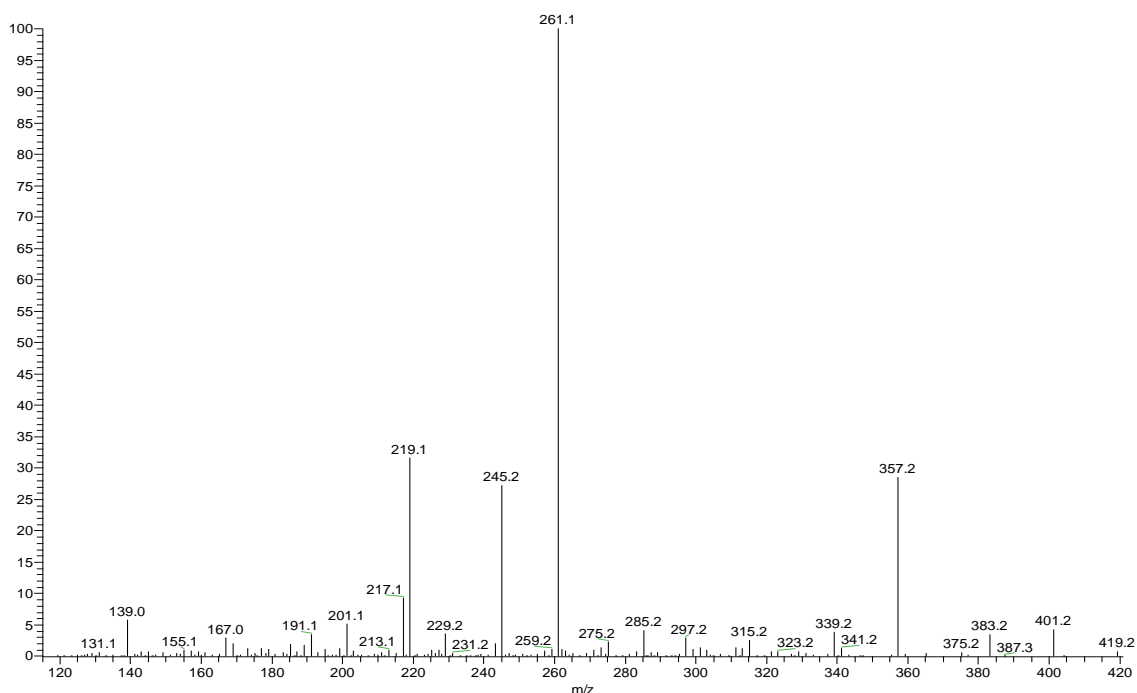


Figura 47. Espectro de massas da amostra Pc3H2 (modo negativo).

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 48 e 49) de Pc3H2 observou-se uma mistura complexa, com um composto majoritário. Relativo a este composto, na região de hidrogênios aromáticos/olefínicos, verificou-se a presença de 7 sinais em δ 7,14 (1H, dd, 14,9 e 11 Hz), 6,57 (1H, m), 6,55 (1H, m), 6,49 (1H, m), 6,42 (1H, ddd, 15,2, 10,8, 4,8), 5,99 (1H, d, 15,2) e 5,62 (1H, s). Além disso, foram observados sinais de metilas em 1,19 (3H, d, 6,5), 1,23 (3H, s), 1,27 (3H, s), 1,18 (3H, s) e 2,00 (3H, s), e de uma metoxila em δ 3,90 (3H, s).

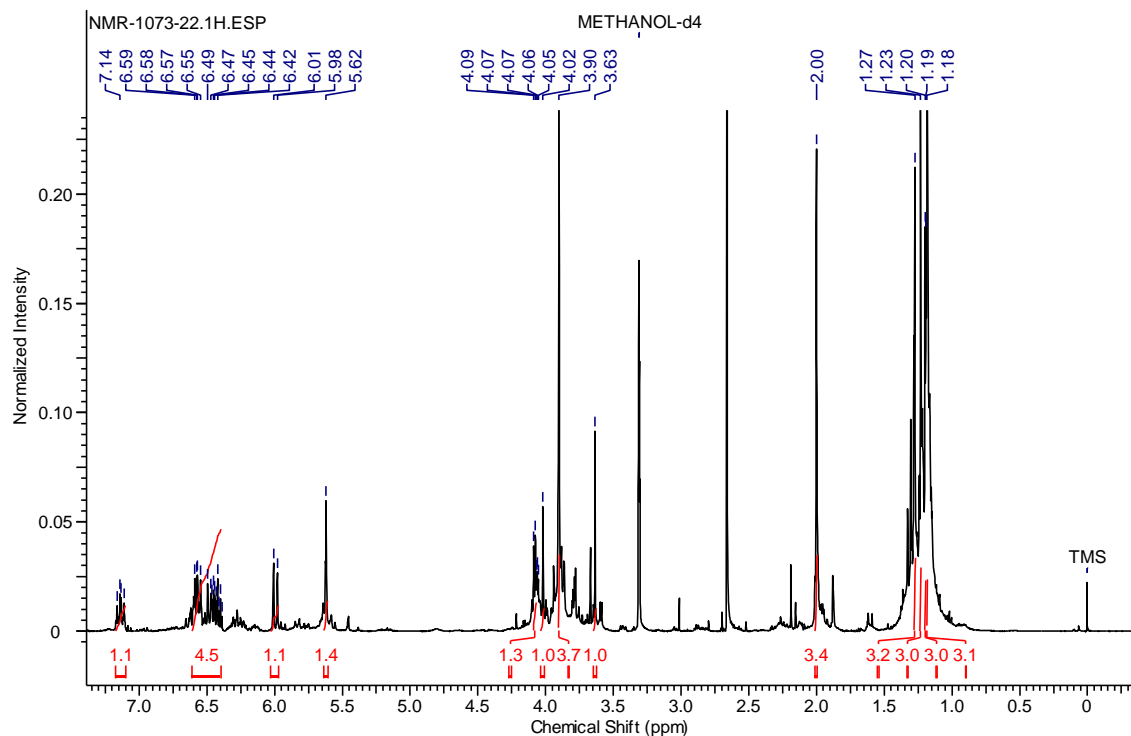


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc_3H_2 .

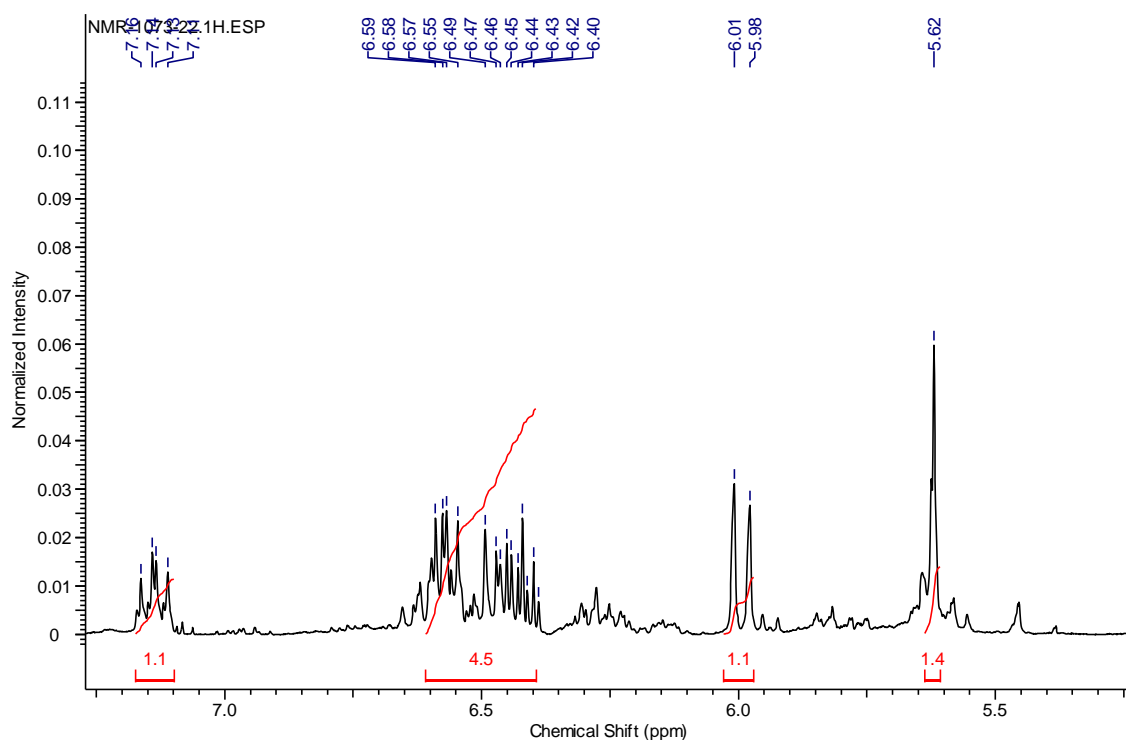


Figura 49. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra Pc_3H_2 na região de 5-7.5 ppm

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50) foram observados 23 sinais majoritários, dos quais 3 se mostraram característicos de anel α -pirona (δ 89,2,

166,4 e 173,2) e 8 de sistema octa-1,3,5,7-tetraeno (δ 109,8, 120,3, 129,4, 132,4, 137,1, 139,1, 143,5, 155,9), sugerindo a presença de um esqueleto policetídeo do tipo α -pirona (Auckloo et al., 2017). Através do mapa de correlação HSQC (Figuras 51 e 52) foi observada correlação do hidrogênio em δ 5,62 (1H, s) com o carbono em δ 89,2 do anel α -pirona. Ainda no mapa de correlação HSQC, foram observadas correlações para os hidrogênios em δ 6,55, 7,14, 6,49, 6,57, 6,42 e 5,99 com os carbonos do sistema octa-1,3,5,7-tetraeno em δ 120,3, 137,1, 132,4, 139,1, 129,4 e 143,5, respectivamente.

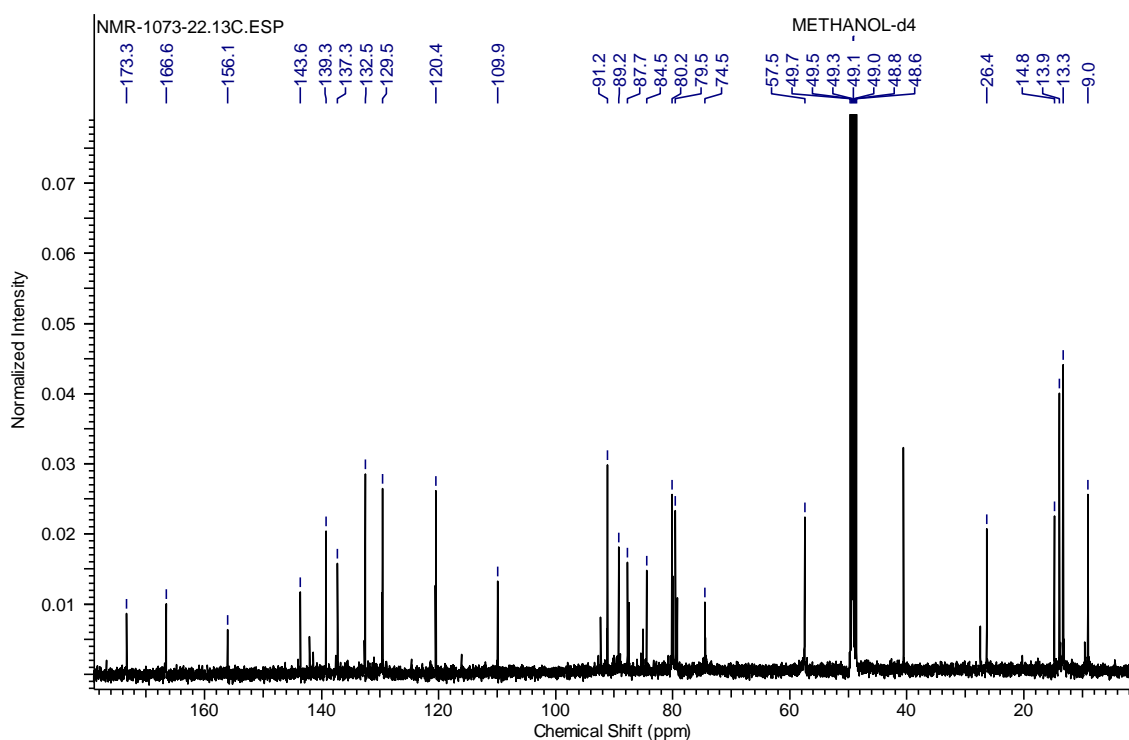


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amostra Pc3H2.

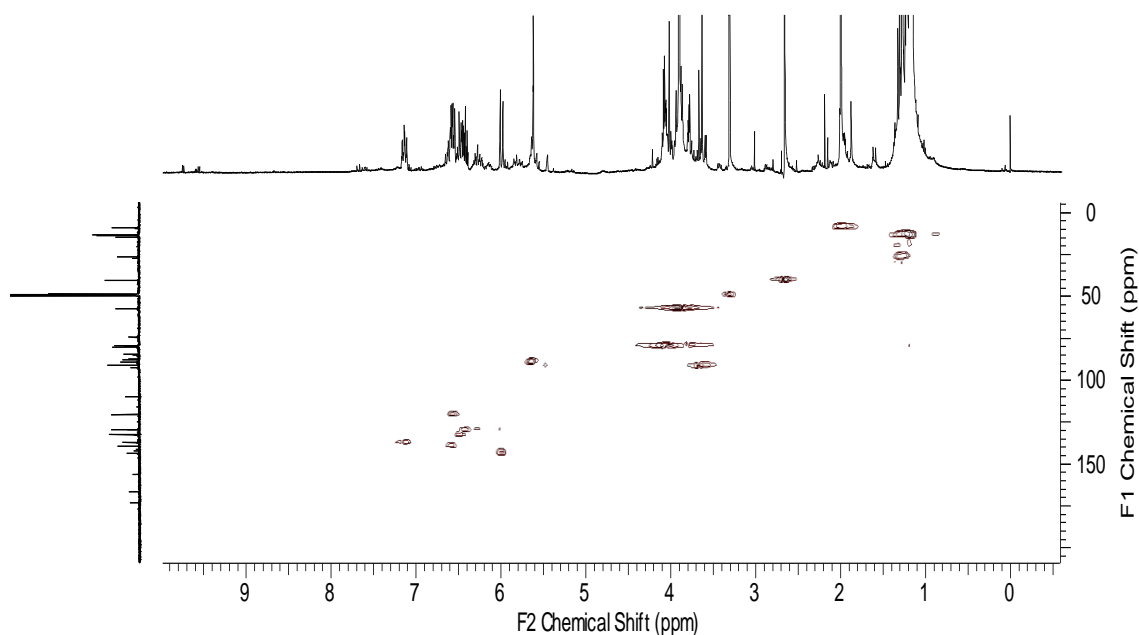


Figura 51. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3H₂

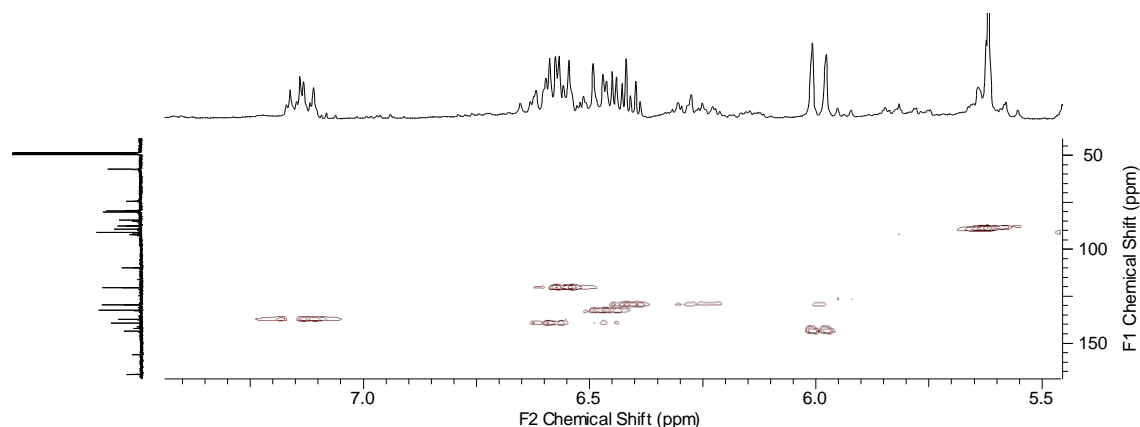


Figura 52. Ampliação do mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3H₂ na região de 5,5-8 ppm.

A confirmação da estrutura como um análogo de citreoviridina se deu a partir das correlações a longa distância entre os hidrogênios da metila em δ 2,00, característica deste tipo de esqueleto, com os carbonos em δ 173,2, 155,9 e 109,8 do anel α -pirona e ausência de outros sinais de metila no espectro (Auckloo et al., 2017). Ainda no mapa de contorno HMBC (Figuras 53 e 54) foi observada correlação a longa distância entre o hidrogênio em δ 5,99 do sistema octa-1,3,5,7-tetraeno e o carbonos em δ 74,3 e 87,5 de um suposto sistema glicosídico.

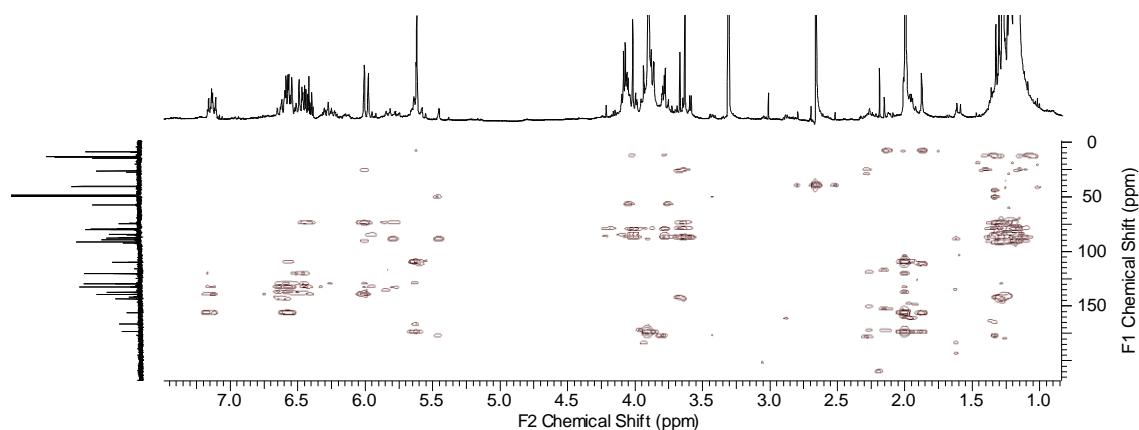


Figura 53. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3H₂.

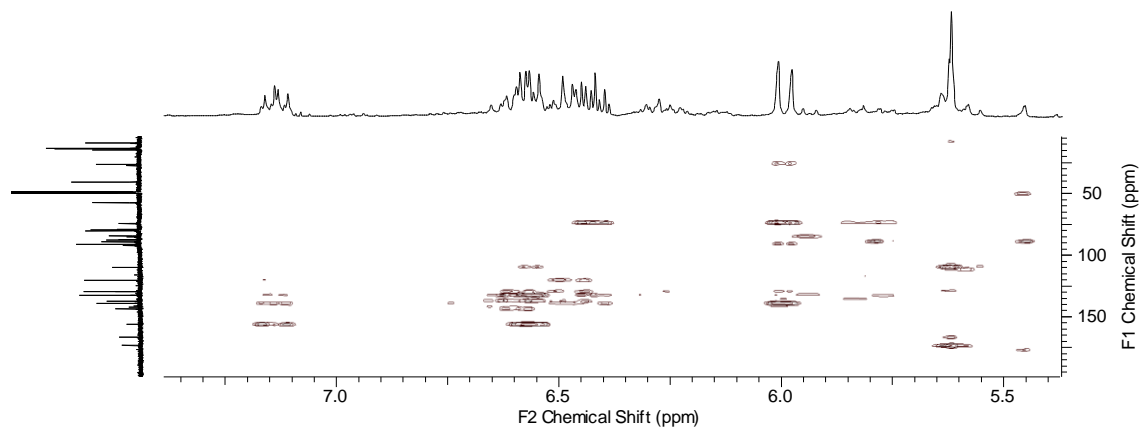


Figura 54. Ampliação do mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra Pc3H₂ na região de 5,5-8 ppm.

A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 7) com dados da literatura (Auckloo et al., 2017.), a amostra Pc3H₂ foi identificada como sendo o policetídeo 10Z-isocitreoviridinol (Figura 55). Assim como a substância supracitada isorugulosuvina, quanto aos ensaios biológicos, no que se refere a citotoxicidade, a fração de origem Pc3 (17 RI 3) apresentou alta toxicidade no ensaio de viabilidade celular (Item 4.10.2). Em relação ao teste antimicrobiano frente as cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e *Enterococcus faecalis* (E 002), Pc3 (17 RI 3) não apresentou atividade (Item 4.10.3).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra Pc3H2.

Posição	^1H (mult., J em Hz) ^a	^{13}C ^a	HMBC ^a	^1H (mult., J em Hz) ^b
1	1,19 (3H, d, 6,5)	13,2	80,1, 87,7	1,16 (3H, d, 6,43)
2	4,08 (1H, q, 6,5)	80,1	-	4,04 (1H, m)
3	-	84,3	-	-
4	4,02 (1H, s)	79,1	80,1, 84,3, 87,5, 84,3	3,98 (1H, s)
5	-	87,5	-	-
6	3,63 (1H, s)	91,0	79,1, 87,5, 74,3, 87,5	3,60 (1H, s)
7	-	74,3	-	-
8	5,99 (1H, d, 15,2)	143,5	91,0, 74,3, 129,4, 139,1, 87,5	6,10 (1H, m)
9	6,42 (1H, ddd, 15,2, 10,8, 4,8)	129,4	74,3, 143,5, 139,1, 132,4	6,41 (1H, m)
10	6,57 (1H, m)	139,1	143,5, 129,4, 132,4, 137,1	6,57 (1H, m)
11	6,49 (1H, m)	132,4	129,4, 139,1, 137,1, 120,3	6,49 (1H, m)
12	7,14 (1H, dd, 14,9 e 11,0)	137,1	139,1, 132,4, 120,3, 155,9	7,14 (1H, dd, 14,08 e 10,99)
13	6,55 (1H, m)	120,3	132,4, 137,1, 155,9, 109,8	6,55 (1H, m)
14	-	155,9	-	-
15	-	109,8	-	-
16	-	173,2	-	-
17	5,62 (1H, s)	89,2	109,8, 173,2, 166,4	5,62 (1H, s)
18	-	166,4	-	-
19	-	84,3	80,1, 84,3, 79,1	1,27 (3H, s)
20	4,02 (1H, s)	79,1	79,1, 87,5, 91,0	1,29 (3H, s)
21	-	87,5	91,0, 74,3, 143,5	1,26 (3H, s)
22	3,63 (1H, s)	91,0	155,9, 109,8, 173,2	2,00 (3H, s)
23	-	74,3	173,2	3,90 (3H, s)

^a Experimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD3OD, utilizando TMS como padrão interno. ^bAuckloo et al., 2017.

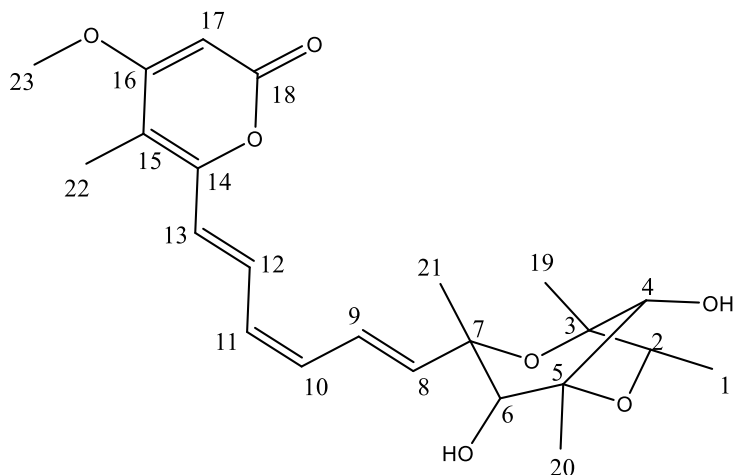


Figura 55. Estrutura do 10Z-isocitreoviridinol devidamente numerada.

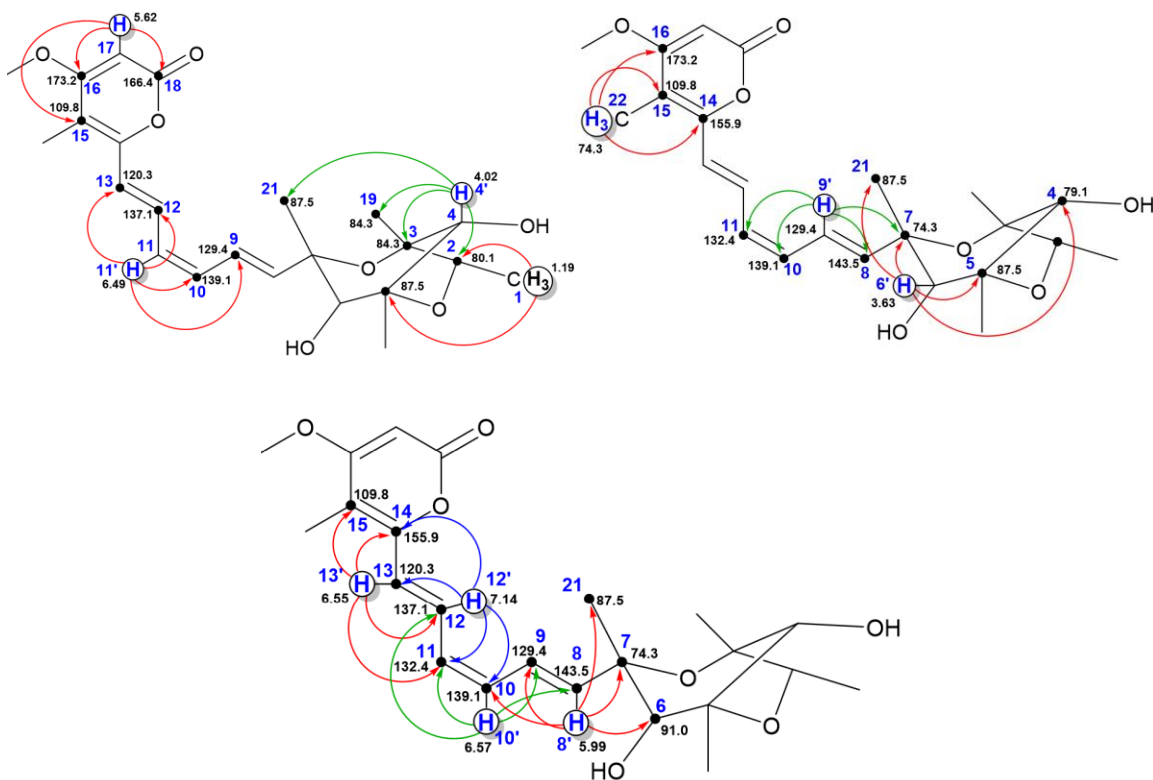


Figura 56. Estrutura do 10Z-isocitreoviridinol e suas correlações.

Citreoviridinol é um derivado da micotoxina citreoviridina, um polieno amarelo fluorescente e neurotóxico produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Datta & Ghosh 1981; Magan & Olsen 2004), e que interfere no metabolismo do ATP em mamíferos (Wu et al. 2013). A presença de citreoviridina tem sido utilizada na taxonomia química de *Penicillium* (Peterson et al. 2015).

Embora possa infectar alimentos armazenados e suas plantações pés-mãe (Rosa et al. 2010; Wicklow et al. 1988, respectivamente) e causar beribéri (Uraguchi 1969), a substância também demonstrou possuir atividade farmacológica contra tumores no pulmão humano (Wu 2013). A estrutura da citreoviridina foi publicada pela primeira vez por Sakabe et al. (1964). A produção, purificação e caracterização espectrográfica foi relatada por Rocha (2013). A citreoviridina tem vários isômeros, incluindo a isocitreoviridina (Nagel et al. 1972).

Citreoviridinol é um composto heteropolicíclico aromático de 3 anéis, pertencente à classe de compostos orgânicos conhecidos como 1,4-dioxepanos. Estes são dioxepanos com os dois átomos de oxigênio do anel na posição 1 e 4, respectivamente. A fórmula molecular é $C_{23}H_{30}O_7$, com uma massa molecular de 418.5. O nome IUPAC é: 4-metoxi-5-metil-6-[(1Z,3E,5Z)-6-{4,7,8-trihidroxi-1,3,5-trimetil-2,6-dioxabicyclo[3.2.1]octan-3-il}hexa-1,3,5-trien-1-il]-2H-piran-2-ona.

Segundo Yannai (2004), citreoviridinol tem as seguintes propriedades: solubilidade em água 0.12 g/L; refratividade $113.08 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$; superfície polar 114.68 \AA^2 . Seus constituintes espectrais estão disponíveis em <https://contaminantdb.ca/contaminants/CHEM029278>.

Citreoviridinol foi identificado pela primeira vez por Niwa et al. (1981). Tanto a citreoviridina quanto o citreoviridinol são derivados do precursor citreomontanina (Patel & Pattenden 1991). Assim como a citreoviridina, o citreoviridinol é um policetídeo que contém uma porção α -pirona ligada a um oxaciclo oxidativamente funcionalizado por um ligante de polieno (Bin Go & Tang 2020). Síntese do 2,6-dioxabicyclo [3.2. 1] unidade de octanagem do citreoviridinol foi relatada por Bowden & Pattenden (1985). Nishiyama et al. (1985a) forneceram estudos estruturais e conformacionais de citreoviridinol, e Nishiyama et al. (1986) relataram a síntese da substância.

Citreoviridinol foi usado por Houbraken et al. (2011) na taxonomia química de *Penicillium* (seção Citrina). Vários derivados químicos e compostos estruturalmente semelhantes foram relatados (Nishiyama et al. 1985b; Forbes et al. 1991). Vias biossintéticas potenciais foram investigadas por Ebenezer & Pattenden (1992).

Citreoviridinol e outros compostos do tipo citreoviridina contendo uma fração 2,8-dioxabicyclo [3.2.1] octano, podem ser usados em quimioterapia de

câncer de mama (Mar'yasov, et al. 2021). A produção in vitro de tais substâncias podem ser induzida pelo estresse de colônias de *Penicillium* apropriadas (ul Hassan et al. 2019), que podem desencadear a ativação de grupos de genes específicos responsáveis pela síntese de substâncias que, de outra forma, permaneceriam não expressas (Aukloo et al. 2017).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos endofíticos, em particular a linhagem M167 de *Penicillium citreosulfuratum* (LabMicrA 1245) investigada neste estudo, são uma fonte valiosa de metabólitos secundários tais como policetídeos e alcaloides com atividades biológicas diversas.

Os resultados obtidos evidenciam o potencial promissor dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium*, presentes na região amazônica, como uma fonte de produtos naturais com aplicações biotecnológicas.

As análises por RMN e MS se mostraram essenciais para elucidar e caracterizar a citreoviridina, um policetídeo, na fração Pc3, bem como guiar o isolamento e caracterizar o alcaloide isorugulosuvina e o policetídeo 10Z-isocitreoviridinol através do fracionamento cromatográfico.

Quanto aos testes biológicos, a amostra matriz (Pc3) não demonstrou atividade larvicida, e no teste citotóxico, exibiu uma alta porcentagem de toxicidade. O teste microbiano revelou que as amostras M (fração de Pc3) e Pc4 exibiram atividade contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, enquanto as amostras D, E e G (frações de Pc3) demonstraram atividade somente contra *E. faecalis*. Isso ressalta a importância da pesquisa de novos produtos naturais como agentes antimicrobianos e promissoras alternativas para combater essas bactérias que apresentam resistência aos antibióticos convencionais.

Apesar das contribuições deste estudo, é necessário realizar pesquisas adicionais para explorar melhor o potencial da linhagem estudada e da diversidade dos fungos endofíticos na região amazônica e aproveitar seu potencial de forma mais efetiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHTI, T.; OKSANEN, J. Epigeic lichen communities of taiga and tundra regions. *Vegetatio*, v. 86, n. 1, pp. 39-70, 1990.

ALBUQUERQUE, D. C.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; ALBUQUERQUE, F. N.; ESPORCATTE, R. Estatinas nas Síndromes Coronarianas Agudas: há evidências suficientes para a sua utilização. *Revista da SOCERJ*, v. 2, n. 1, p. 88-96, 2004.

ALENCAR, Y. B., RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M., LICHTWARDT, R. W.; HAMADA, N. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive tract of arthropods in Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 6, pp. 799-810, 2003.

ALFREDO, D.S.; LEITE, A.G.; BRAGA-NETO, R.; CORTEZ, V.G.; BASEIA, I.G. *Scleroderma minutisporum*, a new earthball from the Amazon rainforest. *Revista Mycosphere*, v. 3, n. 3, pp.294–299, 2012.

ALMEIDA, M.I.; ALMEIDA, N.G.; CARVALHO, K.L.; GONCALVES, G.A.; SILVA C.N.; SANTOS, E.A.; GARCIA, J.C.; VARGAS E.A. Co-occurrence of aflatoxins B(1), B(2), G(1) and G(2), ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants*, v. 29, n. 1, pp. 694–703, 2012.

ANDRADE, M. D. Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2016.

ARAÚJO, V. P. B.; ARAÚJO, T. K. D.; SOUSA, K. M. N. D.; ALBUQUERQUE, W. W.; NASCIMENTO, A. K. C. D.; CARDOSO, K. B. B. & COSTA, R. M. P. B. A novel β -fructofuranosidase produced by *Penicillium citreonigrum* URM 4459: purification and biochemical features. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022. DOI: 10.1080/10826068.2022.2158472

AUCKLOO, B. N.; PAN, C.; AKHTER, N.; WU, B.; WU, X. & HE, S. Descoberta impulsionada pelo estresse de novos antibióticos enigmáticos de um fungo marinho *Penicillium* sp. BB1122. *Fronteiras em Microbiologia*, v. 8, p. 1450, 2017.

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIC, M.K.; BAJPAI, R.; Stah, U. Relevância das fermentações de cocultura microbiana em biotecnologia. *Jornal de microbiologia aplicada*, v. 109, n. 2, pp. 371-387, 2010.

BANHOS, E. F. D.; SOUZA, A. Q. L. D.; ANDRADE, J. C. D.; SOUZA, A. D. L. D.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 1, pp. 153-162, 2014.

BARBOSA, A. C. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para análise de micotoxinas em cerveja utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS. Programa de Pós-graduação em Química – UFMG, 2019.

BARBOSA, R. N.; BEZERRA, J. D.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; OLIVEIRA, N. T.; HOUBRAKEN, J. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 10, pp. 1883-1912, 2018.

BARREIRO, E. & BOLZANI V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n.1, pp. 679-688, 2009.

BARTOCCINI F.; REGNI A.; RETINI M. & PIERSANTI G. Asymmetric total synthesis of all rugulovasine stereoisomers and preliminary evaluation of their biological properties. *European Journal of Organic Chemistry*. (17): 1099-0690 doi:10.1002/ejoc.202200315, 2022.

BELMONT-MONTEFUSCO, E. L.; de OLIVEIRA, J. B.; MAR, H. B.; SANTA-ROSA, P. S.; HAMADA, N.; NUNES-SILVA, C. G. Isolation and enzymatic potential of fungi associated with the gut of *Stenochironomus* Kieffer larvae (Insecta: Diptera: Chironomidae). *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 5, pp. 28644-28651, 2020.

BEZERRA, J. D. P.; DA SILVA, L. F.; DE SOUZA-MOTTA, C. M. The explosion of Brazilian endophytic fungal diversity: taxonomy and biotechnological potentials. In *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology* (Satyanarayana T, Deshmukh SK & Deshpande MV, eds). Springer, Singapore, v.1, n. 1, pp. 405-433, 2019.

BIN GO E & TANG Y (2020) Fungal Highly-Reducing Polyketide Synthases and Associated Natural Products IN *Comprehensive Natural Products III*, Hung-Wen Liu & Tadhg P. Begley, (Eds). Elsevier, Pp 333-364.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species. *American journal of botany*, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BODE, S. E.; DROCHNER, D. & MÜLLER, M. Synthesis, biosynthesis, and absolute configuration of vioxanthin. *Angewandte Chemie*, 119(31), 6020-6024, 2007.

BOWDEN, M. C. & PATTENDEN, G. (1985). Natural polyene pyrones. Synthesis of the 2, 6-dioxabicyclo [3.2. 1] octane unit of citreoviridinol. *Tetrahedron Letters*, 26: 4797-4800.

BRACKEN, A. & RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: 75. Dehydrocarolic acid, a metabolic product of *Penicillium cinerascens* Biourge. *Biochemical Journal*, 41(4), 569, 1947.

BRINGMANN, G.; LANG, G.; STEFFENS, S.; GÜNTHER, E.; SCHAUMANN, K. Evariquinone, isoemicellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus

Emericella varicolor. *Phytochemistry*. 63 (4): 437–443. doi:10.1016/s0031-9422(03)00189-4, 2003.

BRITO, A. K. P. D. Caracterização parcial de proteases produzidas por espécies de *Penicillium*. TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, v. 320, nn. 1-2, 37-77, 2009.

BURGSTALLER, W., STRASSER, H., WOEBKING, H., & SCHINNER, F. Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and stoichiometry. *Environmental science & technology*, v. 26, n. 2, p. 340-346, 1992.

CARVAJAL-MORENO, M. Mycotoxins that affect the human cardiovascular system. *J Biomolecular Research & Therapeutics*, 4(124), 2, 2015.

CASTILHO, L.C; POLATO, C.M.S; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, G.L; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CAVALCANTE, F. S.; CAMPOS, M. C. C.; DE LIMA, J. P. S. Studies of fungi in the state of Amazonas, Brazil in the last 10 years. *Ciência e Natura*, v. 42, p. 38, 2020.

COLE, R. J.; DORNER, J. W.; COX, R. H.; HILL, R. A.; CLUTER, H. G. & WELLS, J. M. Isolation of citreoviridin from *Penicillium charlesii* cultures and molded pecan fragments. *Applied and environmental microbiology*, v. 42, n. 4, p. 677-681, 1981.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: Fundamentos de cromatografia. 2006.

COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI, M. A. DE Q.; YANO-MELO, Adriana Mayumi. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. *Acta Botânica Brasílica*, v. 24, n. 1, p. 292-298, 2010.

COUTINHO, F. P.; MAIA, L. C. [ARTIGO RETRATADO] Comunidades de fungos filamentosos em áreas costeiras de Mata Atlântica no Nordeste brasileiro. *Hoehnea*, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 394-405, Sept. 2018.

CRITTENDEN, P. D. Ecological significance of necromass production in mat-forming lichens. *The Lichenologist*, v. 23, n. 3, p. 323-331, 1991.

CRUZ, R.; SANTOS, C.; SILVA DE LIMA, J.; APARECIDA MOREIRA, K.; de SOUZA-MOTTA, M.C. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas

of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. *Nova Hedwigia*, v. 97, nn. 3-4, 543-556, 2013.

DA COSTA, G. L.; DE MORAES, A. M. L.; DE OLIVEIRA, P. C. Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, v. 38, n. 5-6, p. 337-341, 1998.

DA ROCHA, M. W. Produção, purificação e caracterização espectrométrica da micotoxina citreoviridina produzida pelo *Penicillium citreonigrum* em meio de cultura yes (yeast extract sucrose). 2013.

DA ROCHA, M. W.; RESCK, I. S. & CALDAS, E. D. Purification and full characterisation of citreoviridin produced by *Penicillium citreonigrum* in yeast extract sucrose (YES) medium. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 584-595, 2015.

DA SILVA, I. J. S.; SOUSA, T. F.; DE QUEIROZ, C. A.; DOS SANTOS CASTRO, G.; CANIATO, F. F.; DE MEDEIROS, L. S. & DA SILVA, G. F. *Penicillium amapaense* sp. nov. *Exilicaulis* section and new records of *Penicillium labradorum* in Brazil isolated from Amazon River sediments with potential applications in agriculture and biotechnology, 2021. *Mycological Progress* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1184944/v1>

DATTA S. C. & GHOSH J. J. Effect of citreoviridin, a mycotoxin from *Penicillium citreoviride*, on kinetic constants of acetylcholinesterase and ATPase in synaptosomes and microsomes from rat brain. *Toxicol.* 19 (4): 555–62. doi:10.1016/0041-0101(81)90014-3. PMID 6460346, 1981.

DATTA, S. C. & GHOSH, J. J. Production and purification of *Penicillium citreoviride* toxin and its effect on TPP-dependent liver transketolase. *Folia Microbiologica*, 26, 408-412, 1981.

DE ANDRADE NOBRE, T. *Estudo químico do fungo Penicillium chrysogenum, um microorganismo endofítico da Amazônia com potencial anticancerígeno*. UFAM, relatório de PIBIC, 2013.

DE CARVALHO, M. P. & ABRAHAM, W-R. Antimicrobial and biofilm inhibiting Diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry* 19 (21): 3564–3577. doi:10.2174/092986712801323243, 2012.

DE FLOMBAUM, M. A. C., & STOPPANI, A. O. Influence of efrapeptin, aurovertin and citreoviridin on the mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3(3), 143-155, 1981.

DE LIMA SOUZA, H. M.; BARRETO, L. R.; DA MOTA, A. J.; DE OLIVEIRA, L. A.; DOS SANTOS BARROSO, H. & ZANOTTO, S. P. Tolerance to Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons (PAHs) by filamentous fungi isolated from contaminated sediment in the Amazon region. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 39, n. 4, p. 481-488, 2017.

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

DORNER J. W.; COLE R. J.; HILL R.; WICKLOW D. & COX R. H. *Penicillium rubrum* and *Penicillium biforme*, new sources of rugulovasines A and B. *Applied & Environmental Microbiology* 40 (3): 685–7. doi:10.1128/aem.40.3.685-687,1981.

DOS REIS CELESTINO, J.; DE CARVALHO, L. E.; DA PAZ LIMA, M.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M. & DE SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

DOS SANTOS OLIVEIRA, G. F.; GONZAGA, A. D.; NOGUEIRA, E.; ASSUNÇÃO, A. Q. L. D. S.; AZEVEDO, J. L. Ação patogênica de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *Penicillium* sp. contra *Nasutitermes corniger* Motschulsky (Isoptera: Termitidae) no Amazonas. *Scientia Amazonia*, v.7, n. 3, pp. B7-B11, 2018.

DOS SANTOS, R. M. G. DOS. Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium* moniliforme isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). Repositório da Universidade Federal de São Carlos, 2003.

DUARTE, S.; BÄRLOCHER, F.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Biogeography of aquatic hyphomycetes: current knowledge and future perspectives. *Fungal Ecology*, v. 19, p. 169-181, 2016.

EBEL, R.; RUSMAN, Y.; BRAUERS, G.; PROKSCH, P.; FRANK, W. & WRAY, V. Novel oxygenated meroterpenoids and drimane sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Penicillium citreonigrum*. *Planta Medica*, 72(11), S_027, 2006. DOI: 10.1055/s-2006-949760

EBENEZER, W., & PATTENDEN, G. (1992). Vicinal polyepoxides in biomimetic synthesis. Total synthesis of (±)-citroviral and related substituted tetrahydrofurans. *Tetrahedron Letters*, 33: 4053-4056.

FARR, M. L. Amazonian Follicolous Fungi III. A preliminary list of Ascomycotina, mostly Dothideales, sensu lato. *Acta Amazonica*, v. 15, p. 29-34, 1985.

FLECK, C.; LEITE, C. E.; PETERSEN G.; NETO, S. G.; SAITOVITCH, D.; ARAÚJO B. V.; BENDER A. L.; AMADO, M. E.; THIESEN, F.V. Monitoramento Terapêutico de Ácido Micofenólico em Pacientes Transplantados Renais. Salão de Iniciação Científica (21.: 2009 out. 19-23: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

FONSECA, Q. R., SARQUIS, M. I. D. M., HAMADA, N. & ALENCAR, Y. B. Ocorrência de fungos filamentosos associados a larvas de *Simulium goeldii* Cerqueira &

Nunes de Mello da Amazônia Central, Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, pp. 282-285, 2008.

FORBES, J. E., BOWDEN, M. C. & PATTENDEN, G. (1991). Epoxides in synthesis. Synthesis of the novel 2, 6-dioxabicyclo [3.2. 1] octane units in the citreoviridinols and the aurovertins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 1967-1973.

FRAGA, M. E.; PEREIRA M. G., BARBOSA D. J.; MELO M. P. Diversity of isolated Trichocomaceae from soil in two forest ecosystems. *Ciencia Florestal*, v. 20, n. 1, p. 167-175, 2010.

FREIRE, F. das C. O.; VASCONCELOS, F. R.; DE LIMA COUTINHO, I. B. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. *Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA*, v. 16, n. 1, 2014.

FRISVAD, J. C. & FILTENBORG, O. Revision of *Penicillium* subgenus *Furcatum* based on secondary metabolites and conventional characters. IN *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA & Pitt JI, eds.). Boston, MA: Springer US, pp. 159-172, 1990

FRISVAD, J. C. The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 452-467, 1989.

FRISVAD, J. C.; Yilmaz N.; THRANE U.; RASMUSSEN K. B.; HOUBRAKEN J. *Talaromyces atrovirens*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e84102, 2013.

GAUSE, E. M., BUCK, M. A., & DOUGLAS, M. G. Binding of citreoviridin to the beta subunit of the yeast F1-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(2), 557-559, 1981.

GERMAIN J.; RAVETON M.; BINET M. N.; MOUHAMADOU B. Screening and metabolic potential of fungal strains isolated from contaminated soil and sediment in the polychlorinated biphenyl degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, p. 111703, 2021.

GOMES-SILVA, A. C.; RYVARDEN, L.; GIBERTONI, T. B. *Inonotus amazonicus* sp. nov., *I. calcitratus* comb. nov. and notes on *Phylloporia* (Hymenochaetaceae, Agaricomycetes) from the Brazilian Amazonia. *mycoscience*, v. 54, n. 2, p. 116-121, 2013.

GOMEZ, D. N. F. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. Tese de doutorado, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2007.

GONÇALVES, B. S.; GOULART, N. S. S. Principais aspectos da pseudomonas aeruginosa: revisão bibliográfica. 2021.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUPTA, V. G. & RODRIGUEZ-COUTO, S. (Eds.). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications*. Elsevier, 2018.

HALL, L. A.; DENNING, D. W. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *Journal of medical microbiology*, v. 41, n. 5, p. 311-315, 1994.

HAMED, A.; ABDEL-RAZEK, A. S.; ARABY, M.; ABU-ELGHAIT, M.; EL-HOSARI D. G.; FRESE, M. & SHAABAN, M. Meleagrin from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies. *Natural Product Research*, 35(21), 3830-3838, 2021.

HANEN, Z.; SEVASTIANOS, R.; MOHAMED, A. H. & ALI, R. Biodiversity and biotechnological potential of filamentous fungi isolated from Tunisian olive mill biotope. *International Journal of Biosciences* 14(5): 1-15, 2019.

HARRIS D. M.; WESTERLAKEN I.; VAN DER KROG Z.A.; GOMBERT A.K. SUTHERLAND J. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. *Metabolic engineering*, v. 11, n. 2, p. 125-137, 2009.

HIRTE, W. F. & GLATHE, I. Biotechnical preparation of cellulases, hemicellulases and beta-glucosidases. [*Penicillium citreoviride*]. U.S. Department of Energy, Office of Scientific and Technical Information. Patent application, Report Number:DD 145028, Reference Number:EDB-84-066934, 1980.

HODSON, P. H. & FOSTER, J. W. Dipicolinic acid synthesis in *Penicillium citreoviride*. *Journal of Bacteriology*, 91(2), 562-569, 1966.

HOUBRAKEN J, FRISVAD JC & SAMSON RA. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Studies in Mycology* 70: 53-138. DOI: 10.3114/sim.2011.70.02, 2011.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SEIFERT, K. A.; OVERY, P. D.; TUTHILL, D. M.; VALDEZ, J. G.; SAMSON R. A. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 29, p. 78, 2012.

HOUBRAKEN, J.; LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; FRISVAD, J. C.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FRANCO-MOLANO, A. E.; SAMSON, R. A. *Penicillium araracuarensis* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarojense* sp. nov., *Penicillium*

vanderhammenii sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 61, n. 6, p. 1462-1475, 2011.

HU, C. W., HSU, C. L., WANG, Y. C., ISHIHAMA, Y., KU, W. C., HUANG, H. C., & JUAN, H. F. Temporal Phosphoproteome Dynamics Induced by an ATP Synthase Inhibitor Citreoviridin*[S]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(12), 3284-3298, 2015.

HUANG, J. N.; ZOU, Q.; CHEN, J.; XU, S. H.; LUO, D.; ZHANG, F. G. & LU, Y. Y. Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, *Penicillium citreonigrum* SP-6. *Phytochemistry Letters*, 27, 114-118, 2018.

HUANG, R.; ZHOU, X.; XU, T.; YANG, X. & LIU, Y. Diketopiperazines from marine organisms. *Chemistry & Biodiversity*, 7(12), 2809-2829, 2010.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; XING, J.; CORKE, H.; Sun, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic botany*, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.

IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA, I. S., & TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 7, 138-161, 2010.

JIN, L.; NIU, G.; GUAN, L.; RAMELOW, J.; ZHAN, Z.; ZHOU, X. & LI, J. Discovery of mosquitocides from fungal extracts through a high-throughput cytotoxicity-screening approach. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1-10, 2021.

KALLE, G. P. & KHANDEKAR, P. S. Dipicolinic acid as a secondary metabolite in *Penicillium citreoviride*. *Journal of Biosciences*, 5, 43-52, 1983.

KILLHAM, Ken. *Soil ecology*. Cambridge University Press, 1994.

KIM, J. W.; KO, S. K.; SON, S.; SHIN, K. S.; RYOO, I. J.; HONG, Y. S. & AHN, J. S. Haenamindole, an unusual diketopiperazine derivative from a marine-derived *Penicillium* sp. KCB12F005. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(22), 5398-5401, 2015.

KIMURA, Y.; HAMASAKI, T. & NAKAJIMA, H. Stereochemistry and biological activities of LL-P880 γ , a pestalotin analogue, produced by *Penicillium citreo-viride*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(6), 1649-1650, 1986.

KIRK, P. M. Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Dictionary of the fungi*. 10th ed. CAB International, Wallingford, UK, 2008.

KOGEL, Karl-Heinz; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A. da; ALMEIDA, R. A. de; SOUZA, A. D. L. de; MEDEIROS, L. S. de; RODRIGUES FILHO, E., & SOUZA, A. Q. Lima de. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An

endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. *Química Nova*, v. 35, n. 4, p. 771-774, 2012.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; de SOUZA, A. Q. L.; de SOUZA, A. D. L. Chemical constituents of *Penicillium chrysogenum*, an endophytic fungus from *Strychnos toxifera*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 49, n. 6, p. 1164-1165, 2014.

KOSEMURA, S. & YAMAMURA, S. Citreoazopyrone, a novel metabolite of a hybrid Strain KO 0011 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 38(17), 3025-3026, 1997.

KOSEMURA, S. Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 hybrid. *Tetrahedron*, 59(27), 5055-5072, 2003.

KOSEMURA, S. Structure and absolute configuration of citreohybridones isolated from *Penicillium* species. *Tetrahedron Letters*, 43(7), 1253-1256, 2002.

KOSEMURA, S.; MATSUNAGA, K.; YAMAMURA, S.; KUBOTA, M. & OHBA, S. The structures of citreohybridone A and B novel sesterterpenoid-type metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 32(29), 3543-3546, 1991.

KOSEMURA, S.; MATSUO, S. & YAMAMURA, S. Citreohybridone C, a meroterpenoid of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Phytochemistry*, 43(6), 1231-1234, 1996.

KOSEMURA, S.; MIYATA, H.; MATSUNAGA, K. & YAMAMURA, S. Biosynthesis of citreohybridones, the metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 33(27), 3883-3886, 1992a.

KOSEMURA, S.; NAGAMATSU, H. & YAMAMURA, S. Citreobenzofurans A, B, and C, first isolation of sesquiterpene-type metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 65(3), 926-928, 1992b.

KOSEMURA, S.; UOTSU, S. & YAMAMURA, S. Citreoanthrasteroid, a new metabolite of a hybrid strain KO 0011 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 36(41), 7481-7482, 1995.

KOSEMURA, S.; UOTSU, S. & YAMAMURA, S. Citreospirosteroid, a new metabolite of a hybrid strain KO 0011 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 38(42), 7373-7374, 1997.

KOZLOVSKIĬ, A. G.; VINOKUROVA, N. G. & ADANIN, V. M. Diketopiperazine alkaloids from the fungus *Penicillium piscarium* Westling. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologija*, 36(3), 317-321, 2000.

KOZLOVSKIĀ, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P. & ANTIPOVA, T. V. Biologically active metabolites of *Penicillium* fungi. *Journal of Organic and Biomolecular Chemistry* 1, 11-21, 2013b.

KOZLOVSKIĀ, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P. & ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 1-10, 2013a.

KOZLOVSKIĀ, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P. & ANTIPOVA, T. V. Secondary metabolites in the taxonomy of fungi of the subgenus *Penicillium*. *Microbiology*, 78(5), 618-623, 2009.

KOZLOVSKY, A. G., ZHELIFONOVA, V. P., ANTIPOVA, T. V., BASKUNOV, B. P., IVANUSHKINA, N. E., & OZERSKAYA, S. M. Exo-metabolites of mycelial fungi isolated in production premises of cheese-making and meat-processing plants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(2), 300-306, 2014.

KUMAR, A.; ASTHANA, M.; GUPTA, A.; NIGAM, D. & MAHAJAN, S. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Penicillium*. IN Gupta, V. G., & Rodriguez-Couto, S. (Eds.). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications* (pp. 47-68). Elsevier, 2018.

LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K. & FURUKAWA, H. New curvularin-type metabolites from the hybrid strain ME 0005 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 64(3), 1048-1050, 1991.

LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K.; TERADA, Y. & FURUKAWA, H. New metabolites of two hybrid strains ME 0004 and 0005 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Chemistry Letters*, 19(4), 589-592, 1990.

LÂNGARO, Marina Canali. Ocorrência de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas persistentes: revisão de literatura. 2020.

LEHLE, L.; STRAHL, S.; TANNER, W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 45, n. 41, p. 6802-6818, 2006.

LEWINSOHN, T.; PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

LI, Y., JIN, G., LIU, L., XIAO, J., & KUANG, H. Fast determination of citreoviridin residues in rice using a monoclonal antibody-based immunochromatographic strip assay. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), 893-906, 2020.

LIMA, A. K. S. D.; RODRIGUES, J. R.; SOUZA, I. D. S. D.; RODRIGUES, J. C.; SOUZA, T. C. D.; MAIA, C. R.; FERNANDES, O. C. C. Fungos isolados da água de

consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: potencial patogênico. *Revista Ambiente & Água*, v. 12, n. 6, pp. 1017-1024, 2017.

LINNETT, P. E., MITCHELL, A. D., OSSELTON, M. D., MULHEIRN, L. J., & BEECHEY, R. B. Citreoviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochemical Journal*, 170(3), 503-510, 1978.

LIU, H. M.; LI, H.; SHAN, L. & WU, J. Synthesis of steroidal lactone by *Penicillium citreo-viride*. *Steroids*, 71(11-12), 931-934, 2006.

LUZ, C.; ROCHA, L. F.; NERY, G. V.; MAGALHÃES, B. P.; TIGANO, M. S. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 211-218, 2004.

MAGAN N & OLSEN M. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-733-4, MAGAN N & OLSEN M (2004). *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-733-4.

MAGGS, J. Litter fall and retranslocation of nutrients in a refertilized and prescribed burned *Pinus elliotii* plantation. *Forest ecology and management*, v. 12, n. 3-4, p. 253-268, 1985.

MAR'YASOV, M. A., DAVYDOVA, V. V., NASAKIN, O. E., & TAFEENKO, V. A. Antiproliferative activity of the cyclization products of 1-(2-Oxocyclohexyl) Ethane-1, 1, 2, 2-Tetracarbonitrile and α , β -Unsaturated Aldehydes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 55: 26-29, 2021.

MATSUNAGA, K.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K. & FURUKAWA, H. Isolation and structure of citreoindeole, a new metabolite of hybrid strain KO 0052 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 32(47), 6883-6884, 1991.

MBAOJI, F. N.; NWEZE, J. A.; YANG, L.; HUANG, Y.; HUANG, S.; ONWUKA, A. M. & YANG, D. Novel marine secondary metabolites worthy of development as anticancer agents: A review. *Molecules*, 26(19), 5769, 2021.

MCCOY, C. W.; SAMSON, R. A.; BOUCIAS, D. G. Entomogenous fungi. IN *Handbook of Natural Pesticides-Part A, vol III* (Mandava NB & Morgan ED, eds). CRC Press, v. 4, Part B, pp. 151-236, 2019.

NAGEL DW, STEYN OS & SCOTT DB. Production of citreoviridin by *Penicillium pulvillum*. *Phytochemistry* 11: 627-630, 1972.

NAKADA, T. & YAMAMURA, S. Three new metabolites of hybrid strain KO 0231, derived from *Penicillium citreo-viride* IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron*, 56(17), 2595-2602, 2000.

NAKADA, T.; SUDO, S.; KOSEMURA, S. & YAMAMURA, S. Two new metabolites of hybrid strains KO 0201 and 0211 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Letters*, 40(37), 6831-6834, 1999.

NASCIMENTO, A. K. C.; NOBRE, C.; CAVALCANTI, M. T. H.; TEIXEIRA, J. A. & PORTO, A. L. F. Síntese de frutooligossacarídeos a partir da β -frutofuranosidase obtida de *Penicillium citreonigrum* URM 4459. *COBEQ 2016 - XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química)*. Fortaleza, Brazil, Sep 25-29, ABEQ, 1-6, 2016a.

NASCIMENTO, A. K. C.; NOBRE, C.; CAVALCANTI, M. T. H.; TEIXEIRA, J. A. & PORTO, A. L. F. Screening of fungi from the genus *Penicillium* for production of β -fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 70-78, 2016b.

NICOLETTI, R.; BUOMMINO, E.; De FILIPPIS, A.; LOPEZ-GRESA, M.; MANZO, E.; CARELLA, A.; PETRAZZUOLO, M.; TUFANO, M. A. Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 2, p. 189-195, 2008.

NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M. P.; MANZO, E.; CARELLA, A. & CIAVATTA, M. L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163(5), 295-301, 2007.

NICOLETTI, R.; MANZO, E.; CIAVATTA, M. L. Occurrence and bioactivities of funicone-related compounds. *International journal of molecular sciences*, v. 10, n. 4, p. 1430-1444, 2009.

NISHIE, K., COLE, R. J., & DORNER, J. W. Toxicity of citreoviridin. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 59(1), 31-52, 1988.

NISHIYAMA, S., SHIZURI, Y., IMAI, D., YAMAMURA, S., TERADA, Y., NIWA, M. & FURUKAWA, H. Structural and conformational studies on citreoviridinol and isocitreoviridinol: syntheses of some 2, 6-dioxabicyclo [3.2. 1] octanes. *Tetrahedron Letters* 26: 3243-3246, 1985a.

NISHIYAMA, S., SHIZURI, Y., YAMAMURA, S., TERADA, Y., KAWAI, K., & FURUKAWA, H. Isolation and stereostructures of neocitreoviridinol and epineocitreoviridinol. *Tetrahedron letters*, 26: 6239-6242, 1985b.

NISHIYAMA, S., TOSHIMA, H., & YAMAMURA, S. Total syntheses of citreoviridinol and neocitreoviridinol. *Chemistry Letters*, 15: 1973-1976, 1986.

NIWA M, ENDO T, OGISO S, FURUKAWA H, YAMAMURA S. Two new pyrones, metabolites of *Penicillium citreo-viride* Biourge. *Chemical Letters* 10: 1285–1288, 1981.

NIWA, M.; ENDO, T.; OGISO, S.; FURUKAWA, H. & YAMAMURA, S. Two new pyrones, metabolites of *Penicillium citreo-viride* Biourge. *Chemistry Letters*, 10(9), 1285-1288, 1981.

NIWA, M.; OGISO, S.; ENDO, T.; FURUKAWA, H. & YAMAMURA, S. Isolation and structure of citreopyrone, a metabolite of *Penicillium citreo-viride* Biourge. *Tetrahedron Letters*, 21(46), 4481-4482, 1980.

NOBRE, C.; DO NASCIMENTO, A. K. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A., CAVALCANTI, M. T. H. & PORTO, A. L. F. Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by *Penicillium citreonigrum*. *Bioresource Technology*, 282, 464-474, 2019.

OHSE, K. C. Biotransformação da Quercetina e produção de metabólitos ativos por *Penicillium* sp. 392 (GhG2 2.1) isolado de *Gustavia elliptica* M.(Iecythydaceae). Tese de Dissertação – Universidade Federal do Amazonas, 2019.

OKANO, T.; KOBAYASHI, N.; IZAWA, K.; YOSHINARI, T. & SUGITA-KONISHI, Y. Whole genome analysis revealed the genes responsible for citreoviridin biosynthesis in *Penicillium citreonigrum*. *Toxins*, 12(2), 2020. DOI:10.3390/toxins12020125

OLIVEIRA, D. A. S. D.; FERNANDES, O. C.; JESUS, M. A.; BENTES, J. L. S.; ANDRADE, S. L.; SOUZA, A. Q. L.; SANTOS, C. Identificação e Conservação de culturas *Penicillium* de interesse Agrossilvicultural. *Diversidade Microbiana da Amazônia*, p. 179-184, 2016.

OSONO, T.; TAKEDA, H. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia*, v. 94, n. 3, p. 421-427, 2002.

PALLU, A. P. de S. Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2010.

PARK, M. S.; KIM, S. H.; LEE, J. W.; KIM, J. S.; CHO, Y.; LIM, Y. W. Two Unrecorded Species Belonging to *Penicillium* Section Exilicaulis in South Korea. *The Korean Journal of Mycology*, v. 48, n. 3, p. 175-185, 2020.

PARK, M. S.; OH, Y. S., FONG, J. J., HOUBRAKEN, J.; LIM, Y. W. The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

PATEL, P., & PATTENDEN, G. Total synthesis of citreomontanin, a putative polyene precursor to citreoviridin and citreoviridinol produced by *Penicillium* sp. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: 1941-1945*, 1991

PERAICA, M., RADIC, B., LUCIC, A., & PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Boletín de la Organización Mundial de la Salud: la revista internacional de salud pública: recopilación de artículos 2000; 2: 80-92, 2000.

PEREIRA, E. D. S.; FERREIRA, R. L.; HAMADA, N.; LICHTWARDT, R. W. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in natural and artificial habitats in Manaus, AM Brazil. Neotropical Entomology, v. 34, n. 2, p. 325-329, 2005.

PETERSON, S. W.; JURJEVIĆ, Ž.; FRISVAD, J. C. Expanding the species and chemical diversity of *Penicillium* section Cinnamopurpurea. PloS one, v. 10, n. 4, p. e0121987, 2015.

PETIT, P.; LUCAS, E.; ABREU, L.; PFENNING, L.; TAKAHASHI, J. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. Electronic Journal of Biotechnology, v. 12, n. 4, p. 8-9, 2009.

PETRZIK, K.; KOLONIUK, I.; SEHADOVÁ, H.; SARKISOVA, T. Chrysoviruses inhabited symbiotic fungi of lichens. Viruses, v. 11, n. 12, p. 1120, 2019.

PINHEIRO, E. A. A.; CARVALHO, J. M.; DOS SANTOS, D. C. P.; FEITOSA, A. D. O.; MARINHO, P. S. B.; GUILHON, G. M. S. P.; MARINHO, A. M. D. R. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. Natural product research, v. 27, n. 18, p. 1633-1638, 2013.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. Ciência Rural, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

PITT J. I.; SAMSON, R. A., & FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. IN *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, RA Samson & JL Pitt (eds.). CRC publications, pp. 9-49, 2000.

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Food Research Laboratory. NSW, Australia, 1991.

PITT, J. I. A. Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Australia: Food Science Australia, p. 187, 2000.

PITT, J. I. Chemotaxonomy of *Penicillium* and related teleomorphs. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, v. 32, n. 2Supplement, p. 31-38, 1991.

PITT, J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *EuPenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc. Ltd., London, p. 634, 1979.

PITT, J. I., & LEISTNER, L. Toxigenic *Penicillium* species. IN *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith JE & Henderson RS (eds). CRC Publications, pp. 81-99,1991.

POLLOCK, A. V. Production of citrinin by five species of *Penicillium*. *Nature*, 160(4062), 331-332, 1947.

PRATT, L. M.; PHILLIPS, T. L.; DENNISON, J. M. Evidence of non-vascular land plants from the Early Silurian (Llandoveryan) of Virginia, USA. *Review of palaeobotany and palynology*, v. 25, n. 2, p. 121-149, 1978.

QUEVEDO, J. R.; BONONI, V. L.; OLIVEIRA, A. K. M.; GUGLIOTTA, A. M. Agaricomycetes (Basidiomycota) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 4, p. 430, 2012.

RABHA, J. & JHA, D. K. Metabolic diversity of *Penicillium*. IN Gupta, V. G., & Rodriguez-Couto, S. (Eds.). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications* (pp. 217-234). Elsevier, 2018.

RIBEIRO, B. A.; DA MATA, T. B.; CANUTO, G. A.; SILVA, E. O. Chemical Diversity of Secondary Metabolites Produced by Brazilian Endophytic Fungi. *Current Microbiology*, p. 1-22, 2020.

ROCHA, F. B.; HANADA, R. E.; DE ALBUQUERQUE, S. T.; BARRETO, R. W. *Pseudocercospora piperis* associated with leaf spots on *Piper aduncum* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, v. 8, n. 1, p. 101-103, 2013.

RODRÍGUEZ-ANDRADE, E.; STCHIGEL, A. M.; CANO-LIRA, J. F. New Xerophilic Species of *Penicillium* from Soil. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 2, p. 126, 2021.

ROSA, C. A. R.; KELLER, K. M.; OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, T. X.; KELLER, L. A. M. 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.

ROSA, C. A. R.; KELLER, K. M.; OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, T. X.; KELLER, L. A. M.; MARASSI, A. C. & OLIVEIRA, D. C. N. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 27(2), 241-248, 2010.

ROSOWSKY, A. Oxepin Ring Systems Containing Two Rings. *Chemistry of Heterocyclic Compounds: Seven-Membered Heterocyclic Compounds Containing Oxygen and Sulfur*, 26, 51-135, 1972.

SAKABE N., GOTO T & HIRATA Y. The structure of citreoviridin, a toxic compound produced by *Penicillium citreo-viride* molded on rice. *Tetrahedron* 27: 1825–1830, 1964.

SAKABE, N.; GOTO, T.; HIRATA, Y. Structure of citreoviridin, a mycotoxin produced by *Penicillium citreo-viride* molded on rice. *Tetrahedron*, v. 33, n. 23, p. 3077-3081, 1977.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* v. 49, pp. 1-260, 2004.

SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; KUIJPERS, A. F.; HOUBRAKEN, J. A.; FRISVAD, J. C. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Stud Mycol*, v. 49, n. 1, p. 175-200, 2004.

SANTA-ROSA, P. S.; SOUZA, A. L.; ROQUE, R. A.; ANDRADE, E. V.; ASTOLFI-FILHO, S.; MOTA, A. J.; NUNES-SILVA, C. G. Production of thermostable β -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 84-92, 2018.

SAYOOD, S. F., SUH, H., WILCOX, C. S., & SCHUSTER, S. M. Effect of citreoviridin and isocitreoviridin on beef heart mitochondrial ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 270(2), 714-721, 1989.

SENA, H. H.; SANCHES, M. A.; ROCHA, D. F. S.; SEGUNDO FILHO, W. O. P.; DE SOUZA, É. S.; DE SOUZA, J. V. B. Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the Amazon Forest. *International journal of microbiology*, 2018.

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. 159, n. 3, p. 178-186, 2008.

SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H.A.; SCHMIDT, J.P.; THORNTON, H.A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.

SHIRATORI, N.; KOBAYASHI, N.; TULAYAKUL, P. SUGIURA, Y.; TAKINO, M.; ENDO, O.; SUGITA-KONISHI, Y. Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, which produce a mutagenic metabolite and a mycotoxin citreoviridin, respectively, in selected commercially available rice grains in Thailand. *Toxins*, v. 9, n. 6, p. 194, 2017.

SHIZURI, Y.; NIWA, M.; FURUKAWA, H. & YAMAMURA, S. Isolation and structure of citroethiolactone, a novel metabolite of *Penicillium citreo-viride* B. *Tetrahedron Letters*, 24(10), 1053-1054, 1983.

SHIZURI, Y.; SHIGEMORI, H.; SATO, R.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K. & FURUKAWA, H. Four new metabolites produced by *Penicillium citreo-viride* B. on addition of NaBr. *Chemistry Letters*, 17(8), 1419-1422, 1988.

SIDDIQUI, Zaki A.; MAHMOOD, Irshad. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology*, v. 58, n. 3, p. 229-239, 1996.

SILVA, E. A.; SAAR, J. H.; OLIVEIRA, E. D. S. & OLIVEIRA, A. B. Biotransformation of lapachol by *Penicillium citreonigrum* Dierckx: Characterization of lomatiol. *Revista Microbiologica*, 28(3): 165-171, 1997.

SILVA, L. F.; FREIRE, K. T.; ARAÚJO-MAGALHÃES, G. R.; AGAMEZ-MONTALVO, G. S.; SOUSA, M. A.; COSTA-SILVA, T. A.; PAIVA, L.M.; PESSOA-JUNIOR, A.; BEZERRA, J.P.D.; SOUZA-MOTTA, C. M. *Penicillium and Talaromyces endophytes from Tillandsia catimbauensis, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 11, p. 1-12, 2018.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDAY, A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2, 2006.

SOUSA, T. F.; DOS SANTOS, A. O.; DA SILVA, F. M.; CANIATO, F. F.; DE QUEIROZ, C. A.; DE SOUZA, T. M.; MACIEL J.B.S; CATARINO, A.D.M.; GWINNER, R; PRANCHYA, S.; KITTAkoop, P.; ANGOLINI, C.F.F.; KOOLEN, H.H.F., SILVA, G.F. *Arcopilus amazonicus (Chaetomiaceae), a new fungal species from the Amazon rainforest native plant Paullinia cupana. Phytotaxa*, v. 456, n. 2, p. 145-156, 2020.

SOUSA, T. M. D. A. *Incidência de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em diferentes genótipos de castanha do Brasil e avaliação dos óleos fixos no controle de Aspergillus flavus produtor de aflatoxinas*. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Lavras, 2018.

SOUZA, J. R. S.; SARQUIS, M. I. M.; PANTOJA, M. C.; NETO, P. Q. C.; PEREIRA, J. O.; GALVÃO, R. M. S. & SILVA, M. I. L. Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. *Revista da Biologia*, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2018.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *Journal of Health Sciences*, v. 16, n. 4, 2014.

SPOONER, B. & ROBERTS, P. *Fungi*. New Naturalist series, Collins, London, 2005.

STĘPNIEWSKA, H.; UZAROWICZ, Ł.; BŁOŃSKA, E.; KWASOWSKI, W.; SŁODCZYK, Z.; GAŁKA, D.; HEBDA, A. Fungal abundance and diversity as influenced by properties of Technosols developed from mine wastes containing iron sulphides: A case study from abandoned iron sulphide and uranium mine in Rudki, south-central Poland. *Applied Soil Ecology*, v. 145, p. 103349, 2020.

STROBEL, G. A.; STIERLE, A.; HESS, W. M. Taxol formation in yew—*Taxus*. *Plant Science*, v. 92, n. 1, p. 1-12, 1993.

SUGIURA, Y.; WATANABE, M.; KOBAYASHI, N. Polyphasic reassessment of a yellow rice fungus, *Penicillium toxicarium*. *Nova Hedwigia*, p. 459-472, 2020.

SUN, S. Chronic exposure to cereal mycotoxin likely citreoviridin may be a trigger for Keshan disease mainly through oxidative stress mechanism. *Medical Hypotheses*, 74(5), 841-842, 2010.

TAHA, H.; SHIVANAND, P.; ZAINUDIN, M. A. A.; HADANAN, N. A. Identification of culturable marine fungi and bacteria from coastal region in Brunei Darussalam: Identification of culturable marine microbes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, v. 22, n. 3, 2021.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, J. A., DA SILVA LIMA, G., DOS SANTOS, G. F., LYRA, F. H., DA SILVA-HUGHES, A. F., & GONÇALVES, F. A. Abordagens clássicas e epigenéticas para a diversificação de metabólitos em fungos filamentosos. *Revisões de fitoquímica*, v. 12, p. 773-789, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista virtual de química*, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TIAGO, M. R. M.; DE OLIVEIRA, J. A. A.; CORTEZ, A. C. A.; DE SOUZA, J. V. B. Airborne fungi isolated from different environments of a primary school in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 2, n.2, p. 264-269, 2018.

TSANG, C-C.; TANG, J.Y.M.; LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 16, p. 197-210, 2018.

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. I. Citrinadin A, a Novel Pentacyclic Alkaloid from Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Organic letters*, v. 6, n. 18, p. 3087-3089, 2004.

UCHIYAMA, Y.; TAKINO, M.; NOGUCHI, M.; SHIRATORI, N.; KOBAYASHI, N. & SUGITA-KONISHI, Y. The in vivo and in vitro toxicokinetics of citreoviridin extracted from *Penicillium citreonigrum*. *Toxins*, 11(6), 2019. DOI: 10.3390/toxins11060360

UDAGAWA, S.; TATSUNO, T. Safety of rice grains and mycotoxins-a historical review of yellow rice mycotoxicoses. *Yakushigaku Zasshi*, v. 39, n. 2, p. 321-342, 2004.

UENO, Y. Citreoviridin. In *CRC Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*, p. 181-192. CRC Press, 2020.

UENO, Y. Production of citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreoviride* Biourge. IN *Symposium on Mycotoxins in Human Health: The Proceedings of a Symposium held in Pretoria from 2nd to 4th September 1970 under the auspices of the South African Medical Research Council with the collaboration of the South African Council for Scientific and Industrial Research*. Palgrave Macmillan UK, pp. 115-132, 1971.

UL HASSAN, S. S.; JIN, H. Z.; ABU-IZNEID, T.; RAUF, A.; ISHAQ, M. & SULERIA, H. A. R. Stress-driven discovery in the natural products: A gateway towards new drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109: 459-467, 2019.

URAGUCHI, K. Mycotoxic origin of cardiac beriberi. *Journal of Stored Products Research*, 5(3), 227-236, 1969.

URAGUCHI, K. Mycotoxic origin of cardiac beriberi. *Journal of stored products research*, v. 5, n. 3, p. 227-236, 1969.

VALIX M., TANG J. Y. & MALIK R.; Heavy metal tolerance of fungi. *Mineral Engineering* 14:499–505, 2001.

VELLINGA, E. C. Ecology and distribution of lepiotaceous fungi (Agaricaceae)-A review. *Nova Hedwigia*, v. 78, n. 3, p. 273-300, 2004.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural product communications*, v. 4, n. 11, p. 1934578X0900401114, 2009.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S-B.; KLAASSEN, C. H. W.; Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, v. 78, p. 141-173, 2014.

VISAGIE, C. M.; SEIFERT, K. A.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; JACOBS, K. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA fungus*, v. 7, n. 1, p. 75-117, 2016

WAKELIN, S. A.; GUPTA, V. V.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. *Canadian journal of microbiology*, v. 53, n. 1, p. 106-115, 2007.

WANG, X.; SENA FILHO, J. G.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R. & CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an Atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of Natural Products*, 73(5), 942-948, 2010.

WARDLE D. A.; BARDGETT R. D.; KLIRONOMOS J. N.; SETÄLÄ H.; VAN DER PUTTEN W. H.; WALL D. H. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, v. 304, n. 5677, p. 1629-1633, 2004.

WELLMAN, C. H. "Phytodebris" from Scottish Silurian and Lower Devonian continental deposits. *Review of Palaeobotany and Palynology*, v. 84, n. 3-4, p. 255-279, 1995.

WICKLOW, D. T.; COLE, R. J. Citreoviridin in standing corn infested by *EuPenicillium ochrosalmoneum*. *Mycologia*, v. 76, n. 5, p. 959-961, 1984.

WICKLOW, D. T.; STUBBLEFIELD, R. D.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L. Citreoviridin levels in *EuPenicillium ochrosalmoneum*-infested maize kernels at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1096-1098, 1988.

WIGMANN, É. F.; SACCOMORI, F.; BERNARDI, A. O.; FRISVAD, J. C.; COPETTI, M. V. Toxigenic penicillia spoiling frozen chicken nuggets. *Food Research International*, v. 67, p. 219-222, 2015.

WU, Y. H., HU, C. W., CHIEN, C. W., CHEN, Y. J., HUANG, H. C., & JUAN, H. F. Quantitative proteomic analysis of human lung tumor xenografts treated with the ectopic ATP synthase inhibitor citreoviridin. *PloS one*, 8(8), e70642, 2013.

YANNAI, S. *Dictionary of food compounds with CD-ROM: Additives, flavors, and ingredients*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2004.

YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; VISAGIE, C. M.; SAMSON, R. A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 29, p. 39, 2012.

YUAN, W. H.; GOTO, M.; HSIEH, K. Y.; YUAN, B.; ZHAO, Y.; MORRIS-NATSCHKE, S. L. & LEE, K. H. Selective cytotoxic eremophilane-type sesquiterpenes from *Penicillium citreonigrum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(12), 1239-1244, 2015.

YUAN, W. H.; WEI, Z. W.; DAI, P.; WU, H.; ZHAO, Y. X.; ZHANG, M. M. & ZHENG, W. F. Halogenated metabolites isolated from *Penicillium citreonigrum*. *Chemistry & Biodiversity*, 11(7), 1078-1087, 2014.

YUAN, W. H.; ZHANG, Y.; ZHANG, P. & DING, R. R. Antioxidant sesquiterpenes from *Penicillium citreonigrum*. *Natural Product Communications*, 12(12), 1934578X1701201203, 2017.

ZEECK, A.; RUSS, P.; LAATSCH, H.; LOEFFLER, W.; WEHRLE, H.; ZÄHNER, H. & HOLST, H. Metabolic Products of microorganisms. 172. Isolation of the antibiotic semi-vioxanthin from *Penicillium*, 1979. https://scholar.google.com.br/scholar?lr=lang_pt&q=Penicillium+citreoviride&hl=pt-BR&as_sdt=0,5_citreo-viride and synthesis of xanthomegnin. *Chemischer Informationsdienst*, 10(20):

ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. & KOZLOVSKY, A. G. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology*, 79(3), 277-286, 2010.

ZOU, Z. B.; ZHANG, G.; ZHOU, Y. Q.; XIE, C. L.; XIE, M. M.; XU, L. & WANG, J. S. Chemical constituents of the deep-sea-derived *Penicillium citreonigrum* MCCC 3A00169 and their antiproliferative effects. *Marine Drugs*, 20(12), 736, 2022. DOI:10.3390/md20120736