

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA NO FUNGO
Talaromyces sp. USANDO INDUTORES ABIÓTICOS**

Nayara de Freitas Gomes*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** Bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de
Tecnologia Programa de Pós-
Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Nayara de Freitas Gomes, realizada em 18/12/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edson Rodrigues

Filho (UFSCar) Prof. Dr. Clóvis

Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio José

Cantanhede Filho (IFMA) Prof.

Dr. Felipe Christoff Wouters

(UFSCar) Prof. Dr. Eduardo

Jorge Pilau (UEM)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Gomes, Nayara de Freitas

DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA NO FUNGO
Talaromyces sp. USANDO INDUTORES ABIÓTICOS /
Nayara de Freitas Gomes -- 2024.
144f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Edson Rodrigues Filho

Banca Examinadora: Clóvis Wesley Oliveira de Souza,
Antônio José Cantanhede Filho, Felipe Christoff Wouters,
Eduardo Jorge Pilau

Bibliografia

1. Produtos naturais. 2. Indutores abióticos. 3. Atividade
antibacteriana. I. Gomes, Nayara de Freitas. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180

Eu dedico esta tese
À minha família, por ser o alicerce de tudo que sou e por me cercar
de amor, sabedoria e força em cada etapa da minha vida.
Ao Marcelo, por sua paciência, companheirismo e por acreditar em
mim, mesmo nos momentos mais desafiadores.
A vocês, dedico esta conquista com todo o meu coração e gratidão.

"Conhecimento é saber que nada sabemos, mas ainda assim buscar aprender."

– Sócrates

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Sua presença constante em minha vida me trouxe forças nos momentos de dificuldade e inspiração para superar os desafios ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, minha base e maior exemplo de amor incondicional, por todo o apoio, dedicação, carinho e paciência. Por estarem sempre ao meu lado, celebrando as conquistas e me encorajando nos momentos de dúvida. Vocês são minha maior fonte de motivação e tudo o que alcancei é reflexo do amor e cuidado que sempre me dedicaram.

Às minhas irmãs, que não só compartilharam comigo os momentos de alegria, mas também estiveram ao meu lado nas fases mais desafiadoras. Obrigada por serem minhas companheiras incansáveis, pela cumplicidade, pelas palavras de encorajamento e pelo apoio constante.

À minha tia-avó Dedeca (*in memoriam*), cujo incentivo aos estudos sempre ressoará em minha memória e coração. Sua sabedoria e generosidade foram fundamentais para que eu acreditasse no meu potencial. Apesar da sua ausência física, sua influência permanece viva em mim, guiando meus passos e inspirando cada decisão.

Ao Marcelo, meu parceiro de vida e maior incentivador, cuja paciência, amor e compreensão foram indispensáveis durante todos os momentos dessa jornada. Obrigada por ser meu porto seguro, por me apoiar nos dias mais difíceis e por compartilhar comigo os sonhos e as realizações.

À Maiara, uma grande amiga e parceira de trabalho, cujo apoio e colaboração foram essenciais para o sucesso desta caminhada. Obrigada pela generosidade em compartilhar conhecimento, pelas conversas que trouxeram leveza aos dias difíceis e pelo compromisso em me ajudar a alcançar os objetivos deste projeto.

Agradeço meu orientador professor Dr. Edson Rodrigues Filho e ao LaBioMMi, pelos ensinamentos e ampliação de visão científica.

Aos professores da Universidade Federal de São Carlos, por todos os valiosos ensinamentos que ultrapassaram os limites das salas de aula e laboratórios. Agradeço pela paciência, pela dedicação e pelo suporte na realização dos experimentos que fundamentaram este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), por ser um ambiente de excelência acadêmica, que proporcionou a base necessária para o desenvolvimento desta tese. Sou grata por cada oportunidade de aprendizado e crescimento profissional que me foi oferecida ao longo desses anos.

À professora Lara Sette, em ceder o fungo utilizado no desenvolvimento deste trabalho, possibilitando que esta pesquisa fosse realizada. Sua contribuição foi indispensável para a concretização dos meus objetivos.

Aos professores Livia, Clóvis e Eduardo, pela realização dos ensaios e pela troca de conhecimentos que enriqueceram de forma significativa este estudo. Obrigada por compartilharem sua expertise e por colaborarem com tanto empenho para o aprimoramento desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização desta pesquisa. Seu apoio financeiro foi essencial para que eu pudesse me dedicar integralmente ao desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade, meu mais sincero agradecimento. Este trabalho é fruto de um esforço coletivo e reflete o impacto positivo de cada um que esteve presente nesta trajetória.

ABREVIATURAS

AcOEt Acetato de etila

ACN Acetonitrila

CHCl₃ Clorofórmio

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE Cromatografia líquida de ultra eficiência

CCD – Cromatografia em camada delgada

COSY Correlated Spectroscopy

DAD - Detector de arranjo diodo

DCM - Diclorometano

EM - Espectrometria de massas

ESI - Ionização Elétrospray

EtOH – Etanol

MeOH – Metanol

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CD₃OD – Metanol deuterado

DMSO - Dimetilsulfóxido

Hex - Hexano

HRMS - High Resolution Mass Sapectrometry

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (do inglês, Correlação de ligações múltiplas heteronucleares)

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (do inglês, Coesão Quântica

Heteronuclear de Um Único Núcleo)

ISO - Isopropanol

J - Constante de acoplamento em Hertz

MeOH - Metanol

m/z - Relação massa/ carga

nm - Nanômetro

OSMAC - One Strain Many Coumpounds

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TOF - Analisador por Tempo de voo

δ - Deslocamento químico em ppm

GC/MS - Gas Chromatography Mass Spectrometry

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

UV – Ultravioleta

CON – Controle

EXP - Experimento

PCA - *Principal Component Analysis*

GNPS - *Global Natural Products Social Molecular Networking*

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

MeOD – Metanol deuterado

D₂O – Água deuterada

Hz – Hertz

PCA - Principal Component Analysis

CG-EM – Cromatografia às acoplada a espectrometria de massas

NIST - National Institute of Standards and Technology

GNPS – Global Natural Products Social Molecular Networking

CLAE-R – Cromatografia líquida de alta eficiência reciclante

COV's – Compostos orgânicos voláteis

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (do inglês, Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)

ATCC: *American Type Culture Collection* (do inglês, Coleção de cultura tipográfica americana)

BDA – Batata dextrose ágar

MHA – Muller Hinton ágar

MH – Muller Hinton

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Proporções utilizadas para o preparo do meio de sólido	21
Tabela 3.2: Proporções utilizadas para o preparo para o meio de cultura líquido	21
Tabela 3.3: Moléculas identificadas na biblioteca <i>NIST08</i> para o fungo <i>Talaromyces</i> sp.....	29
Tabela 3.4: Moléculas identificadas na biblioteca <i>NIST08</i> para o fungo <i>Talaromyces</i> sp. na presença de CoCl_2	30
Tabela 3.5: Moléculas identificadas na biblioteca <i>NIST08</i> para o fungo <i>Talaromyces</i> sp. na presença de MnCl_2	31
Tabela 4.1: Frações obtidas a partir do extrato bruto.....	36
Tabela 4.2: Meroterpenos anotados na plataforma GNPS.....	42
Tabela 4.3: Dados de RMN de ^{13}C (D_2O) de S7 em comparação com os dados da literatura no mesmo solvente	53
Tabela 5.1: Frações do extrato AcOEt.	58
Tabela 6.1: Frações obtidas da biomassa do L9 cultivado na presença de luz UV-A	69
Tabela 7.1: Frações ensaiadas contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura químicas representado a micosporina (A), asperelina (B), geomicina (C) e citocalasina (D).....	5
Figura 1.2: Estrutura química da micosporina-glutaminol-glicosídeo.....	7
Figura 1.3: Exemplos de compostos produzidos em meios modificados com metais. 9	
Figura 1.4: Estrutura dos ciclopeptídeos produzidos pelo <i>P. brasilianum</i> em meio modificado com Co^{2+} e Mn^{2+}	10
Figura 1.5: Novos derivados de xantona produzidos pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. SYFz-1 na presença de NaCl.	10
Figura 1.6: Características morfológicas do gênero <i>Talaromyces</i>	11
Figura 1.7: Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de <i>Talaromyces</i>	12
Figura 1.8: Compostos produzidos por <i>T. rugulosus</i> (a) e <i>T. atroroseus</i> (b).....	13
Figura 3.1: Gráfico de PCA dos óleos essenciais do <i>Talaromyces</i> sp.....	24
Figura 3.2: <i>Cluster</i> de sesquiterpenos em meios de cultivo sem metal.....	25
Figura 3.3: <i>Cluster</i> de sesquiterpenos em meios de cultivo na presença de Mn^{2+}	26
Figura 3.4: <i>Cluster</i> de sesquiterpenos em meios de cultivo na presença de Co^{2+}	26
Figura 3.5: <i>Cluster</i> dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo sem metal.	27
Figura 3.6: <i>Cluster</i> dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo na presença de Mn^{2+}	27
Figura 3.7: <i>Cluster</i> dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo na presença de Co^{2+}	28
Figura 4.1: Procedimento de obtenção do extrato bruto.....	34
Figura 4.2: Fluxograma do procedimento de purificação.....	37
Figura 4.3: Gráficos de PCA (a) e dendrograma (b) do cultivo na presença e ausência de metal.....	39
Figura 4.4: Rede molecular do cultivo realizado em arroz e na presença de cobalto e manganês.....	40
Figura 4.5: <i>Cluster</i> molecular dos sesquiterpenos anotados.....	41
Figura 4.6: <i>Cluster</i> molecular dos meroterpenos anotados.....	41

Figura 4.7: Estrutura química do ergosterol (S1).....	43
Figura 4.8: Espectro de RMN ¹ H da colest-4-en-3-ona em CDCl ₃	44
Figura 4.9: Espectro de RMN ¹³ C da colest-4-en-3-ona em CDCl ₃	44
Figura 4.10: Estrutura química do esteroide colest-4-en-3-ona (S2).....	45
Figura 4.11: Estrutura química do ácido hexadecanoico (S3).....	45
Figura 4.12: Espectro de RMN de ¹ H da austina em CDCl ₃	47
Figura 4.13: Espectro de RMN de ¹³ C da austina em CDCl ₃	47
Figura 4.14: Estrutura química do meroterpeno austina (S4).....	48
Figura 4.15: Espectro de RMN ¹ H da acetoxidehidroaustina.....	49
Figura 4.16: Espectro de RMN ¹³ C da acetoxidehidroaustina.....	49
Figura 4.17: Estrutura química do meroterpenos dehidroaustina.....	50
Figura 4.18: Estrutura química do manitol.....	53
Figura 5.1: Representação do fotobiorreator para o cultivo em placa de Petri.....	56
Figura 5.2: Micélio do fungo <i>Talaromyces</i> sp. cultivado na a) ausência e b) presença de luz UV-A.....	59
Figura 5.3: Cromatogramas dos cultivos realizado na presença e ausência de luz UV-A em a) 240 nm e b) 400 nm.....	60
Figura 5.4: Gráfico de PCA (a) e dendrograma (b) dos cultivos realizado na presença e ausência de luz UV-A.....	61
Figura 5.5: Cromatogramas das frações do extrato AcOEt.....	62
Figura 5.6: Comparação dos cromatogramas da austina com os extratos obtidos.	63
Figura 6.1: Representação do fotobiorreator para cultivo em meio líquido.....	66
Figura 6.2: Fotobiorreator para o cultivo em meio líquido.....	67
Figura 6.3: Cultivo em escala preparativa na presença de luz UV-A.....	68
Figura 6.4: Cultivo do fungo L9 na ausência de luz no meio czapeck convencional (a), meio czapeck convencional na presença de luz (b), cultivo na presença de Co ²⁺ (c), e cultivo na presença de Mn ²⁺ (d).	70
Figura 6.5: Gráfico de PCA (a) e dendrograma (b) para o cultivo na presença e ausência de luz UV-A no meio czapeck convencional.....	71
Figura 6.6: Gráfico de PCA do cultivo na presença de cobalto.....	72

Figura 6.7: Gráfico de PCA do cultivo na presença de manganês.....	73
Figura 6.8: Rede molecular dos cultivos realizados na presença de cátions metálicos e luz UV-A.....	74
Figura 6.9: <i>Cluster</i> molecular dos meroterpenos anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A.....	75
Figura 6.10: <i>Cluster</i> molecular dos nucleosídeos anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A.....	75
Figura 6.11: Cluster molecular dos derivados da L-tirosina anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A.....	76
Figura 6.12: Cromatogramas das frações obtidas do extrato AcOEt.....	77
Figura 6.13: Estrutura química da n-acetil-tiramina (S8).....	78
Figura 6.14: Espectro de RMN ¹ H da n-acetil-tiramina.....	78
Figura 6.15: Espectro de RMN de ¹³ C da n-acetiltiramina.....	79
Figura 6.16: Espectro de RMN de ¹ H do <i>p</i> -aminofenol.....	80
Figura 6.17: Espectro de RMN ¹³ C do <i>p</i> -aminofenol.....	80
Figura 6.18: Estrutura química do <i>p</i> -aminofenol (S9).....	81
Figura 7.1: Representação da placa de Eliza.....	85

RESUMO

DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA NO FUNGO *Talaromyces* sp. USANDO INDUTORES ABIÓTICOS. Investigamos a diversificação metabólica do fungo *Talaromyces* sp. sob influência e ação conjugada de fatores abióticos, particularmente radiação UV-A e cátions metálicos. Para compreender o impacto desses fatores na produção de metabólitos, realizamos experimentos em diferentes condições de cultivo. Inicialmente, estudamos os compostos orgânicos voláteis e fixos (COV's), cultivando o fungo em meio sólido de arroz e meio líquido de Czapeck, com e sem a suplementação de cátions de manganês (Mn^{2+}) e cobalto (Co^{2+}). Em seguida, realizamos cultivos em: (1) meio sólido de arroz, com e sem suplementação de cátions metálicos, (2) meio líquido de Czapeck, suplementado com Mn^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} , tanto na presença quanto na ausência de luz UV-A, e (3) meio semi-sólido de batata-dextrose-ágar (BDA), com e sem exposição à luz UV-A. Os COV's foram analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, e os extratos dos cultivos referentes a (1), (2) e (3) foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Os dados obtidos foram processados pelas plataformas *MetaboAnalyst*, *Mzmine* e *GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking)*. Durante os cultivos, foi observada a inibição do crescimento do fungo em meio líquido de Czapeck com Co^{2+} , não observada na presença de Mn^{2+} . Por outro lado, o cultivo em meio sólido de arroz mostrou uma diversificada produção de metabólitos, incluindo sesquiterpenos e ácidos graxos. A análise de PCA (*Principal Component Analysis*) dos COV's revelou agrupamentos distintos nos perfis químicos, que se relacionam com a modulação da produção de metabólitos decorrente da suplementação com cátions. Nos cultivos com Co^{2+} e Mn^{2+} , as redes moleculares geradas pelo GNPS mostraram uma drástica diminuição do número de nodos associada à redução da produção de compostos; entretanto, foram anotados sesquiterpenos e ácidos graxos, indicando que a rota de produção dessas classes se manteve ativa. Os extratos do cultivo do *Talaromyces* sp. em arroz com água destilada, cloreto de cobalto (30 mmol) e cloreto de manganês (250 mmol), analisados por espectrometria de massas e processados em GNPS, revelaram a presença dos meroterpenos austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina. A confirmação desses compostos foi obtida por isolamento via cromatografia líquida de alta eficiência reciclante e caracterização por ressonância

magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Nos cultivos do *Talaromyces* sp. em BDA sob luz UV-A, observamos a presença de compostos não detectados nos cultivos no escuro. Na análise de PCA, verificamos que os extratos irradiados se agruparam distintamente, reforçando os indícios da influência da luz na biossíntese de metabólitos secundários. A presença de meroterpenos é também observada nos cultivos em meio Czapeck, com luz e metais, a partir da análise do perfil metabólico. Além disso, as redes moleculares indicaram um grupo metabólico com produtos derivados da L-tirosina, como N-acetiltiramina e *p*-aminofenol. Os COV's e os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos para avaliar sua atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, evidenciando uma atividade seletiva contra *S. aureus*, embora em nível moderado.

ABSTRACT

METABOLIC DIVERSIFICATION IN THE FUNGUS *Talaromyces* sp. USING ABIOTIC INDUCERS. We investigated the metabolic diversification of *Talaromyces* sp. under the influence of individual and combined abiotic factors, particularly UV-A radiation and metal cations. To understand the impact of these factors on metabolite production, we carried out experiments under diverse cultivation conditions. Initially, we examined non-volatile and volatile organic compounds (VOC's) by cultivating the fungus on solid rice and liquid Czapek media, with and without the supplementation of manganese (Mn^{2+}) and cobalt (Co^{2+}) cations. Subsequently, we conducted cultivations under the following conditions: (1) solid rice medium, with and without metal cation supplementation, (2) liquid Czapek medium, supplemented with Mn^{2+} , Co^{2+} , and Fe^{2+} , both in the presence and absence of UV-A light and (3) semi-solid potato dextrose agar (PDA) medium, with and without exposure to UV-A light. The VOCs were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry, and the extracts from cultivations (1), (2), and (3) were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. Obtained data were processed using the MetaboAnalyst, MZmine, and GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) platforms. During the cultivations, growth inhibition of the fungus was observed in the liquid Czapek medium supplemented with Co^{2+} , whereas it was not observed in the presence of Mn^{2+} . On the other hand, cultivation on solid rice medium exhibited diversified production of metabolites, including sesquiterpenes and fatty acids. The Principal Component Analysis (PCA) of the VOCs revealed distinct clustering in the chemical profiles, which correlates with the modulation of metabolite production due to cation supplementation. In cultivations with Co^{2+} and Mn^{2+} , the molecular networks generated by GNPS showed a drastic decrease in the number of nodes, associated with a reduction in compound production; however, sesquiterpenes and fatty acids were annotated, indicating that the biosynthetic pathway for these classes remained active. The extracts from the cultivation of *Talaromyces* sp. on rice with distilled water, cobalt chloride (30 mmol), and manganese chloride (250 mmol), analyzed by mass spectrometry and processed through GNPS, revealed the presence of the meroterpenes austin, dehydroaustin, and acetoxydehydroaustin. Confirmation of these compounds was achieved through isolation via reverse-phase high-performance liquid chromatography and characterization by 1H and ^{13}C nuclear

magnetic resonance. In the cultivation of *Talaromyces* sp. on PDA under UV-A light, we observed the presence of compounds not detected in cultures kept in the absence of UV-A light. PCA analysis showed that the irradiated extracts formed distinct clusters, further supporting evidence of the influence of light on the biosynthesis of secondary metabolites. The presence of meroterpenes was also observed in the cultures grown in Czapek medium under light exposure and with metal supplementation, based on the metabolic profile analysis. Additionally, molecular networking indicated a metabolic cluster containing products derived from L-tyrosine, such as N-acetyltyramine and p-aminophenol. The VOC's and obtained extracts were subjected to biological assays to evaluate their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, revealing selective activity against *S. aureus*, albeit at a moderate level.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Considerações sobre fungos antárticos	3
1.2 Influência da luz sobre os fungos.....	6
1.3 Adição de metais no cultivo dos fungos	8
1.4 Gênero <i>Talaromyces</i>	10
1.5 Metabólitos do gênero <i>Talaromyces</i>	11
1.6 Contextualização, relevância e abordagem do problema.....	14
2 OBJETIVOS, MATERIAIS E TÉCNICAS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
2.3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS	16
2.3.1. Materiais	16
2.3.1.1 Isolamento do fungo <i>Talaromyces</i> sp	16
2.3.1.2 Reativação e o repique do fungo	16
2.3.1.3 Preparo do meio Czapeck enriquecido com 2 % de extrato de levedura e cátions metálicos	17
2.3.2 Obtenção dos extratos e fracionamento por cromatografia.....	17
2.3.2.1 Solventes	17
2.3.2.2 Sais.....	17
2.3.2.3 Colunas e fases estacionárias para cromatografia.....	18
2.3.3 Vidrarias.....	18
2.3.4 Equipamentos e Técnicas.....	18
2.3.4.1 Preparo dos meios para escala analítica e preparativa.....	18
2.3.4.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD).....	18
2.3.5 CombiFlash.....	19
2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Escala Preparativa (CLAE-Prep)	19

2.3.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	19
3 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS	21
3.1 Extração dos componentes voláteis e fixos	21
3.2 Cultivo dos fungos na presença de cátions metálicos.....	22
3.3 Análise por CG-EM e processamento via <i>GNPS</i>	22
3.4 Resultados	23
3.4.1 Análise do gráfico de PCA e das redes moleculares.....	23
3.5 Conclusão parcial: estudo dos COV's	31
4 CULTIVO DO FUNGO <i>Talaromyces sp.</i> EM ARROZ	34
4.1 Cultivo em escala analítica na presença e ausência de metais	34
4.3 Isolamento e caracterização química das substâncias	38
4.4 Resultados.....	38
4.4.1 Análise estatística e anotação de metabolitos via plataforma <i>GNPS</i>	38
4.4.2 Isolamento e caracterização química.....	42
4.4.2.1 Isolamento e identificação dos esteroides da fração L9-AB.....	42
4.4.2.2 Isolamento dos meroterpenos na fração L9-AC e L9-AD.....	46
4.4.2.3 Identificação do poliol da fração L9-AF	50
4.5 Conclusão parcial: cultivo em arroz na presença de metais.....	51
5 CULTIVO DO <i>Talaromyces sp.</i> SOB LUZ UV-A.....	53
5.1 Cultivo em escala analítica	53
5.1.1 Análises cromatográficas e processamento via <i>GNPS</i> e <i>MetaboAnalyst</i>	54
5.2 Cultivo em escala preparativa em meio BDA sob luz UV-A.....	55
5.3 Resultados.....	55
5.3.2 Isolamento de metabólitos	58
5.4 Conclusão parcial: cultivo sob influência de luz UV-A.....	60
6 CULTIVO DO <i>Talaromyces sp.</i> SOB LUZ UV-A E ADIÇÃO DE CÁTIONS METÁLICOS	63
6.1 Cultivo em meio Czapeck convencional sob luz UV-A em escala analítica.....	63

6.2 Cultivo em escala preparativa	65
6.3 RESULTADOS.....	66
6.3.1 Processamento por GNPS.....	70
6.4 Conclusão parcial: cultivo sob luz UV-A e na presença de cátions	78
7 ENSAIO ANTIBACTERIANO	81
7.1 Ativação das bactérias.....	81
7.2 Padronização das culturas.....	81
7.3 Preparo das amostras.....	81
7.4 Teste em microplaca de 96 poços	82
7.5 Resultados	82
8 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE 1: Cromatogramas dos COV's do fungo <i>Talaromyces</i> sp. cultivado em meio sólido de arroz (A) e czapeck (B) sem a presença dos metais.....	92
APÊNDICE 2: Cromatogramas do fungo <i>Talaromyces</i> sp. em meio sólido arroz contendo com 30 mmol de CoCl_2 (C) e 250 mmol de MnCl_2 (D) e, meio líquido czapeck contendo 30 mmol de CoCl_2 (E) e 250 mmol de MnCl_2 (F).....	93
APÊNDICE 3: Espectros de fragmentação dos compostos orgânicos voláteis	94
APÊNDICE 4: Espectros de massas dos meroterpenos anotados	96
ANEXO I: Manuscrito em elaboração sobre o estudo dos COV's	100

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Os fungos, amplamente distribuídos em diversos nichos ecológicos ao redor do planeta, destacam-se por sua notável capacidade de adaptação a condições bióticas e abióticas variadas (BERLEMONT et al., 2011; CHAUD et al., 2016), sendo naturalmente encontrados não apenas em ambientes quentes e úmidos, comumente associados a eles, mas também em locais extremos, como a Antártica (ROSA et al., 2019). Além de desempenharem papéis ecológicos cruciais, como a biodegradação da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, os fungos despertam grande interesse científico devido à sua capacidade de produzir compostos bioativos com aplicações em diversos campos da biotecnologia. Este potencial se torna ainda mais promissor quando consideramos as possibilidades de induções metabólicas por meio de modificações no meio de cultivo, como variação de temperatura, mudança no pH, adição de sais, exposição à luz, biossíntese combinatória, biotransformações, entre outras (PAN et al., 2019). Essas ferramentas biotecnológicas permitem explorar o metabolismo dos fungos, ampliando a diversidade química envolvida, agregando ainda mais valor ao seu estudo (MACHELEIDT et al., 2016)

Entre as estratégias que visam modular a produção de metabólitos nos fungos, a exposição à radiação ultravioleta (UV) é amplamente empregada (CORROCHANO, 2019). A luz solar, principal fonte de radiação UV, abrange comprimentos de onda curtos e longos, como violeta (400 nm), índigo (445 nm), azul (475 nm), verde (510 nm), amarelo (570 nm), laranja (590 nm) e vermelho (650 nm), aos quais diferentes micro-organismos apresentam respostas específicas (CERÓN-BUSTAMANTE et al., 2023). A luz exerce, portanto, papel central no desenvolvimento e na atividade metabólica de diversos micro-organismos, incluindo os fungos. Embora os fungos sejam organismos heterotróficos, estudos evidenciam a influência da luz no seu crescimento, reprodução e produção de metabólitos secundários (CORROCHANO, 2019). A luz pode também atuar como um eliciador abiótico, afetando a produção desses metabólitos (HASHIM et al., 2021). Sabe-se, ademais, que a irradiação de luz em certos fungos pode levar ao aumento da produção de metabólitos, como as perilenoquinonas, produzidas pelo fungo *Shiraia-like* (ZEINAB et al., 2020), e compostos citotóxicos, como alternariol e alternariol monometil éter, produzidos pelo *Alternaria alternata* (WANG et al., 2022). Por outro lado, a luz também pode reduzir ou até inibir a produção de determinados metabólitos, como observado no *Aspergillus flavus*, onde a presença de luz branca resulta na diminuição da

produção de aflatoxina B1 (JOFFE e LISKER, 1969).

Outra estratégia de cultivo utilizada é a suplementação do meio com cátions metálicos. Metais como As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se e Zn, em quantidades mínimas, são essenciais para a manutenção do ciclo de vida dos microorganismos (GREN et al., 2014; LAMBERT et al., 2014). Entretanto, quando essas concentrações são excedidas, os fungos tendem a adsorver esses metais em suas superfícies celulares (VIRARAGHAVAN e SRINIVASAN, 2011; QIN et al., 2020; GOMA et al., 2022), desenvolvendo maior tolerância a elementos metálicos tóxicos, o que lhes permite prosperar em ambientes com altas concentrações desses elementos. Sabemos que a presença de metais nos meios de cultura pode alterar significativamente o perfil metabólico dos fungos, promovendo mudanças na produção e diversidade de compostos secundários. Por exemplo, foi observado que a adição de cobalto ao cultivo de *Streptomyces griseus* estimula a produção de antraciclinas (GRÄFE, ERITT E RIESENBERG, 1985), ao passo que a suplementação com manganês e cobre tende a comprometer a biossíntese de verrucologênio em *Penicillium brasilianum* (FILL et al., 2016).

Diante do contexto brevemente discutido, nesta tese investigamos as alterações no metabolismo secundário do fungo *Talaromyces sp.*, promovidas pela presença e ação conjugada de fatores abióticos, em particular radiação UV-A e cátions metálicos. Para isso, realizamos experimentos sob diferentes condições de cultivo, com o objetivo de estabelecer uma análise comparativa detalhada com os resultados obtidos e identificar diferenças críticas entre os distintos cultivos. Esperamos, assim, avançar no entendimento da resposta adaptativa do fungo aos fatores de estresse aplicados, compreender como esses fatores influenciam a produção de metabólitos bioativos e fornecer informações sobre condições que possam favorecer a biossíntese de compostos com potencial biotecnológico. As seções seguintes, discutiremos brevemente o metabolismo secundário de fungos antárticos, a influência da luz e a presença de cátions metálicos no cultivo de fungos.

1.1 Considerações sobre fungos antárticos

A Antártica é reconhecida como um dos habitats naturais mais adversos do planeta, caracterizada por temperaturas extremamente baixas, alta exposição à radiação ultravioleta, ciclos prolongados de congelamento e descongelamento, e escassez de nutrientes. Essas condições resultam em uma diversidade limitada de

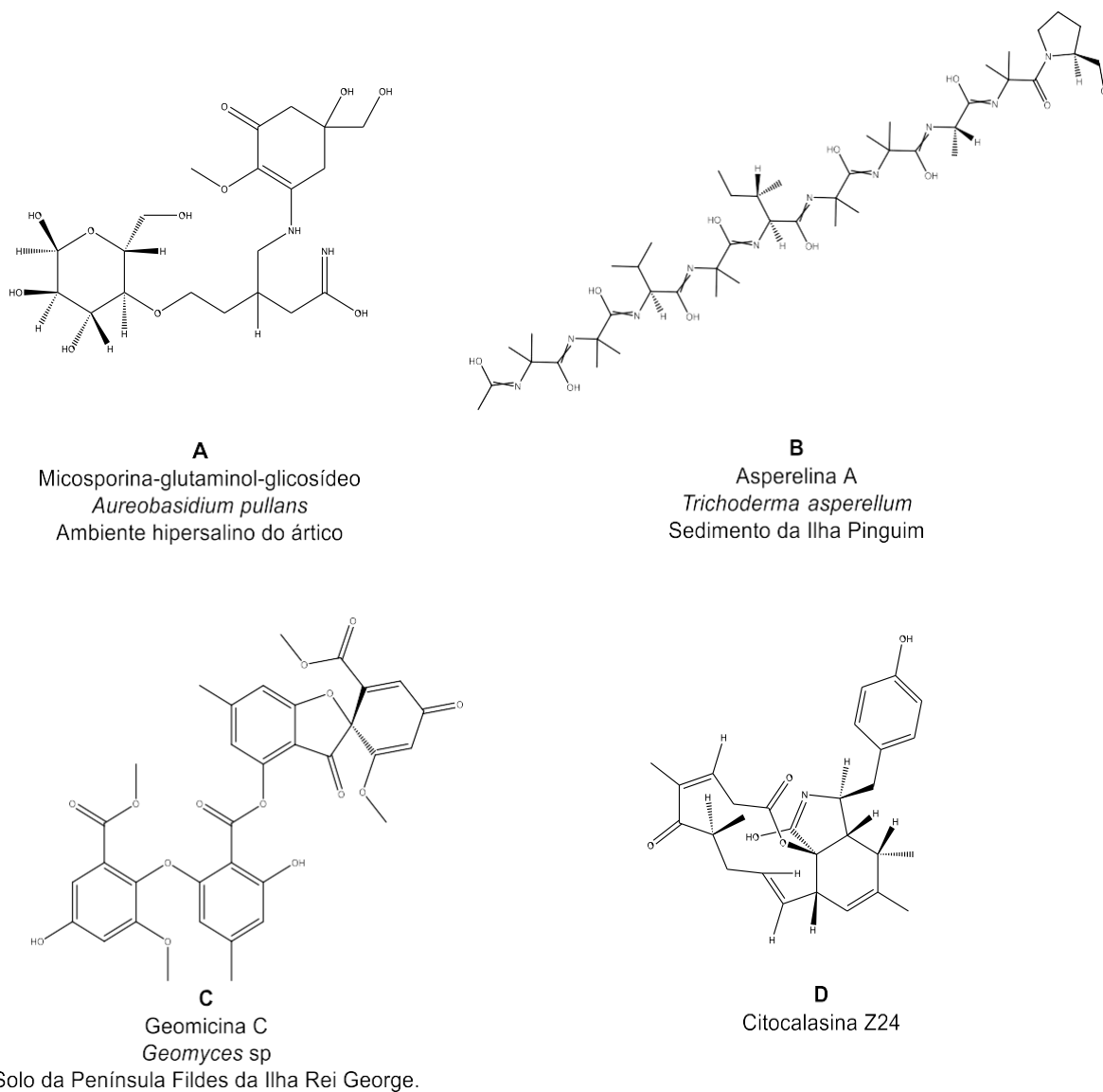
ecossistemas na região. Contudo, apesar dessas condições desafiadoras, a presença de organismos como bactérias, fungos, algas e outras formas de vida tem sido documentada na Antártica (CHOWN, 2006; VARELLA et al., 2021). A vida microbiana é especialmente abundante no território antártico, com destaque para os fungos, que, como mencionado, possuem uma notável capacidade de adaptação a condições extremas, garantindo sua sobrevivência. Dentre as numerosas espécies fúngicas já identificadas nessa região, destacam-se aquelas pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Chytridiomycota e Glomeromycota (BRIDGE et al., 2008). Além das espécies pertencentes a esses filos, também são encontrados fungos nativos dessa região, como o gênero *Antartomyces*, com as espécies *Antarctomyces psychrotrophicus* (STCHIGEL et al., 2001) e *Antarctomyces pellizariae* (MENEZES et al., 2017).

Dentre as diversas classes de metabólitos produzidos pelos fungos, destacam-se os terpenos, policetídeos, alcaloides, quinonas, pigmentos e outras substâncias bioativas (CHRISTENSEN, 1989; GODINHO et al., 2015). Esses compostos têm diversas aplicações em áreas de interesse biotecnológico e são utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos, herbicidas e corantes alimentícios (GODINHO et al., 2015). Em particular, os fungos extremófilos, denominados assim pela sua capacidade de viver em ambientes extremos, destacam-se pela produção de metabólitos bioativos como as micosporinas, amplamente empregadas na indústria cosmética para a fabricação de protetores solares (KOGEEJ et al., 2006); as asperelinas, conhecidas por sua atividade antifúngica (REN et al., 2009); as geomicinas, com atividade antibacteriana (LI et al., 2008); e as citocalasinas, que possuem uma vasta gama de atividades biológicas, especialmente como agentes antitumorais (LIU et al., 2014). A Figura 1.1 apresenta as estruturas químicas de cada grupo bioativo mencionado, acompanhadas da espécie fúngica da qual foram isolados e da localização onde esses micro-organismos foram obtidos.

Devido às condições extremas do continente antártico, os micro-organismos podem ser classificados com base nas condições físico-químicas e no ambiente em que são encontrados; por exemplo, os fungos psicrófilos, que toleram baixas temperaturas, e os fungos radiotolerantes, capazes de resistir a altos níveis de radiação ultravioleta (SINGH e GABANI, 2011). Em particular, os fungos radiotolerantes são micro-organismos terrestres que podem ser encontrados em diversas regiões do planeta. Como mecanismo de adaptação, esses fungos

desenvolveram a produção de diferentes pigmentos, como a melanina, um pigmento marrom produzido por uma cepa fúngica antártica de *Phoma herbarum*, exposta à elevada radiação UVB por 24 horas (HUGHES *et al.*, 2003). Contudo, existem espécies sensíveis à exposição à radiação, que pode também causar a inibição do crescimento fúngico, como observado em *Geomyces pannorum*, cujo crescimento foi inibido quando exposto à luz UVB. Tais observações evidenciam a diversificada resposta adaptativa dos fungos à radiação ultravioleta e a complexidade dos mecanismos que permitem a sobrevivência de algumas espécies em condições variadas, incluindo ambientes extremos.

Figura 1.1: Estruturas químicas que representam a micosporina (A), asperelina (B), geomicina (C) e citocalasina (D).



Fonte: Adaptado de LIU *et al.*, 2014.

1.2 Influência da luz sobre os fungos

A influência da luz sobre os fungos é um tema amplamente explorado, visto que seus impactos na produção metabólica são significativos e, em parte, conhecidos. Estudos indicam que a ausência de luz pode aumentar a concentração de determinados metabólitos. Essa variação pode ocorrer naturalmente, uma vez que a quantidade de luz recebida pelos fungos pode depender da estação do ano e da localização geográfica no planeta, os quais influenciam tanto o crescimento quanto a produção de metabólitos secundários, podendo favorecer ou inibir essa atividade metabólica (VELMURUGAN et al., 2010; KIM, SON & LEE, 2013).

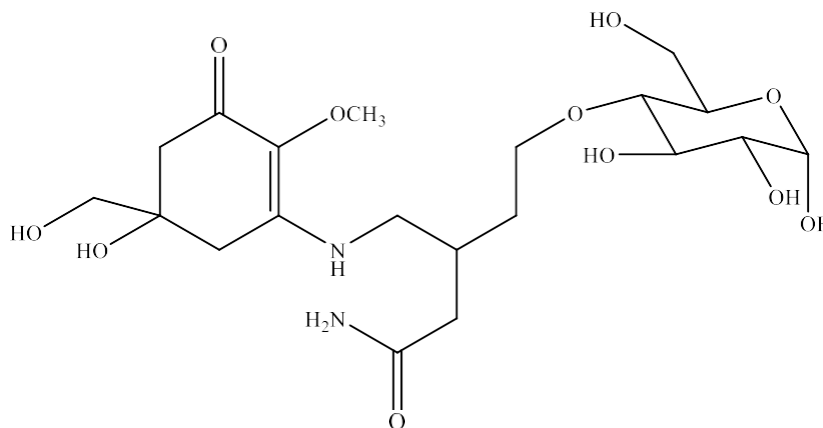
Embora os fungos não sejam organismos fotossintéticos, eles ainda são influenciados direta e indiretamente pela luz, utilizando-a como uma fonte de informação, em vez de energia. Fototropismo é a reação de crescimento em resposta à luz, fazendo com que o fungo cresça orientado pela influência da luz, se aproximando ou se afastando dela (TISCH & SCHMOLL, 2010; CHANG & MILES, 2004). Assim, o processo de formação dos fungos sob a influência direta da luz se associa à resposta fototrópica de suas estruturas reprodutivas. Conquanto seja amplamente reconhecido o impacto da luz sobre a produção de biomassa, pigmentos, metabólitos secundários e a reprodução dos fungos, essa área ainda carece de investigações mais detalhadas, especialmente no que diz respeito, especificamente, aos efeitos da luz sobre o metabolismo secundário desses organismos (VELMURUGAN et al., 2010; KIM, SON & LEE, 2013; TISCH & SCHMOLL, 2010).

A relação entre a luz e o crescimento micelial dos fungos tem sido investigada de longa data. Yusef e Allan (1967) demonstraram que, em algumas espécies, o crescimento micelial diminuía com o aumento da exposição à luz, enquanto, em outras, o oposto ocorria, com o crescimento sendo estimulado. Além disso, os autores mencionaram pesquisas realizadas na segunda metade da década de 1920 que já haviam investigado a questão. Estudos mais recentes, como os de VELMURUGAN et al. (2010), FANELLI et al. (2012) e CHEONG (2016), confirmaram que diferentes comprimentos de onda de luz não apenas afetam o crescimento micelial, mas também influenciam a produção de pigmentos, tanto intracelulares quanto extracelulares, além de metabólitos secundários.

Um exemplo notável dessa interação entre luz e metabolismo secundário pode ser observado nas leveduras do gênero *Rhodotorula*. Sommaruga et

al. (2004) identificaram a produção do composto fotoprotetor micosporina-glutaminol-glicosídeo (Figura 1.2), cuja síntese foi significativamente estimulada pela exposição à luz UV e radiação visível. Esse metabólito, amplamente reconhecido por suas propriedades protetoras contra danos causados pela radiação, ilustra de maneira clara como a luz pode atuar como um modulador do metabolismo secundário em fungos. Dessa forma, a produção desse composto não apenas protege o organismo contra o estresse luminoso, mas também reforça o papel adaptativo dos fungos às condições ambientais.

Figura 1.2: Estrutura química da micosporina-glutaminol-glicosídeo.



Fonte: SOMMARUGA *et al.* 2004

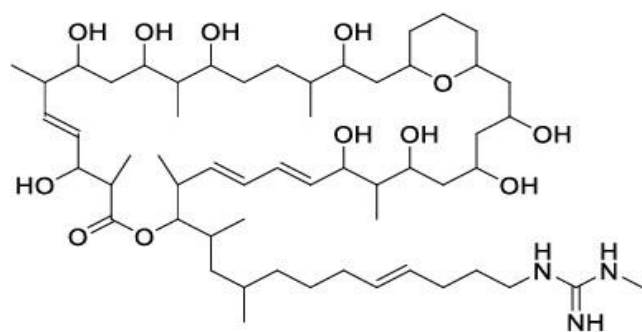
A irradiação de luz também pode prejudicar a produção de metabolitos, como demonstrado no estudo sobre a produção de aflatoxinas. Neste estudo, observou-se que a luz exerce um efeito inibidor significativo na síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Em condições de total escuridão, o fungo produziu até 178.000 pg/g de aflatoxinas, enquanto sob a influência da luz, a produção caiu drasticamente para apenas 35.000 pg/g, o que indica que a luz possui um efeito fototóxico na biossíntese desse composto. Esse efeito da luz na produção de toxinas reforça a ideia de que, além de regular o metabolismo secundário dos fungos, ela pode também atuar como um fator crucial na redução da toxicidade em determinados ambientes (JOFFE e LISKER, 1969).

1.3 Adição de metais no cultivo dos fungos

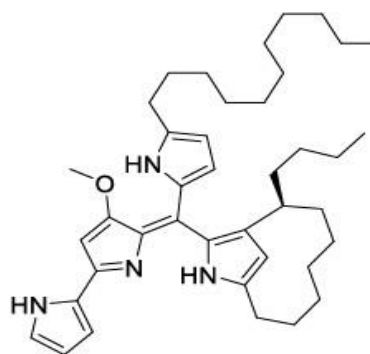
Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar como algumas espécies de micro-organismos se adaptam à presença de metais de transição. Uma das principais vertentes destaca o papel das metaloproteínas e metaloenzimas, cuja formação é facilitada pela interação dos metais com sítios doadores de elétrons. Devido à disponibilidade de seus orbitais d, esses metais podem se complexar, catalisando reações redox e atuando como cofatores enzimáticos essenciais (CULOTTA e DALY, 2013). Além disso, ao se complexarem com aminoácidos, os metais podem modificar a conformação das enzimas, permitindo a acomodação de novos substratos e, conseqüentemente, favorecendo a síntese de novas moléculas (FOSTER et al., 2014).

A suplementação de cátions metálicos no meio de cultivo pode favorecer a competição com os metais já ligados às metaloproteínas, podendo levar à substituição de um metal por outro. Assim, as propriedades químicas e físicas de metais e proteínas — como raio iônico, geometria de coordenação, número de ligantes, além das características do ligante (carga líquida, momento dipolar, polarizabilidade e sua atuação na doação/aceitação de carga) — podem influenciar a interação preferencial entre eles. Um exemplo disso é o zinco, que frequentemente substitui o magnésio em enzimas, ativando tirosinaquinases e fosfatase alcalina de magnésio (DUBEY et al, 2019; FOSTER et al., 2014). Além disso, estudos demonstram que metais como Mn^{2+} e Fe^{2+} podem aumentar a expressão de metabólitos, como, em particular, estimular a biossíntese do antibiótico macrofilo AK-1111-81 (Figura 1.3) pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* (GESHEVA et al., 2005). Ainda no que concerne ao gênero *Streptomyces*, sabe-se que o cultivo na presença do íon Co^{2+} pode afetar características fenotípicas de *S. coelicolor*, resultando em uma coloração vermelha e na produção de dois novos derivados de prodigiosinas, denominados coeligosina A e B (Figura 1.3) (MORGENSTERN et al., 2015).

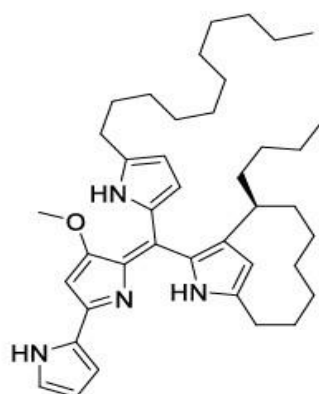
Figura 1.3: Exemplos de compostos produzidos em meios modificados com metais.



AK-1111-81



Coeligiosina A

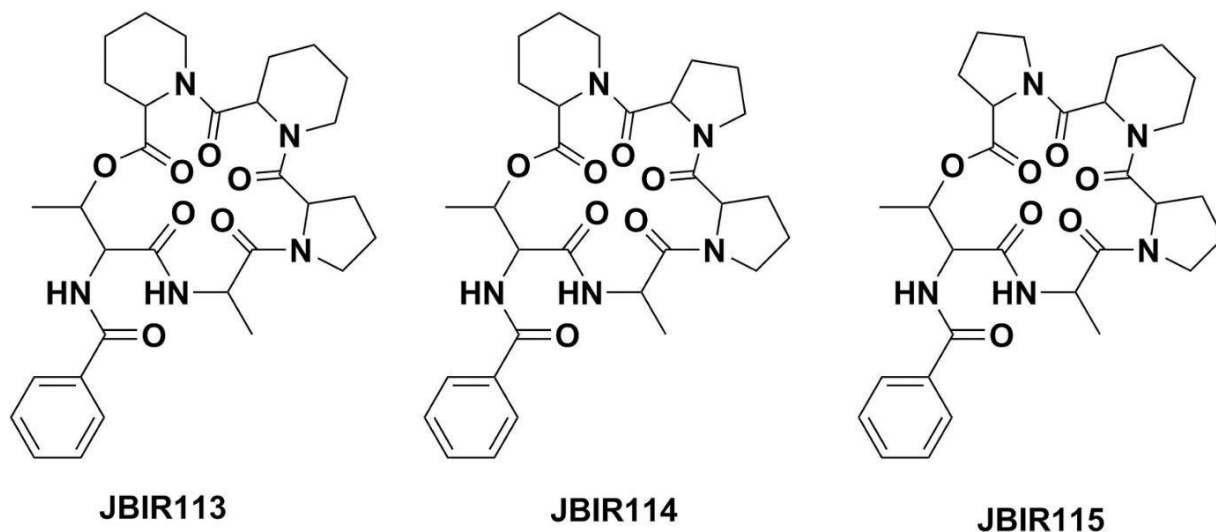


Coeligiosina B

Fonte: Adaptado de LIMA, 2020.

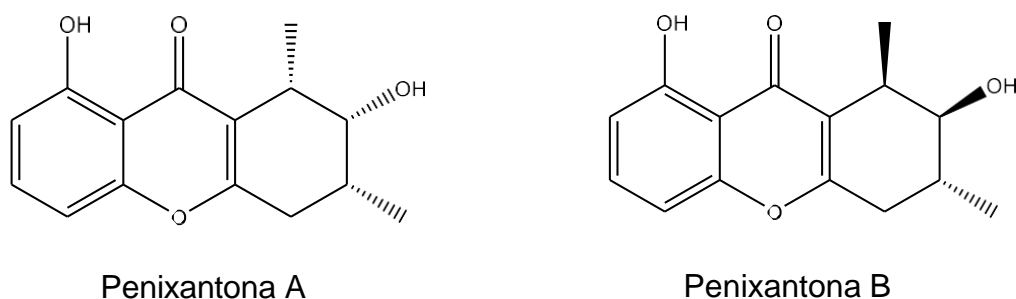
Por outro lado, também existem estudos que mostram que o fungo endofítico *Penicillium brasilianum*, quando cultivado em meio Czapek modificado suplementado com sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de manganês (MnSO_4), produz ciclopeptídeos JBIR 113, JBIR 114 e JBIR 115 (Figura 1.4), não produzidos em condições padrões (ou seja, em meio Czapek convencional), na ausência destes aditivos (FILL et al., 2016). Comportamento semelhante foi observado no cultivo do fungo *Penicillium sp.* SYFz-1 em meio sólido de arroz suplementado com 3% de cloreto de sódio (NaCl), onde foi observada a produção de dois novos derivados de xantona (Figura 1.5), denominados penixantona A e penixantona B (TAO et al., 2017).

Figura 1.4: Estrutura dos ciclopeptídeos produzidos pelo *P. brasilianum* em meio modificado com Cu^{2+} e Mn^{2+}



Fonte: Adaptado de LIMA, 2020

Figura 1.5: Novos derivados de xantona produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. SYFz-1 na presença de NaCl.



Fonte: Adaptado de TAO et al.,2017.

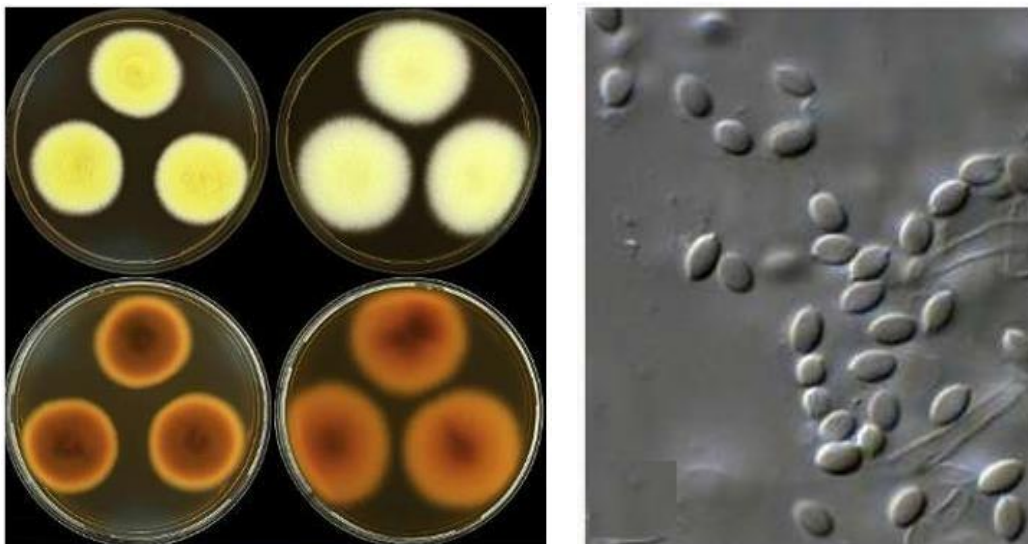
1.4 Gênero *Talaromyces*

A palavra *Talaromyces* deriva da palavra grega *talaros*, que significa “cesta”, e se refere à estrutura em que os ascosporos são formados. Na literatura taxonômica de *Penicillium* e *Talaromyces*, é amplamente conhecido que as espécies que produzem estágios sexuais com anamorfos de *Penicillium* foram inicialmente classificadas em diferentes gêneros, como *Eupenicillium* e *Talaromyces*. Estudos de

taxonomia molecular contribuíram para redefinir as fronteiras entre os gêneros, e, a partir de 2011, as espécies classificadas no subgênero *Penicillium* (*Biverticillium*) foram reclassificadas para o gênero *Talaromyces* (PITT, 2014).

As características morfológicas marcantes do gênero *Talaromyces* incluem ascocarpos de paredes frágeis e ascos predominantemente ovados ou globosos. A coloração do micélio varia entre tons de amarelo, laranja e vermelho, enquanto suas hifas são septadas e apresentam um padrão entrelaçado (Figura 1.6). Diversas espécies desse gênero possuem relevância médica devido ao seu potencial patogênico, como no caso de infecções oportunistas causadas por determinadas espécies (YILMAZ et al., 2014).

Figura 1.6: Características morfológicas do gênero *Talaromyces*.



Fonte: Adaptado de Ylmaz et al., 2014.

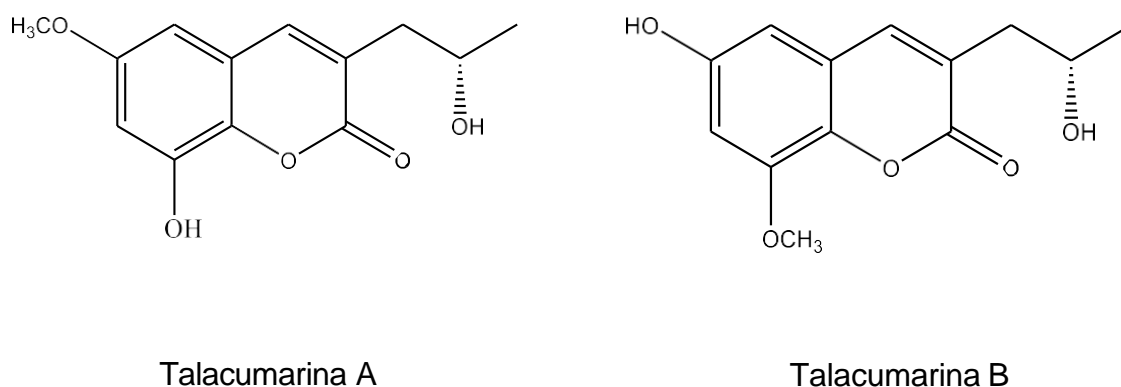
1.5 Metabólitos do gênero *Talaromyces*

Os micro-organismos possuem a capacidade de produzir moléculas biologicamente ativas por meio de seus metabolismos primário e secundário. Compostos do metabolismo primário, como proteínas e carboidratos, desempenham papéis essenciais para a sobrevivência e processos vitais dos organismos. Em contraste, a síntese de compostos do metabolismo secundário ocorre, geralmente, em resposta a fatores externos que ameaçam seu desenvolvimento (DEWICK, 2008). Apesar de sua produção estar restrita a condições específicas, esses metabólitos oferecem vantagens competitivas no ambiente. Eles podem auxiliar na defesa do

organismo ou atuar como atrativos para indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes (DEWICK, 2008; GARCIA et al., 2012).

Os fungos do gênero *Talaromyces* destacam-se pela diversidade de compostos químicos originados de seu metabolismo e por suas notáveis atividades biológicas, que incluem propriedades antimicrobianas e citotóxicas (KOOLEN et al., 2013). Dentre as classes mais comuns de metabólitos secundários produzidos por espécies desse gênero, encontram-se principalmente alcaloides, peptídeos, policetídeos, ésteres, quinonas, esteróides e terpenoides, entre outros (JIE et al., 2016). Especificamente, as cumarinas talacumarina A e talacumarina B, isoladas de *Talaromyces*, são relatadas na literatura por sua atividade citotóxica e antimicrobiana, demonstrando o potencial biotecnológico do gênero (HE et al., 2014).

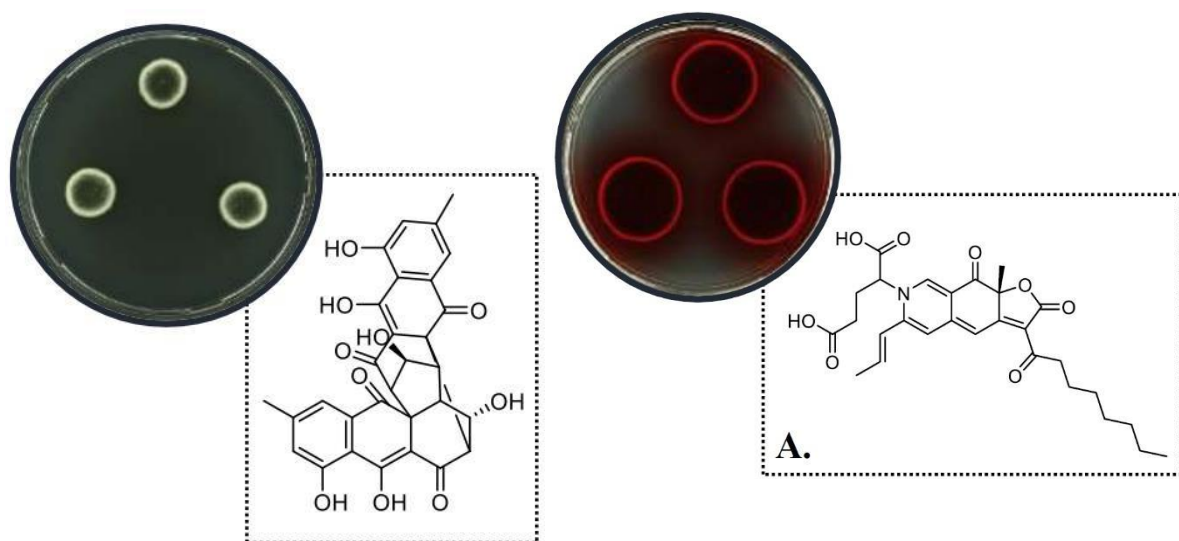
Figura 1.7: Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de *Talaromyces*.



Fonte: A autora, 2025.

Além disso, foram isolados do gênero *Talaromyces* derivados de xantona, como os ácidos secalônico e talaroxantona, ambos com atividade citotóxica (ZHAI, 2016). Em particular, a espécie *T. rugulosus* foi descrita como produtora da rugulosina A, um pigmento bis-antraquinóide que apresenta atividade antibacteriana, contribuindo junto ao combate de bactérias como *Staphylococcus aureus* (HAN et al., 2021; YILMAZ et al., 2014). Esse composto tem atraído atenção no campo da farmacologia e da biotecnologia, devido ao seu potencial como alternativa terapêutica para infecções bacterianas difíceis de tratar, além de apresentar propriedades antifúngicas e anti-inflamatórias, ampliando seu espectro de ação biológica. Outro exemplo de espécie produtora de pigmento é *T. atroroseus*, que biossintetiza o pigmento *N*-glutamil-monascorubramina, utilizado em larga escala como corante alimentar.

Figura 1.8: Compostos produzidos por *T. rugulosus* (a) e *T. atroroseus* (b).



Fonte: Adaptado de YLMAZ *et al.*, 2014.

Além das espécies já mencionadas, outra que também se destaca pela produção de metabólitos secundários com atividades biológicas é *T. purpurogenus*. Esta espécie tem sido amplamente estudada devido à produção de pigmentos naturais, como a rubropuntamina e a monascorubramina, ambos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que podem proteger as células do estresse oxidativo, um fator chave no envelhecimento e em várias doenças degenerativas, além de serem explorados como corantes naturais para aplicações nas indústrias alimentícia e cosmética (SINGH *et al.*, 2017).

Outro grupo de metabólitos produzidos pelo gênero *Talaromyces* são os terpenoides. Derivados dessa classe, como o talarofuranol A, isolado de *T. wortmannii*, demonstraram atividades antifúngicas promissoras contra patógenos agrícolas e clínicos (ZHOU *et al.*, 2020). Essas propriedades conferem ao gênero uma alternativa sustentável para o desenvolvimento de biofungicidas, uma vez que terpenoides apresentam baixa toxicidade para organismos não-alvo, são biodegradáveis e eficientes no controle de doenças fúngicas. Em particular, o talarofuranol A tem atraído atenção por sua capacidade de inibir o crescimento de fungos patogênicos em plantas e em ambientes clínicos, ajudando a minimizar os impactos negativos associados ao uso excessivo de fungicidas sintéticos. Além disso,

a exploração de terpenoides pelo gênero *Talaromyces* pode contribuir para a bioprospecção de novos compostos bioativos, capazes de substituir métodos convencionais de controle de doenças fúngicas.

1.6 Contextualização, relevância e abordagem do problema

Em síntese, os fungos são organismos com ampla diversidade metabólica, que desempenham papéis essenciais nos ecossistemas. Sua capacidade de adaptação permite que prosperem em ambientes diversos, incluindo os mais extremos, onde sua presença auxilia na manutenção do equilíbrio ecológico local. Em particular, fungos extremófilos dispõem de mecanismos de adaptação que se manifestam sob condições extremas, e são capazes de sobreviver e produzir metabólitos bioativos sob condições desafiadoras. Este tipo de adaptação agrega grande valor aos estudos desses organismos, considerando que suas produções metabólicas apresentam valioso espectro de aplicações - como em medicina, fármacos, indústria alimentícia, agricultura, entre outras – e, adicionalmente, podem ser influenciadas por fatores abióticos, estabelecendo assim uma vertente de pesquisa fértil e promissora.

Nesta tese, tratamos especificamente do fungo extremófilo *Talaromyces* sp. isolado a partir do recuo da geleira Collins na Antártica, cultivado sob a influência de fatores abióticos distintos, particularmente luz e cátions metálicos, e estudamos a produção de metabólitos pelo fungo. Sabe-se que luz pode influenciar a biossíntese de compostos bioativos, alguns com propriedades anticâncer, antibióticas e antifúngicas; enquanto que os cátions metálicos (como Mn^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+}) influenciam o metabolismo fúngico, podendo estimular ou inibir a produção de diversos compostos bioativos. Portanto, neste estudo buscamos compreender como esses fatores, e sua ação conjugada, podem afetar a produção metabólica do fungo *Talaromyces* sp. Os resultados sobre a produção de compostos em resposta a variações desses fatores permitirão estabelecer uma análise comparativa considerando as diferentes condições de cultivo, a partir da qual esperamos contribuir para o entendimento sobre as respostas adaptativas dos fungos e suas possíveis implicações.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS, MATERIAIS E TÉCNICAS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações no metabolismo secundário do fungo *Talaromyces* sp. a partir de uma análise comparativa dos cultivos realizados em arroz e cultivos sob irradiação de luz UV-A e adição de cátions metálicos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Ativar e cultivar o fungo *Talaromyces* sp.;
- b) Cultivar em meio sólido de arroz e líquido de Czapeck para conhecer a composição química volátil;
- c) Cultivar o fungo em meio sólido de arroz e isolar os metabólitos provenientes desse cultivo;
- d) Elaborar os fotobiorreatores para cultivo do fungo em meio líquido;
- e) Cultivar o fungo em experimentos controlados, com e sem irradiações UV-A, cloreto de manganês e cobalto; e analisar os extratos por CLAE-DAD, LC-MS e ferramentas de bioinformática;
- f) Isolar as substâncias produzidas pelo fungo na presença de luz caracterizá-las estruturalmente através técnicas de RMN ¹H e ¹³C, e EM;
- g) Avaliar o potencial biológico das frações obtidas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (gram positiva) e *Escherichia coli* (gram negativa).

2.3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

2.3.1. Materiais

2.3.1.1 Isolamento do fungo *Talaromyces* sp.

▪ A cepa fúngica de *Talaromyces* sp. (LAMAI 2549 – L9) foi isolada do solo localizado a 150 metros do recuo da geleira Collins (62° 09.794'S 58° 55.560'W) situada na região Antártica. O procedimento de isolamento seguiu a metodologia descrita por Santos et al. 2020. Posteriormente, o fungo foi preservado e depositado sob o código de identificação LAMAI no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Rio Claro, SP, Brasil.

2.3.1.2 Reativação e o repique do fungo

- Batata, dextrose, Ágar (BDA) - ACUMÉDIA®;
- Água destilada;
- Álcool etílico 70%;
- Alça de platina;
- Lamparina;
- Lâmina de Bisturi;
- Placa Petri.

2.3.1.3 Preparo do meio Czapeck enriquecido com 2 % de extrato de levedura e cátions metálicos

- Água destilada;
- Cloreto de cobalto (CoCl₂) (98%) – Synth®;
- Cloreto de manganês (MnCl₂) (98 – 101%) – Synth®;
- Extrato de levedura – Neogen®;
- Fosfato de potássio (K₂HPO₄) (98%) – Exôdo®;
- Glicose – Exôdo®;
- Nitrato de sódio (NaNO₃) (97%) – Synth®;
- Sulfato de ferro (FeSO₄.7H₂O) (99%) – Synth®;
- Sulfato de magnésio (MgSO₄) (99%) – Exôdo®.

2.3.2 Obtenção dos extratos e fracionamento por cromatografia

2.3.2.1 Solventes

- Solventes de padrão analítico (P.A.) e destilados DQ-UFSCar como acetato de etila (AcOEt), hexano (Hex), clorofórmio (CHCl₃), diclorometano (CHCl₂) e metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol (ISO), acetonitrila (ACN) das marcas Synth®, Neon® e Exôdo®, assim como ácido fórmico da marca PANREAC®
- Solventes grau Cromatografia de alta eficiência (CLAE) como MeOH, Acetonitrila (ACN) das marcas Honeywell®, Tedia® e LiChrosolv® Reag. Ph Eur MERCK® e água ultra pura, purificada em sistema Milli-Q®.

2.3.2.2 Sais

- Acetato de sódio (AcONa) – Exôdo®;
- Cloreto de sódio (NaCl) – Exôdo®;
- Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) (99%) – Exôdo®;

- Fosfato de potássio (K_2HPO_4) (98%) – Exôdo ®.

2.3.2.3 Colunas e fases estacionárias para cromatografia

- Sílica em gel 60 (70-230 Mesh) MERCK®;
- Coluna cromatográfica analítica para CLAE: Luna Phenyl-Hexyl, 5 μ m (250 x 4.60 mm) Phenomenex®; Coluna analítica para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE): C18, 1.7 μ m (2.1 x 100 mm) WATERS® ACQUITY UPLC CSH;

2.3.3 Vidrarias

- Erlenmeyeres de 125, 250 e 500 mL;
- Balão de fundo redondo 500 mL e 1 L;
- Balão volumétrico de 250 e 500 mL;
- Funil de separação;
- Tubos de ensaio;

2.3.4 Equipamentos e Técnicas

2.3.4.1 Preparo dos meios para escala analítica e preparativa

- Autoclave vertical - Phoenix A V 75 e Soc. FABBE 103;
- Balança analítica – Shimadzu ®;
- Balança semi-analítica – Tecnal ®;
- Biochemical Oxygen Demand - BOD – Tecnal ®;
- Capela de fluxo laminar – VECO VLFS-12M;
- extração e concentração de amostras o
- Rotaevaporador com banho de aquecimento BÜCHI® B-480
- Bomba de vácuo TE – 0581 TECNAL ®;
- Bomba de vácuo Primatec ®;
- Capela;
- *Speed Vac* – RVC 2 – 33IR Christc ®;
- Centrífuga
- Banho ultrassônico

2.3.4.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)

- As análises de CLUE-DAD dos cultivos em escala analítica e preparativa ocorreram no equipamento CLUE-DAD AcquityH class Waters® com amostrador

automático SDI, detector DAD, sistema de bombas quaternária de solvente e software de processamento de dados MassLynx V4.1.

2.3.5 CombiFlash

- Cromatógrafo Líquido de Média Pressão (CLMP) empregando o sistema da TELEDYNE-ISCO Combiflash RF 200 UV-vis.

2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Escala Preparativa (CLAE-Prep)

- Cromatógrafo líquido em escala preparativo LC-6AD equipado com válvula de reciclo, detector SPD-10AV UV-VIS, injetor manual SIL- 10ADVp e sistema de controle SCL-10A, todos da SHIMADZU. Com coluna cromatográfica Shodex, Asahipak GS-310 21G, 20x500 nm (diâmetro de partícula de 13 µm)

2.3.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- As análises por RMN de ^1H e ^{13}C foram desenvolvidas no equipamento do DQ-UFSCar, fabricado pela empresa Bruker®, NanoBay® de 9,4 Tesla para frequência de 400 MHz de hidrogênio e sonda de 5 mm (smarte probe com Automatic Tunning Matching Adjustment, ATMA®). Os solventes deuterados utilizados nos experimentos foram o clorofórmio-D (CDCl_3) e metanol-D4 (CD_3OD).

CAPÍTULO 3

3 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS

3.1 Extração dos componentes voláteis e fixos

Para a extração dos componentes voláteis do fungo *Talaromyces* sp., (chamado do L9) foram empregados dois meios de cultivo: um sólido, utilizando arroz, e um líquido, utilizando meio Czapeck. O meio de arroz foi preparado seguindo as proporções especificadas no Tabela 3.1. Após a pesagem do arroz, este foi transferido para um balão de fundo redondo de 2L e, em seguida, foi adicionada água destilada. O meio foi então esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 15 minutos. O processo de esterilização foi repetido após um intervalo de 24 horas.

Tabela 3.1: Proporções utilizadas para o preparo do meio de sólido

COMPONENTES	QUANTIDADES
Arroz Parboilizado	360,0g
Água destilada	240mL

Fonte: A autora, 2025.

Já o meio líquido Czapeck foi preparado conforme as proporções indicadas no Tabela 3.2. Após a pesagem dos reagentes, a água foi adicionada gradualmente para dissolver os sais e outros elementos, e a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de fundo redondo de 2L. O meio foi então submetido a esterilização em autoclave a 120°C e 1 atm por 15 min, uma única vez.

Tabela 3.2: Proporções utilizadas para o preparo para o meio de cultura líquido.

REAGENTES	QUANTIDADES
NaNO ₃	3,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
KCl	0,5g
MgSO ₄	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
Extrato de Levedura	20,0g
Dextrose	30,0g
Água destilada	1L

Fonte: A autora, 2025.

Após a esterilização dos meios, foi preparada uma suspensão de esporos utilizando pedaços da placa de BDA que continham o fungo correspondente. Esses fragmentos foram transferidos para tubos Falcon estéreis contendo 5 mL de água destilada previamente esterilizada. Em seguida, 1000 µL dessa solução foram transferidos para cada um dos balões contendo os meios de cultivo.

Após 15 dias de crescimento, o material foi conduzido a etapa de extração dos componentes volatéis utilizando a técnica da hidrodestilação através do extrator de Clevenger usando éter etílico para extração das substâncias voláteis. Para a extração do óleo do cultivo em meio líquido, o balão foi colocado diretamente no extrator. O procedimento de extração foi realizado ao longo de 2 horas a partir do início da ebulição do meio.

Por outro lado, no meio sólido de arroz, foi necessário adicionar 1L de água destilada e 1g de cloreto de cálcio (CaCl_2) para prevenir a formação de espuma. Após a extração do óleo de ambos os cultivos, foi adicionado sulfato anidro de sódio (Na_2SO_4) para remover a água residual do material. Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos e submetidas à análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3.2 Cultivo dos fungos na presença de cátions metálicos

Para o cultivo dos fungos na presença de cátions de metálicos, foram preparadas soluções de cloreto de manganês a 250 mmol (MnCl_2) e cloreto de cobalto a 30 mmol (CoCl_2). No cultivo em meio sólido de arroz, substituímos a água destilada pela solução de cátion. Já no cultivo em meio líquido de Czapeck, realizamos a troca do sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) pelas soluções de cátions metálicos mencionadas. Após a esterilização dos materiais em autoclave, adicionamos alíquotas de 1mL das suspensões de esporos de *Talaromyces* sp. Após 20 dias de crescimento, os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação utilizando o extrator de Clevenger durante 2 horas a partir do início da ebulição do meio.

3.3 Análise por CG-EM e processamento via GNPS

A análise dos óleos essenciais no CG-EM foi feita em um cromatógrafo a gás (CG-2010) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da Shimadzu, juntamente com uma coluna capilar Rxi-5ms (10m x 0.10 mm x 0.10 µm). O gás de arraste, hélio (H_2), foi conduzido com um fluxo linear de 35 cm/seg

e fluxo da coluna 0,45 mL/min. O controle do forno foi executado com uma escala de temperatura de 40°C até 320°C com taxa de aquecimento de 21°C/min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foram de 250 e 200°C, respectivamente. O modo de injeção foi *Splitless* com razão de 20 e volume da injeção de 2µL. Para a identificação dos picos utilizou-se a biblioteca do equipamento *NIST08 (National Institute of Standards and Technology)*.

Após as análises realizadas no CG-EM, os cromatogramas obtidos foram convertidos para o formato *Computable Document Format (CDF)* por meio do software *LabSolutions - GCMSsolution* da Shimadzu antes do processamento dos dados. Em seguida, o alinhamento e a deconvolução dos picos nos arquivos convertidos em CDF foram executados utilizando o software *Mzmine* versão 2.53. Os resultados alinhados foram exportados como um arquivo no formato de *Mascot Generic Format (mgf)*. Posteriormente, os arquivos *mgf* foram carregados na plataforma *GNPS (//gnps.ucsd.edu)*, onde uma rede molecular foi gerada. No decorrer do fluxo de trabalho, foram empregados os seguintes parâmetros: a tolerância da massa do íon precursor foi estabelecida em 0.5 Da, o número mínimo de picos correspondentes foi fixado em 6 e o limiar de pontuação foi configurado para 0,05.

3.4 Resultados

3.4.1 Análise do gráfico de PCA e das redes moleculares

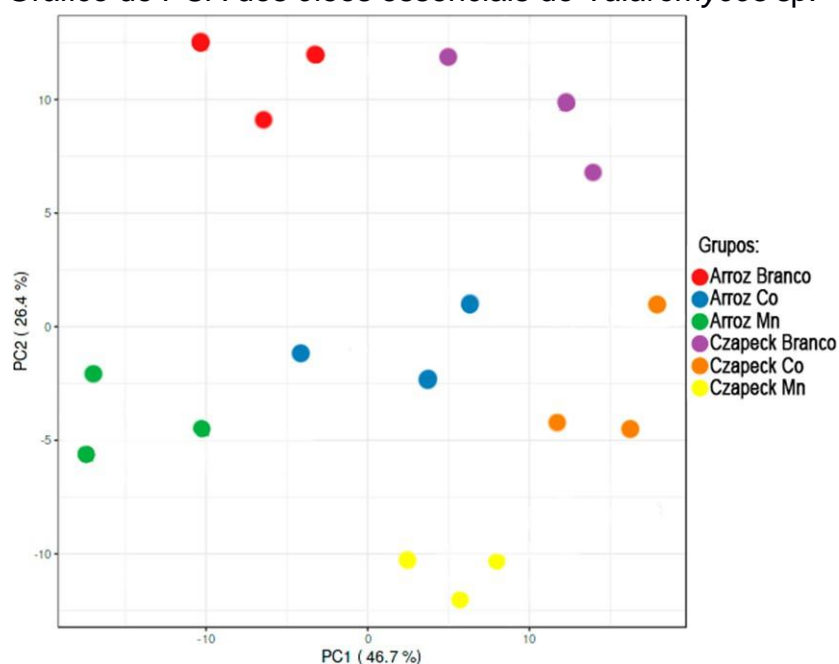
Ao observar o crescimento dos micro-organismos expostos aos cátions metálicos durante 20 dias, foram notadas diferenças significativas no crescimento micelial dos fungos, especialmente no meio líquido de Czapeck. No meio de Czapeck contendo cobalto e manganês, verificou-se que o cobalto inibiu completamente o crescimento micelial, efeito não observado na presença do manganês.

No meio sólido de arroz, houve uma mudança na coloração do micélio. Essa alteração pode ser atribuída à ação dos metais presentes, que atuam como cofatores de proteínas envolvidas em processos de transferência de elétrons através de reações redox. Essas proteínas podem doar elétrons- π ou pares de elétrons- n para a quelação dos metais, promovendo a transferência de elétrons. Por exemplo, diferentes grupos heme nos citocromos, quando complexados com diferentes metais, exibem diferentes absorções no espectro do ultravioleta visível (LIU et al., 2014).

Ao comparar os cromatogramas obtidos dos diversos cultivos (consultar Apêndice I e II página 92), notamos uma variação na complexidade dos compostos e ao analisar os óleos obtidos a partir do fungo *Talaromyces* sp., esses componentes representaram 46,7% e 26,4%, respectivamente, da variabilidade do conjunto de dados, totalizando 73,1% da variabilidade total.

O gráfico bidimensional de pontuação PC1 vs. PC2 para o fungo *Talaromyces* sp. (Figura 3.1) revelou agrupamentos distintos dos pontos de dados relacionados aos meios de cultivo de arroz e meio líquido de Czapeck. No caso do cultivo em arroz, os pontos se concentraram principalmente à esquerda do gráfico, mas em diferentes quadrantes, indicando uma diferenciação na composição metabólica entre o meio de cultivo branco e o meio suplementado com cátions metálicos. Por outro lado, os pontos referentes ao cultivo em meio líquido de Czapeck se agruparam predominantemente à direita do gráfico, também em diferentes quadrantes, evidenciando uma diferença na composição metabólica entre o meio branco e o meio suplementado com cátions. Além disso, os meios com a presença dos cátions metálicos, tanto no meio de arroz quanto no meio líquido Czapeck, apresentam maior semelhança entre si do que com os meios brancos. Essa diferença ocorre principalmente devido à presença de compostos carbonílicos mais complexos no meio de arroz indicando uma nutrição mais rica para os fungos, afetando diretamente na produção e na diversidade dos metabólitos secundários.

Figura 3.1: Gráfico de PCA dos óleos essenciais do *Talaromyces* sp.

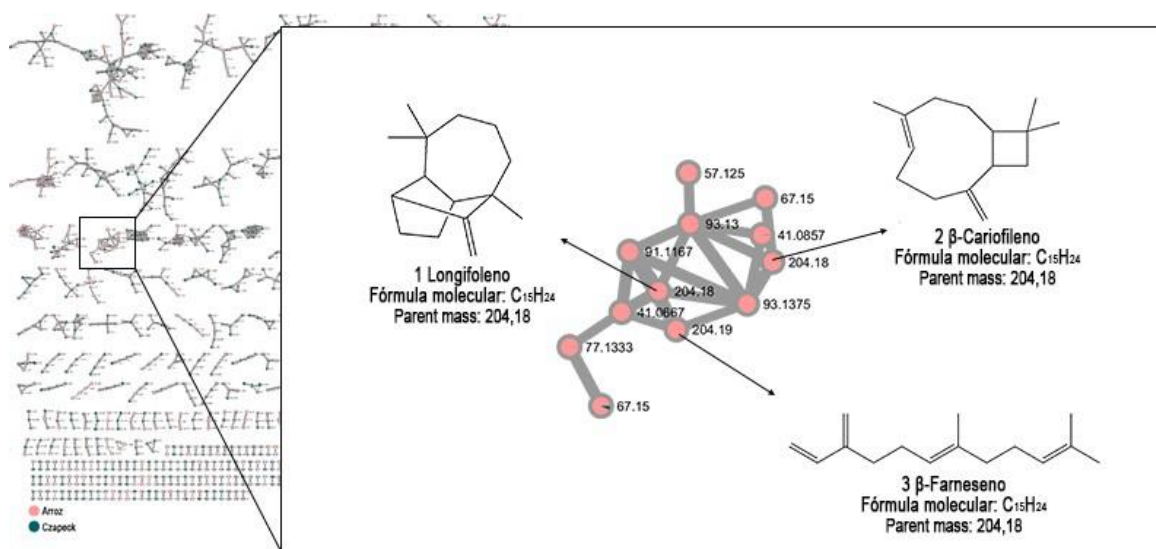


Fonte: A autora, 2025.

3.4.2 Anotações realizadas pela plataforma GNPS

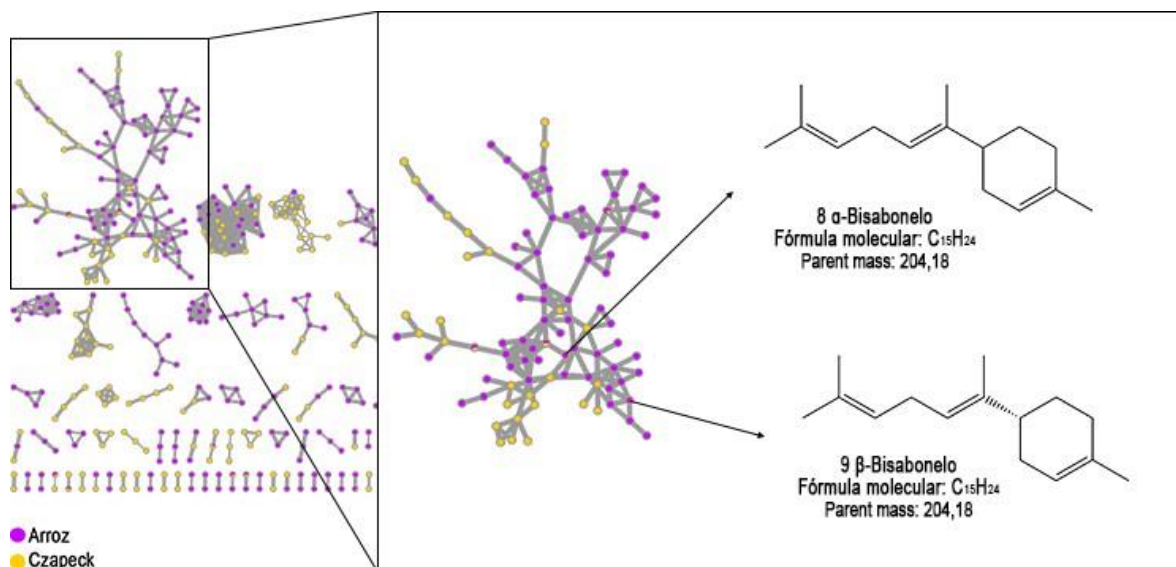
Os espectros de fragmentação por EI no modo positivo dos óleos obtidos dos diferentes cultivos do L9 (verificar o Apêndice 3 página 94) foram submetidos à plataforma GNPS para a produção das redes moleculares, com o objetivo de realizar anotações de compostos presentes nesses óleos. A rede molecular do cultivo de arroz e czapeak sem metal resultou em 1442 nodos. Ao comparar essa rede molecular com as obtida nos cultivos em Co^{2+} e Mn^{2+} , as quais eram formadas por 483 nodos e 939 nodos, respectivamente, observamos a diminuição na quantidade de nodos, o que foi ocasionado devido à presença do estresse abiótico. Além disso, em todos as redes foram observados clusters referentes aos sesquiterpenos (Figura 3.2, Figura 3.3, Figura 3.4), indicando que a presença dos metais não ocasionou mudanças expressivas na produção dessa classe metabólica. Além dos sesquiterpenos, também foram anotados clusters de ácidos graxos em todos os cultivos realizados (Figura 3.5, Figura 3.6, Figura 3.7).

Figura 3.2: Cluster de sesquiterpenos em meios de cultivo sem cátions metálicos.



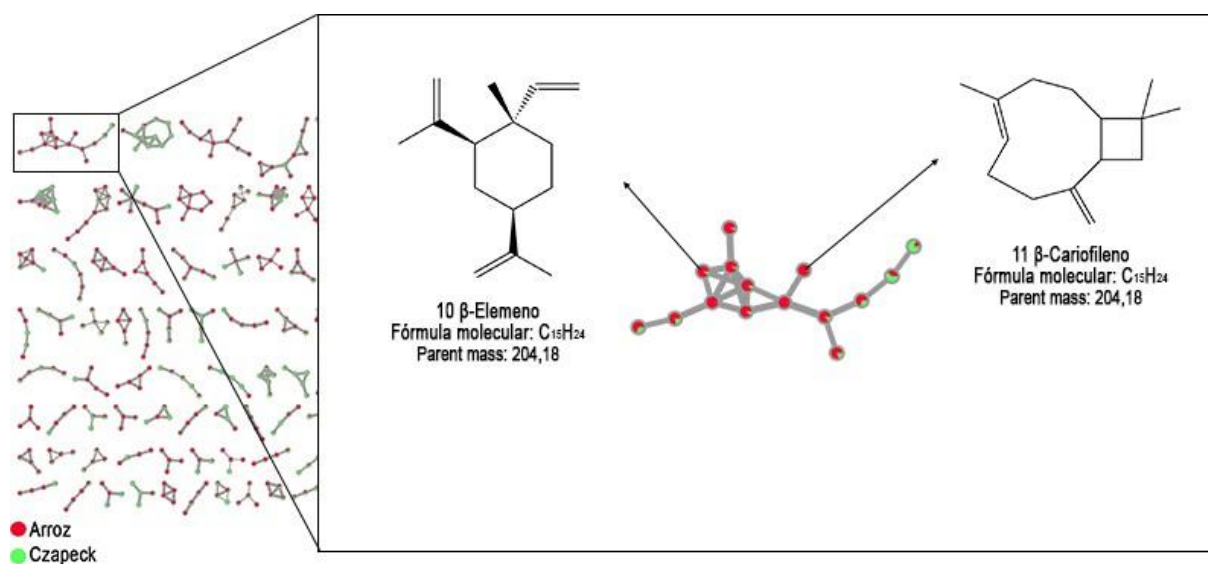
Fonte: A autora, 2025.

Figura 3.3: Cluster de sesquiterpenos em meios de cultivo na presença de Mn^{2+} .



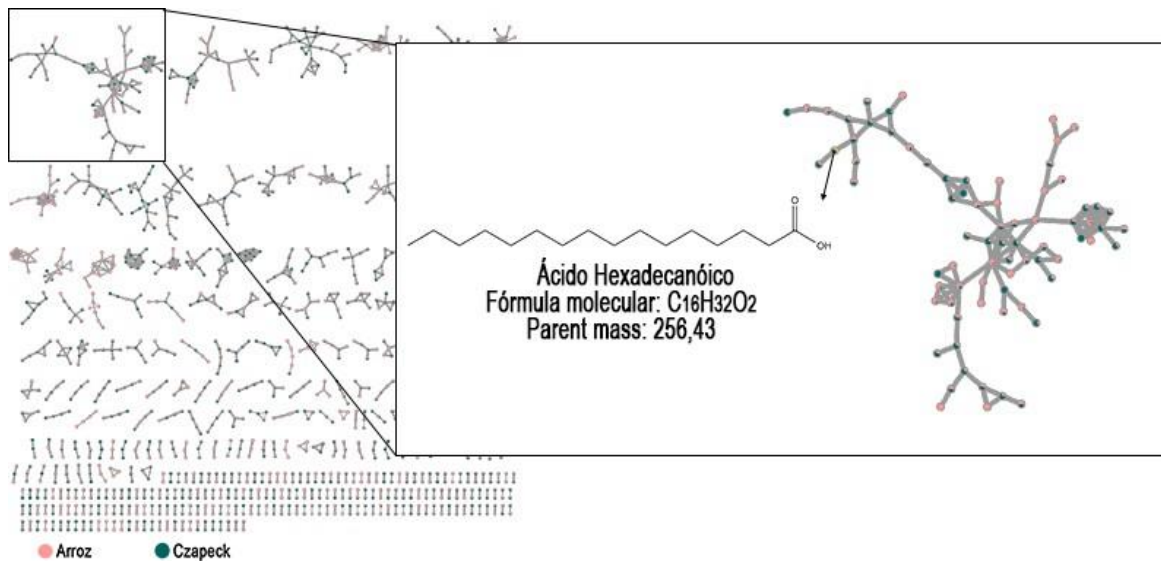
Fonte: A autora, 2025.

Figura 3.4: Cluster de sesquiterpenos em meios de cultivo na presença de Co^{2+} .



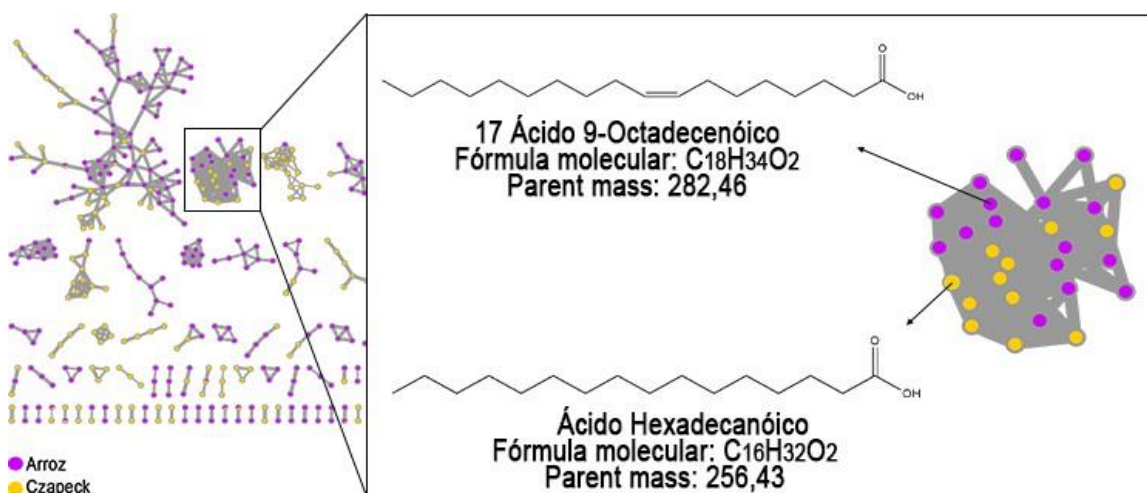
Fonte: A autora, 2025.

Figura 3.5: Cluster dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo sem metal.



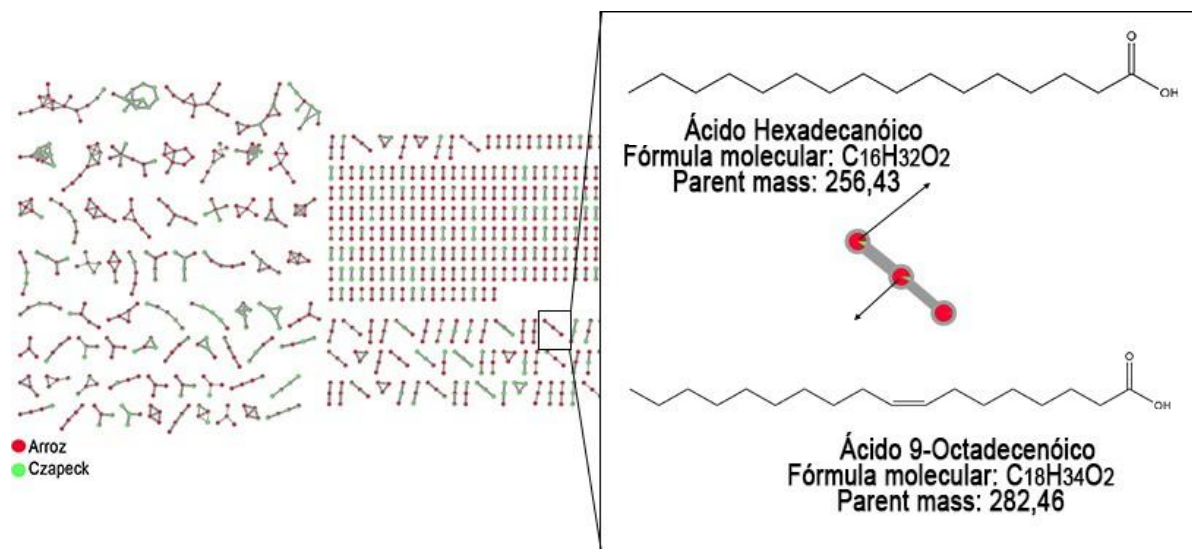
Fonte: A autora. 2025.

Figura 3.6: Cluster dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo na presença de Mn^{2+} .



Fonte: A autora, 2025.

Figura 3.7: Cluster dos ácidos graxos anotados em meios de cultivo na presença de Co^{2+} .



Fonte: A autora, 2025.

3.4.3 Caracterização da composição química volátil do *Talaromyces* sp.

Os COVs obtidos por meio da hidrodestilação dos meios de cultura apresentaram, em sua composição (Tabelas 3.3, Tabela 3.4 e Tabela 3.5), moléculas como β -cariofileno, α -himachaleno, longifoleno, β -bisaboleno, α -bergamoteno e seus derivados oxidados. Estes são sesquiterpenos frequentemente encontrados em fungos do filo Ascomycota, conhecidos por sua capacidade de produzir metabólitos secundários de grande diversidade estrutural e funcional. Além dos sesquiterpenos, a presença abundante de ácidos graxos, como ácido octadecanoico e ácido hexadecanoico, e álcoois voláteis, como 3-octanol e 1-octen-3-ol, reflete a versatilidade metabólica deste fungo (FILL, *et al.*, 2016; FIEDLER, SCHÜTZ & GEH, 2001,).

As Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 mostram diferenças nos perfis metabólicos do fungo *Talaromyces* sp. em função do meio de cultivo (Czapeck, arroz) e da presença de cátions metálicos Co^{2+} e Mn^{2+} . As alterações ocorrem tanto na diversidade de classes químicas quanto na presença de compostos específicos, indicando a influência das condições de cultivo na modulação do metabolismo secundário.

No cultivo do fungo em meio Czapeck, observa-se a predominância de álcoois e ácidos carboxílicos. O cultivo em arroz, por outro lado, resulta em uma maior

diversidade de sesquiterpenos, incluindo compostos como β -cariofileno e α -himachaleno. A presença de CoCl_2 alterou o perfil metabólico do fungo favorecendo a produção de álcoois como o 1,6-octadien-3-ol. O β -Cariofileno permaneceu presente, mas identificamos outros sesquiterpenos como o chamigreneo e α -trans-bergamatol. Com relação à presença do MnCl_2 observamos também um impacto no metabolismo do fungo, favorecendo a biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta como o ácido 3-metil-butanóico. Além disso, observamos que a produção de sesquiterpenos se manteve ativa onde identificamos o aromadendreno e β -elemeno. **Tabela 3.3:** Moléculas anotadas com o auxílio da biblioteca *NIST08* para o fungo *Talaromyces* sp.

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Czapeck	Aldeído	Hexanal	763
Czapeck	Álcool	1-Octen-3-ol	950
Czapeck	Álcool	3-Octanol	966
Arroz	Monoterpeno	Cis-Verbenol	1222
Arroz Czapeck	Sesquiterpeno	β -Cariofileno	1310
Arroz	Sesquiterpeno	α -Himachaleno	1339
Arroz	Sesquiterpeno	α -Bergamoteno	1347
Arroz	Álcool	Z,Z-3,15-Octadecadien-1-ol acetato	1370
Arroz	Sesquiterpeno	Cis-Cariofileno	1396
Arroz	Sesquiterpeno	β -Bisabonelo	1413
Arroz	Sesquiterpeno	β -Farneseno	1430
Arroz	Hidrocarboneto	Tetratriacontano	1824
Arroz Czapeck	Ácido graxo	Ácido Hexadecanóico	1891
Arroz	Ácido graxo	Ácido 9,12-Octadecadienóico-(Z,Z)	2131
Czapeck	Ácido graxo	Ácido Heptadecanóico	2136

Fonte: A autora,2025.

Tabela 3.4: Moléculas anotadas com o auxílio da biblioteca *NIST08* para o fungo *Talaromyces* sp. na presença de CoCl_2 .

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Arroz	Aldeído	2-Nonenal	926
Arroz	Álcool	1-Octen-3-ol	949
Arroz	Álcool	3-Octanol	969
Arroz	Álcool	1,6-octadien-3-ol	1070
Arroz	Acetona	2-Propanone	1099
Arroz	Sesquiterpeno	β -Cariofileno	1309
Arroz	Sesquiterpeno	Chamigreneo	1338
Arroz	Sesquiterpeno	α -Bergamoteno	1349
Arroz	Sesquiterpeno	β -Farneseno	1394
Arroz	Sesquiterpeno	α -Bisabonelo	1411
Arroz	Sesquiterpeno	α -trans-Bergamatol	1628
Arroz	Sesquiterpeno	β -Bisabonelo	1413
Arroz	Sesquiterpeno	α -trans-Bergamatol	1621
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Hexadecanóico	1867
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 9-Octadecanóico	1861

Fonte: A autora, 2025.

Tabela 3.5: Moléculas anotadas com o auxílio da biblioteca *NIST08* para o fungo *Talaromyces* sp. na presença de $MnCl_2$.

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Czapeck	Ácido carboxílico	4-Hexen-1-ol	724
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Propanóico	820
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Isobutárico	825
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Butanóico	846
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Heptanóico	856
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 3-Metil-Butanóico	865
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 2-Metil-Butanóico	892
Arroz	Álcool	3-Octanol	970
Arroz	Cetona	3-Heptanone	955
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Pentanóico	959
Arroz	Aldeído	2-Nonanal	1073
Arroz	Cetona	2-Propanone	1101
Arroz	Hidrocarboneto	Z,Z,Z-4,6,9-Nonadecatriene	1232
Arroz	Sesquiterpeno	Beta-Cariofileno	1309
Arroz	Sesquiterpeno	Aromadendreno	1337
Arroz	Sesquiterpeno	β -Elemeno	1352
Arroz	Sesquiterpeno	α -Bergamoteno	1355
Arroz	Acetona	2-Nonadecanone	1800
Czapeck	Ácido Carboxílico	Ácido 9-Octadecanóico	1840
Arroz e Czapeck	Ácido Carboxílico	Ácido Hexadecanóico	1873

Fonte: A autora, 2025.

3.5 Conclusão parcial: estudo dos COV's

Os estudos realizados com os óleos essenciais do fungo *Talaromyces* sp., cultivado em meio líquido Czapeck e meio sólido de arroz, revelaram uma

composição química diversificada, sendo identificados compostos em ambos os meios de cultivo, como β -cariofileno, β -elemeno, α e β -bisaboleno, longiofileno, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, entre outros. Entretanto, o meio sólido de arroz destacou-se por proporcionar uma maior variedade de metabólitos. As alterações foram observadas tanto na diversidade de classes químicas quanto na presença de compostos específicos, indicando a influência das condições de cultivo na modulação do metabolismo secundário. Essa diferença pode ser atribuída à composição mais rica e complexa do arroz, que fornece uma matriz carbonada diversificada e nutrientes essenciais que favorecem a expressão de vias metabólicas específicas nos fungos.

O cultivo em meios com e sem a adição de metais revelou um impacto significativo na produção metabólica de *Talaromyces sp.*. Nos meios sem metais, foi observado um aumento na biossíntese de sesquiterpenos e ácidos graxos. Por outro lado, nos cultivos realizados na presença de cobalto, houve uma redução no crescimento micelial, particularmente no meio líquido de Czapeck, indicando uma possível toxicidade ou limitação metabólica imposta por este cátion. Já na presença de manganês, observou-se um aumento expressivo na produção de pigmento vermelho, sugerindo que esse elemento estimula vias biossintéticas específicas associadas à produção de pigmentos. Esse comportamento reforça a capacidade adaptativa do fungo, que ajusta seu metabolismo em resposta às condições do ambiente, priorizando a produção de moléculas com funções adaptativas para otimizar a sobrevivência e interação com o meio.

CAPÍTULO 4

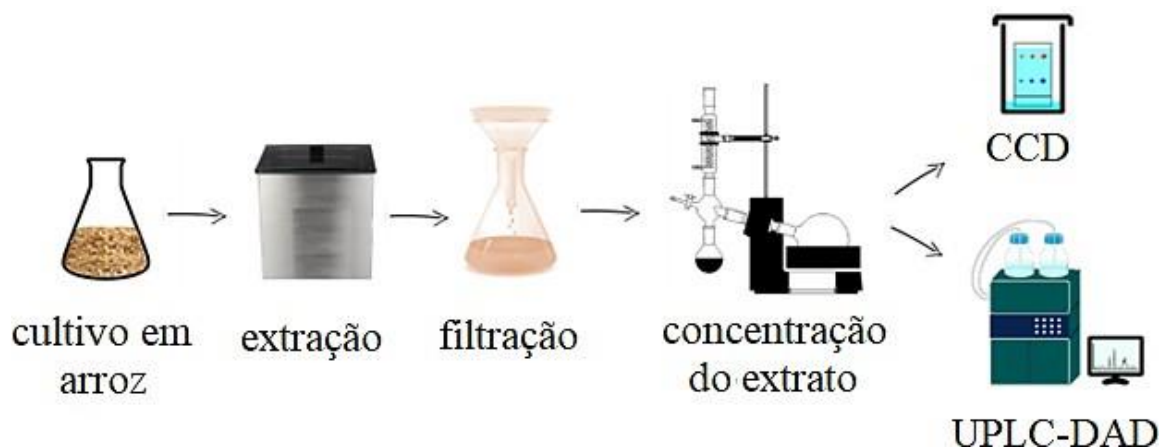
4 CULTIVO DO FUNGO *Talaromyces sp.* EM ARROZ

4.1 Cultivo em escala analítica na presença e ausência de metais

O cultivo do fungo *Talaromyces sp.* em arroz foi realizado utilizando 9 frascos nas seguintes condições: 3 erlenmeyers contendo 50 g de arroz parboilizado (Uncle bens) e 32 mL de água destilada; 3 erlenmeyers contendo 50 g de arroz parboilizado e 32 mL da solução de cloreto de cobalto II 30 mmol; 3 erlenmeyers contendo 50 g de arroz parboilizado e 32 mL da solução de cloreto de manganês a 250 mmol. Todos os meios de cultivo preparados foram autoclavados duas vezes, em dia diferentes, por 15 minutos à temperatura constante de 121°C e 1 atm de pressão. Para o inóculo do fungo, foi preparado uma suspensão de esporos (10^8 UFC) em água destilada estéril. Foi adicionado 1 mL da suspensão em cada frasco.

Após 15 dias de cultivo em temperatura constante em 25°C e modo estático, o crescimento do fungo foi interrompido adicionando 100 mL de etanol P.A. em cada frasco de cultivo (controle e experimento) e submetido ao banho ultrassônico durante 20 minutos para a extração dos metabolitos. O material obtido foi filtrado e o extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo o extrato etanólico (Figura 4.1).

Figura 4.1: Procedimento de obtenção do extrato bruto.



Fonte: A autora, 2025.

Posteriormente foram realizadas análises cromatográficas empregando a cromatografia líquida ultraeficiente acoplada a detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD) de todos os extratos utilizando uma coluna analítica C18 de 1.7 μm , modo reverso de eluição e gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O durante

12min. Para estas análises, foi usada a vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de amostra de 5 µL.

A análise por HRESIMS desses extratos foi realizada em um sistema Shimadzu Nexera X2 acoplado com espectrometria de massa de alta resolução (Q-TOF Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha). Foi empregada uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm; Waters, EUA), com forno de temperatura constante regulado para 40 °C. A fase móvel consistiu de água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B), com gradiente de eluição iniciando em 5% de B de 0 a 1 min, aumentando para 50% de B de 1 a 10 min, atingindo 98 % B de 12 a 16 min e manutenção de 5% B de 16 a 20 min.

Os dados foram coletados na faixa m/z de 50 a 1500 com taxa de aquisição de 5 Hz. Os cinco íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS). As energias de dissociação induzida por colisão (CID) variaram de 15 a 40 eV para informações de fragmentação.

Os espectros de massas obtidos foram convertidos para a extensão MZxml utilizando o software *DataAnalysis* versão 4.3 e submetidos na plataforma de bioinformática *MetaboAnalyst*. Para submeter esses espectros ao *GNPS*, eles foram processados pelo software *MzMine* (versão 2.53) e submetidos na plataforma aplicando 2.0 Da para a tolerância de massa do íon fragmento e 0.5 Da para o limiar de pontuação. Para a organização e manutenção das redes moleculares geradas, foi usado o software *Cytoscape* versão 3.10.0.

4.2 Cultivo em escala preparativa

A partir das condições ótimas de cultivo, preestabelecidas pelos testes analíticos, foi realizado o cultivo em escala preparativa utilizando 3 kg de arroz sem a adição de metais. O cultivo desenvolveu-se em 30 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 g de meio sólido de arroz parboilizado cada e 64 mL de água destilada, seguido de esterilização por autoclave durante 15 min e pressão de 1 atm. O fungo foi inoculado via suspensão de esporos (10⁸ UFC), onde adicionamos 1000 µL dessa suspensão. Após 45 dias de crescimento, realizamos a extração dos metabólitos usando etanol e acetato de etila que originou os extratos AcOEt e EtOH.

Os extratos obtidos foram combinados e submetidos a um processo de fracionamento por meio de cromatografia em coluna a vácuo, utilizando sílica gel como fase estacionária (Ø = 5,0 cm, h = 30 cm; 410 g de sílica). A eluição foi realizada

empregando um gradiente de fase móvel composto por hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), utilizando 62,8456 g de amostra como material de partida. As frações resultantes foram coletadas e separadas de acordo com as proporções específicas da fase móvel empregadas em cada etapa do gradiente, as quais estão detalhadamente descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Frações obtidas a partir do extrato bruto.

Sistemas de Eluente	Proporção	Códigos	Massa (mg)
Hex:AcoEt*	95:5 (1% AF)	L9-AA	266,8
Hex:AcoEt	70:30	L9-AB	2807,4
AcoEt	100	L9-AC	4826,0
AcoEt:MeOH	90:10	L9-AD	9032,1
AcoEt:MeOH	70:30	L9-AE	4041,7
MeOH	100	L9-AF	25753,8

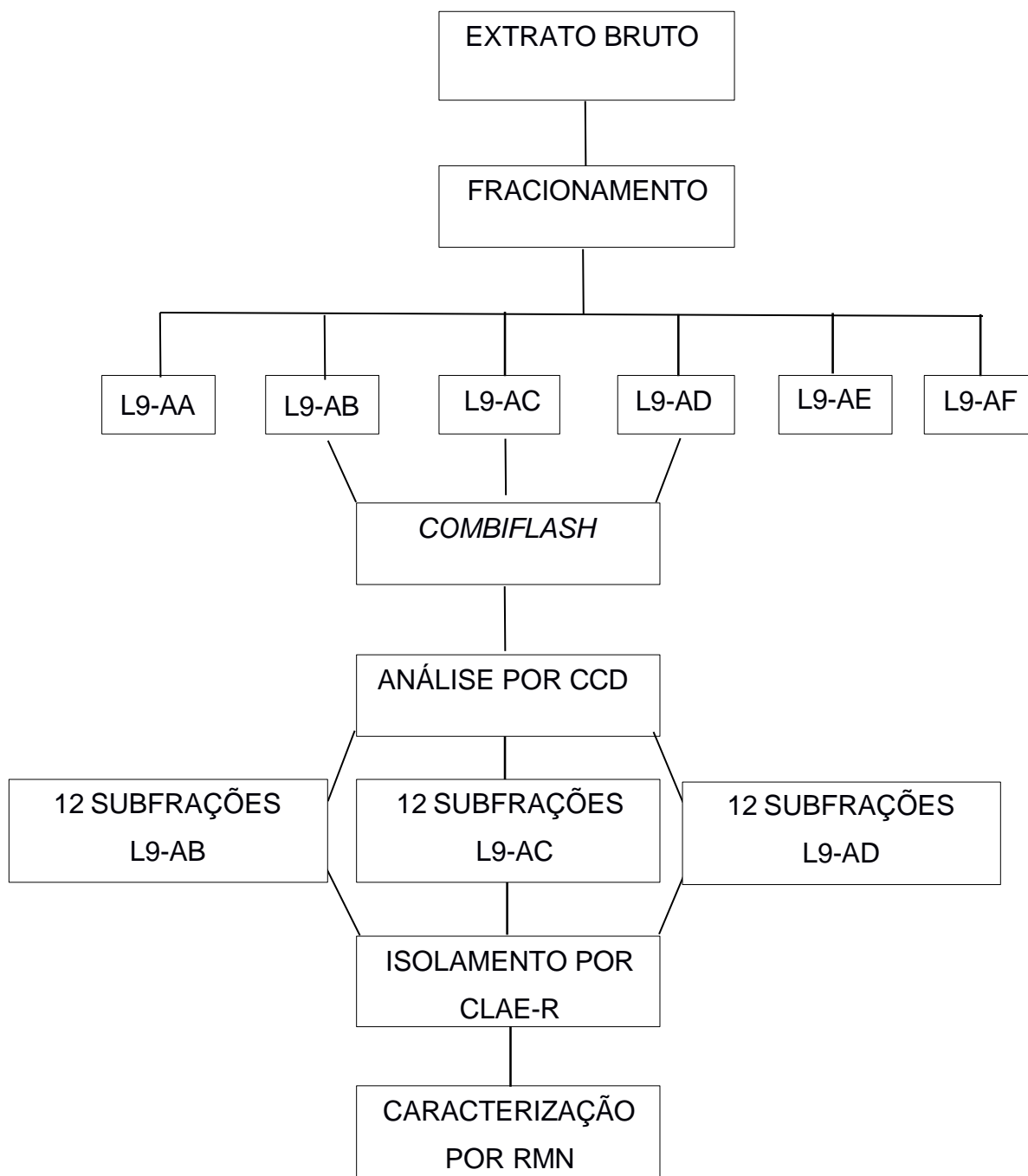
*ácido fórmico

Fonte: A autora, 2025.

A partir das frações obtidas, realizamos uma outra etapa de purificação desta vez empregando a Cromatografia Líquida de Média Pressão (*Combiflash*) da TELEDYNE-ISCO *Combiflash* RF 200 UV-vis. A coluna utilizada tinha como fase estacionária sílica comum *RediSep* usando 80 g para as frações L9-AB e L9-AC, e 330 g para a fração L9-AD. Como fase móvel, empregamos um sistema binário composto por hexano e clorofórmio (1:1) na bomba A, e metanol na bomba B. O fluxo foi ajustado para 15 mL/min, um valor adequado para manter a eficiência da separação e reduzir o tempo de corrida sem comprometer a integridade dos compostos purificados. A detecção foi realizada em dois comprimentos de onda, 220 nm e 280 nm,

Após a purificação por *Combiflash*, todas as amostras coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Com base nos perfis cromatográficos observados, as subfrações semelhantes foram reunidas, consolidando os compostos em grupos homogêneos para facilitar etapas subsequentes de análise. Ao final, obtivemos 12 subfrações para cada fração purificada por *Combiflash*,

Figura 4.2: Fluxograma do procedimento de purificação.



Fonte: A autora, 2025.

4.3 Isolamento e caracterização química das substâncias

As análises cromatográficas foram realizadas por CLUE-DAD usando um equipamento Acquity UPLC da Waters®, empregada uma coluna analítica C18 (1,7 μm) no modo de eluição reversa, utilizando um gradiente linear exploratório de 15% a 100% ACN:H₂O ao longo de 12 minutos. As condições operacionais incluíram uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e um volume de injeção de 5 μL de amostra.

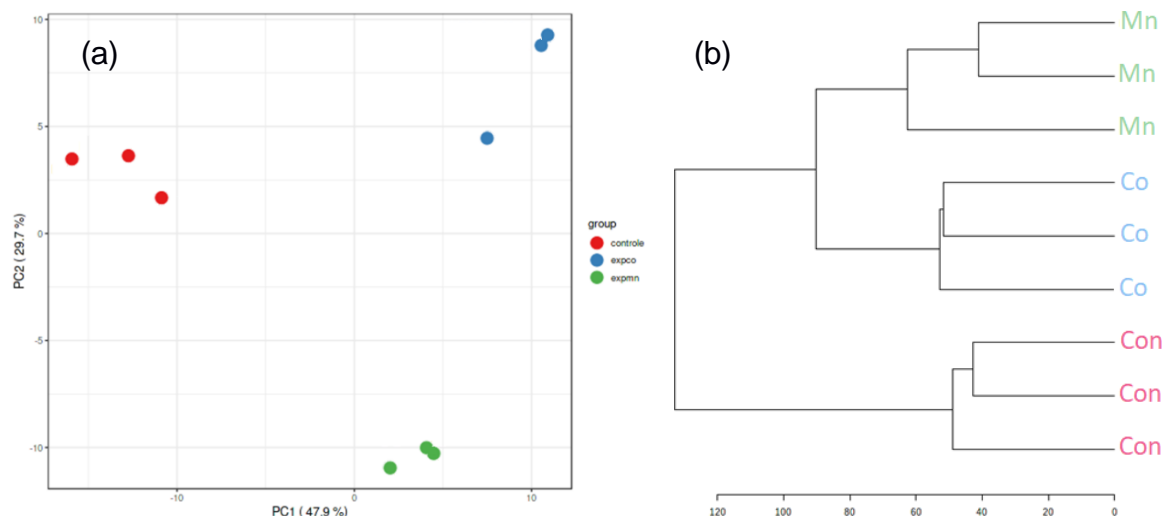
A purificação dos metabólitos secundários presentes nas frações L9-AB, L9-AC e L9-AD foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo reciclante. Para isso, foi utilizada uma fase móvel composta por metanol e diclorometano (MeOH:DCM, 1:1), grau HPLC, no modo isocrático. As análises foram conduzidas com um fluxo constante de 3 mL.min⁻¹ e monitoramento dos compostos em comprimentos de onda de 225 nm e 271 nm. Este procedimento possibilitou a separação eficiente dos metabólitos secundários, garantindo maior pureza para análises subsequentes.

4.4 Resultados

4.4.1 Análise estatística e anotação de metabolitos via plataforma *GNPS*

O gráfico bidimensional de pontuação PC1 x PC2 e o dendrograma (Figura 4.3a e Figura 4.3b) mostraram agrupamentos distintos quando comparamos os diferentes cultivos realizados em arroz. Para o cultivo em arroz sem metal (branco), os pontos se concentraram principalmente à esquerda do gráfico, sugerindo uma composição metabólica distinta em relação ao meio suplementado com cátions metálicos. Em contraste, os pontos referentes ao cultivo na presença dos cátions se agruparam à direita, mas em diferentes quadrantes. Isso indica uma variação na composição metabólica entre os diferentes meios de arroz suplementados com cátions. O dendrograma (Figura 4.3b) complementa os resultados obtidos pela análise de PCA, confirmando a formação de três grupos de amostras, com a divisão desses grupos em dois subgrupos, evidenciando uma diferenciação metabólica entre as culturas crescidas na presença e na ausência de metais.

Figura 4.3: Gráficos de PCA e dendrograma do cultivo em arroz na presença e ausência de metais.

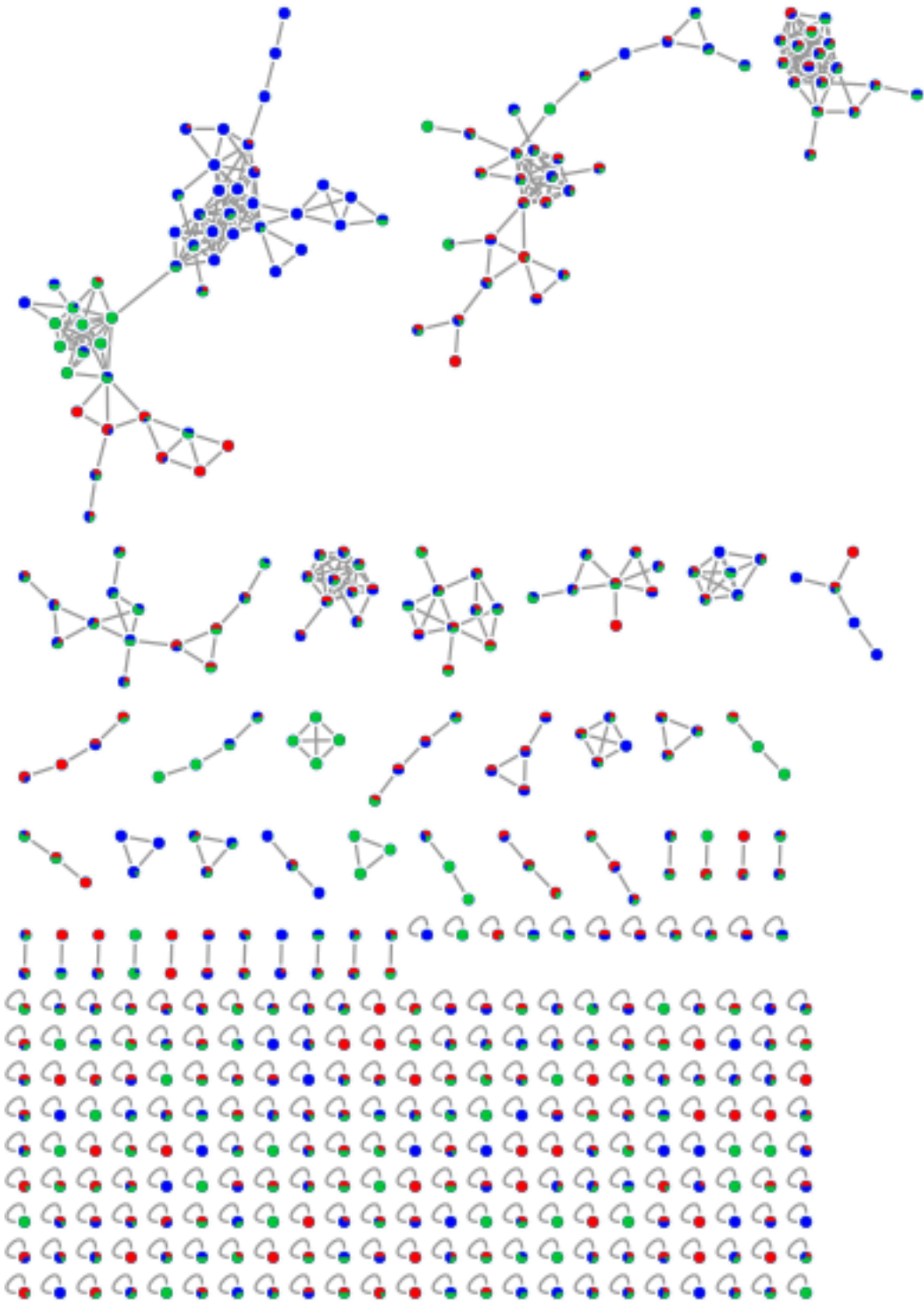


Fonte: A autora, 2025.

A partir dos dados de LC-MS¹ dos extratos, foi construída uma rede molecular dos três cultivos na plataforma GNPS. Essa rede molecular (Figura 4.4) era composta por 1132 nodos, permitindo a anotação e visualização de classes metabólicas. O cluster molecular da Figura 4.5 mostrou oito nodos, sendo que dois metabolitos foram anotados com o auxílio do banco de dados da plataforma, dentro de uma faixa de 5 ppm., os quais foram definidos como farnesol (C₁₅H₂₆O) [M+H]⁺ m/z 223.20 calculado [M+H]⁺ 223.20, Δ 1.34; 12-hidroxfarnesol (C₁₅H₂₆O₂) [M+H]⁺ m/z 239.20 calculado 239.20 Δ 0.83.

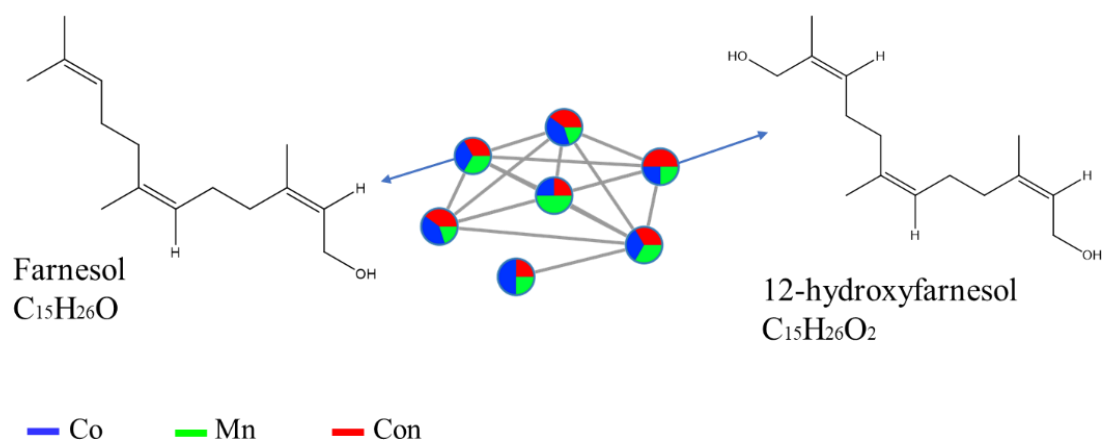
Além dos sesquiterpenos, foram anotados nodos moleculares (Figura 4.6) correspondentes aos meroterpenoides que compõe o metabolismo de *Talaromyces* sp. como austina (1), dehidroaustina (2), acetoxidehidroaustina (3) austinolideo (4), austinoneol (5), neoaustina (6) e preaustinoide A3 (7). Os meroterpenoides 4, 5 e 7 foram isolados pela primeira vez (GERIS et al. 2003; FILL et al. 2007), do fungo e agora são relatados no fungo antártico *Talaromyces* sp. A Tabela 4.2 apresenta os valores de massa exata experimental, valores de massa molecular teórica e o erro em partes por milhão (ppm) para os meroterpenoides observados.

Figura 4.4: Rede molecular do cultivo realizado em arroz e na presença de cobalto e manganês



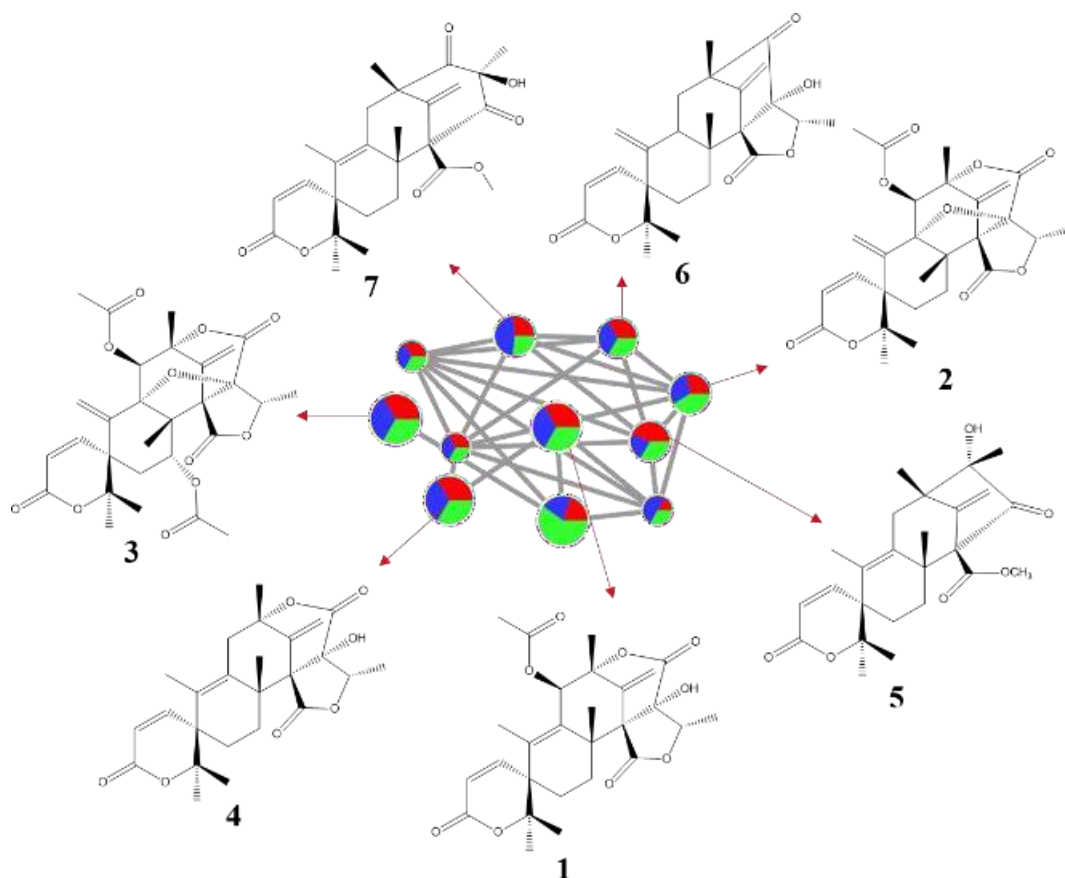
Fonte: A autora, 2025.

Figura 4.5: Cluster molecular dos sesquiterpenos anotados.



Fonte: A autora,2025.

Figura 4.6: Cluster molecular dos meroterpenos anotados.



Fonte: A autora,2025.

Tabela 4.2: Meroterpenos anotados na plataforma GNPS.

Meroterpenoide	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ exp.	[M+H] ⁺ calc.	Δppm
1	C ₂₇ H ₃₂ O ₉ ⁺	501.21	501.21	2.19
2	C ₂₇ H ₃₀ O ₉ ⁺	499.19	499.19	1.20
3	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₁ ⁺	557.20	557.20	2.33
4	C ₂₅ H ₃₀ O ₇ ⁺	443.21	443.21	2.03
5	C ₂₄ H ₃₀ O ₆ ⁺	415.21	415.21	1.68
6	C ₂₅ H ₃₀ O ₆ ⁺	427.21	427.21	1.64
7	C ₂₆ H ₃₂ O ₇ ⁺	457.22	457.22	0.65

Fonte: A autora, 2025.

4.4.2 Isolamento e caracterização química

No estudo químico realizado sobre a fração L9, foi possível identificar e isolar uma diversidade de substâncias pertencentes a distintas classes químicas, incluindo meroterpenoides, esteroides, um poliol e um ácido graxo. As quantidades isoladas de cada substância, bem como os detalhes das análises espectroscópicas que fundamentaram sua identificação, serão abordados nas seções subsequentes, oferecendo uma descrição aprofundada das características estruturais e das propriedades de cada composto identificado.

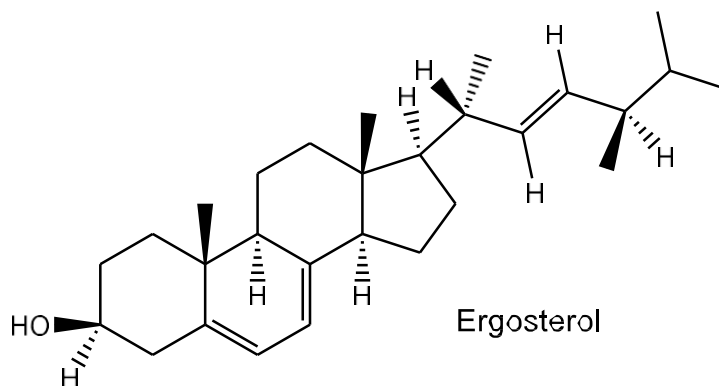
4.4.2.1 Isolamento e identificação dos esteroides da fração L9-AB

Após o processo de purificação utilizando o sistema *Combiflash*, a subfração L9-AB-3 foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em modo reciclante (CLAE-R). O procedimento foi realizado ao longo de 350 minutos, distribuídos em 6 ciclos de eluição. A substância majoritária foi coletada no intervalo correspondente a 290 minutos. Este processo resultou no isolamento de 57 mg do composto codificado como S1, posteriormente identificado como ergosterol.

A substância S1 foi isolada na forma de um sólido branco cristalino solúvel em diclorometano e clorofórmio. No seu espectro de RMN 1H podemos observar sinais em δ 0,63 (s), δ 0,82 (d, J= 6,8 Hz), δ 0,84 (d, J= 6,8 Hz), δ 0,92 (d, J= 6,8 Hz), δ 0,95 (s) e 1,04 (d, J= 6,7 Hz). Além disso, observamos também o sinal referente aos hidrogênios oximetínicos em δ 3,63 (m) e os sinais dos hidrogênios ligados ao carbono sp² em δ 5,20 (m), δ 5,38 (m) e δ 5,56 (m).

De acordo com o padrão espectral observado no RMN 1H (Figura 4.7) é correto afirmar que este espectro é típico de uma substância da classe dos esteroides. Com os valores obtidos e com dados de literatura, foi possível confirmar que a substância se tratava do ergosterol.

Figura 4.7: Estrutura química do ergosterol (S1).

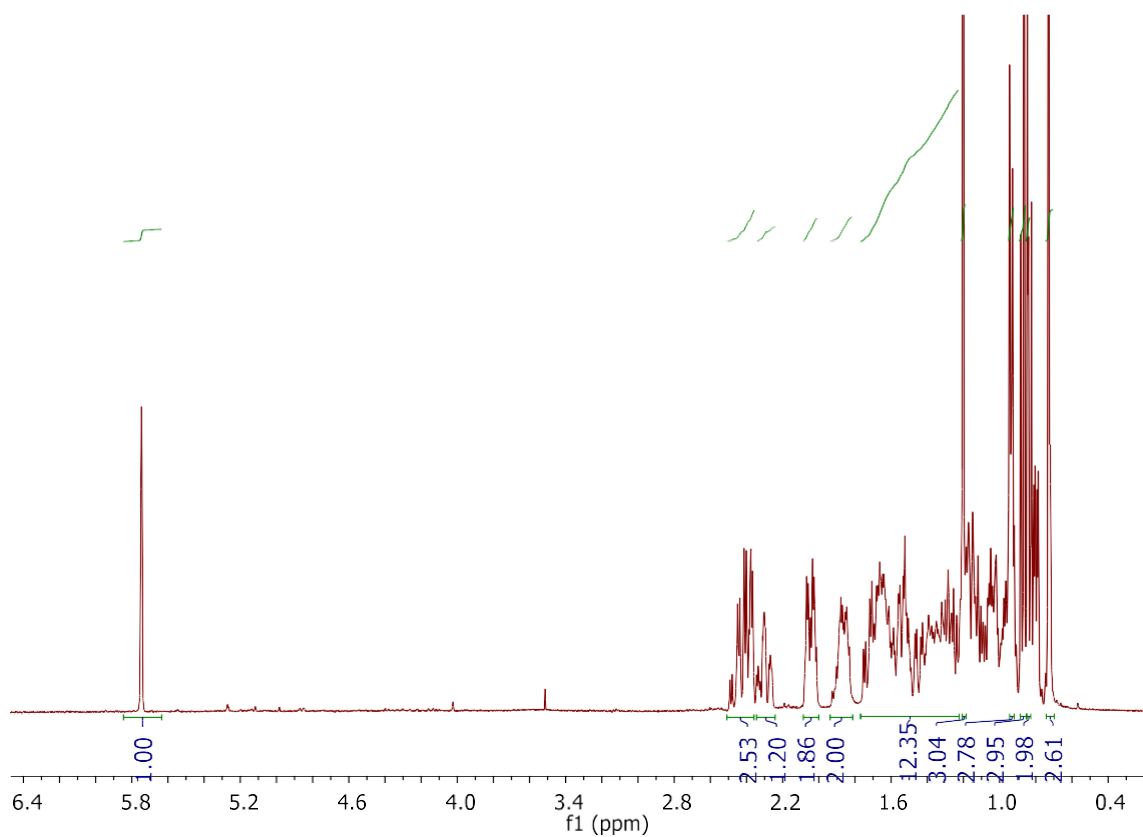


Fonte: A autora, 2025.

A substância S2 (26,8 mg) foi isolada na forma de um sólido amarelo amorfo solúvel em diclorometano e clorofórmio. Ao analisarmos o espectro de RMN 1H (Figura 4.8) observamos a presença de um conjunto de deslocamentos químicos de alta multiplicidade semelhantes ao esqueleto terpênico, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, em δ 0,63 - 2,40. Além disso foi possível observar a presença de cinco grupamentos de metila, pela presença de dois singletos em δ 0,73 e δ 1,20 e de dubletos em δ 0,84, δ 0,87 e δ 0,94. Ainda neste mesmo espectro, observamos um singlete em δ 5,70 referente a presença de hidrogênio de dupla ligação.

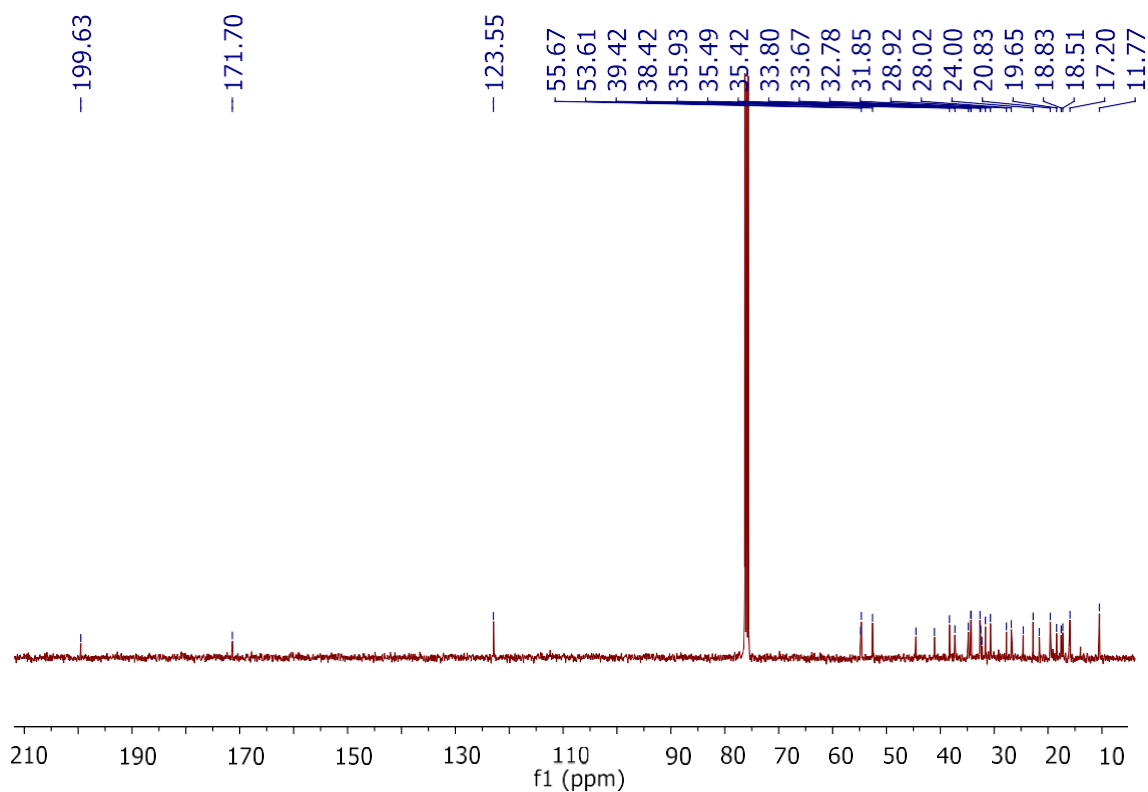
No espectro de RMN 13C (Figura 4.9) notamos sinais referentes aos carbonos de grupos metilas com deslocamentos químicos em 11,77 (C-18), 20,83 (C-26), 18,51 (C-21), 17,20 (C-19). Neste espectro também observamos de um carbono em 171,70 (C-5), o qual é atribuído ao carbono β de uma dupla conjugada à carbonila em núcleos esteroidais (FEITOSA, BEZERRA, 2007). Ao compararmos esses dados espectrais com dados da literatura (LANG, 2006; LIRA, 2013) foi possível identificar a substância S2 como sendo o esteroide colest-4-en-3-ona (Figura 4.10).

Figura 4.8: Espectro de RMN 1H da colest-4-en-3-ona em CDCl₃.



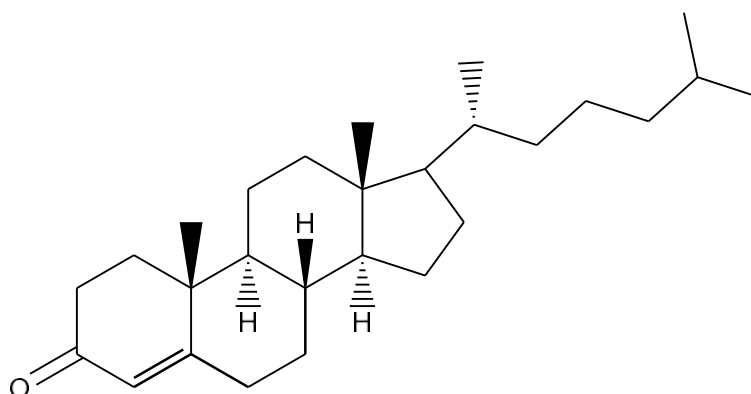
Fonte: A autora, 2025.

Figura 4.9: Espectro de RMN 13C da colest-4-em-3-ona em CDCl₃.



Fonte: A autora, 2025.

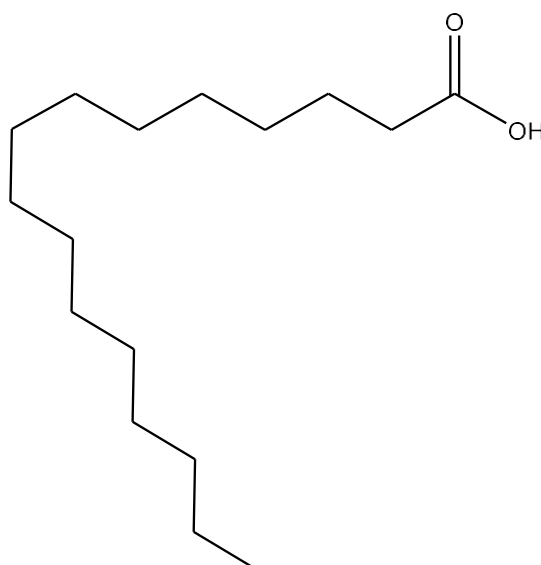
Figura 4.10: Estrutura química do esteroide colest-4-en-3-ona (S2).



Fonte: A autora, 2025.

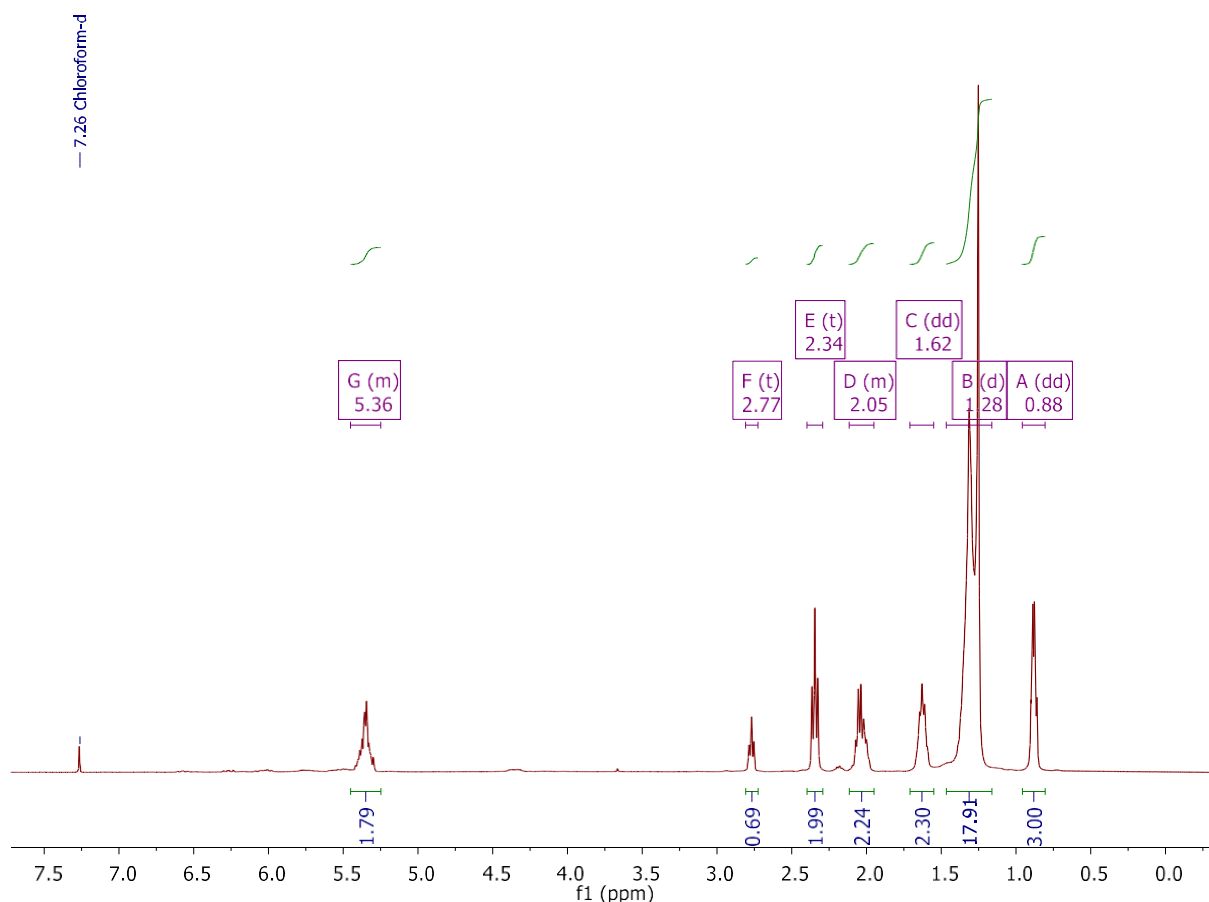
A substância S3 (Figura 4.11) foi isolada na forma de um sólido branco cristalino, solúvel em diclorometano e clorofórmio. A análise espectroscópica de RMN ¹H (Figura 4.12) revelou um padrão espectral típico de ácidos graxos, com sinais característicos para grupos metileno, que são comuns na estrutura dos ácidos graxos saturados. Esses sinais indicam uma cadeia hidrocarbonada longa, característica dos ácidos graxos saturados. Para uma caracterização mais precisa da substância, a amostra foi analisada por CG-EM, e com o auxílio da biblioteca de dados foi possível determiná-la como sendo o ácido hexadecanoico, também conhecido como ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂),

Figura 4.11: Estrutura química do ácido hexadecanoico (S3).



Fonte: A autora, 2025.

Figura 4.12: Espectro de RMN 1H da substância S3.



Fonte: A autora, 2025.

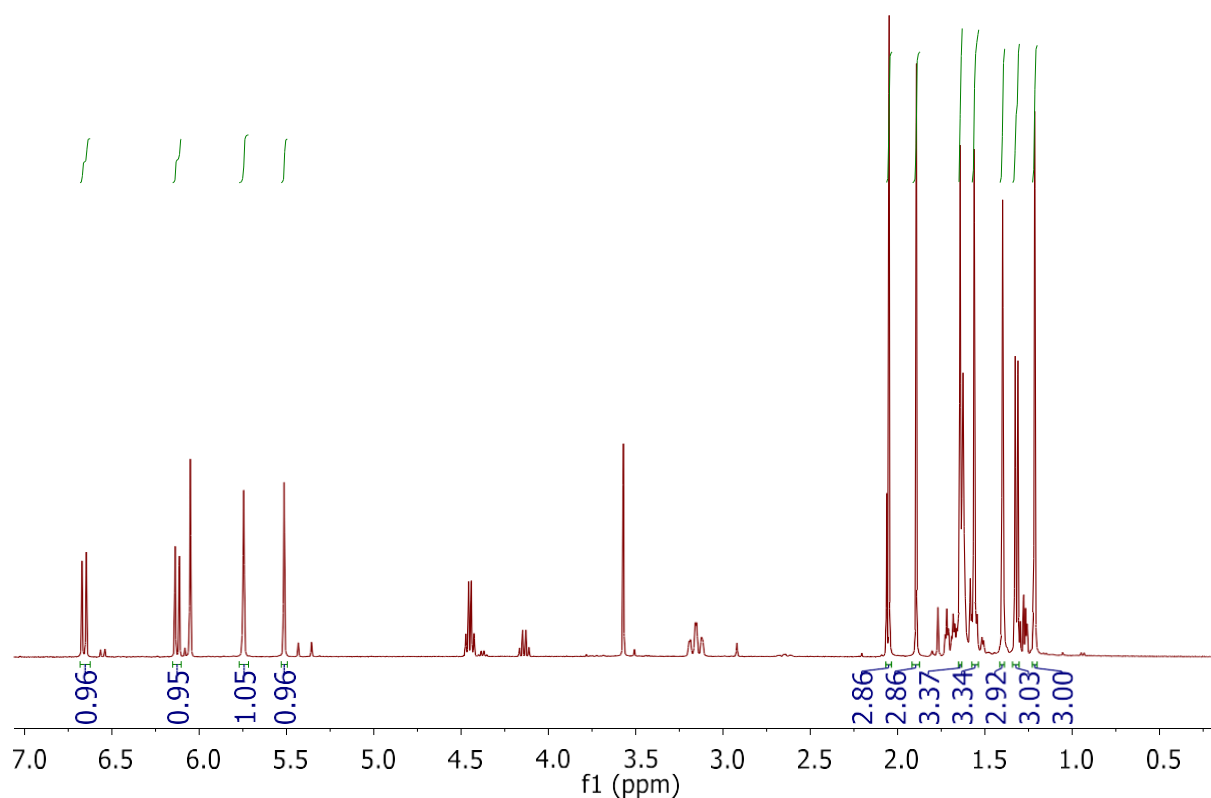
4.4.2.2 Isolamento dos meroterpenos na fração L9-AC e L9-AD

O perfil cromatográfico do extrato bruto apresentou bandas mais intensas observadas na faixa de absorção de 230 a 245 nm. Para verificar quais metabólitos estariam presentes nas condições relatadas, utilizamos a avaliação por espectrometria de massas. O modo de ionização utilizado foi o modo positivo, uma vez que esse modo garante maior sensibilidade para os dados analisados. Valores foram observados na faixa de 400 a 600 m/z. Vale ressaltar que três metabólitos secundários da classe de meroterpenoides foram isolados, sendo identificados como austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina.

A austina (S4, 37,9 mg), foi obtido como um sólido cristalino branco, solúvel em CHCl_3 , com absorção máxima em 243 nm. HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 501.2108, calc. m/z 501.2119, Δ 2.1946 ppm e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_9$. O espectro de RMN 1H (Figura 4.13) em CDCl_3 mostrou a presença de sinais na forma

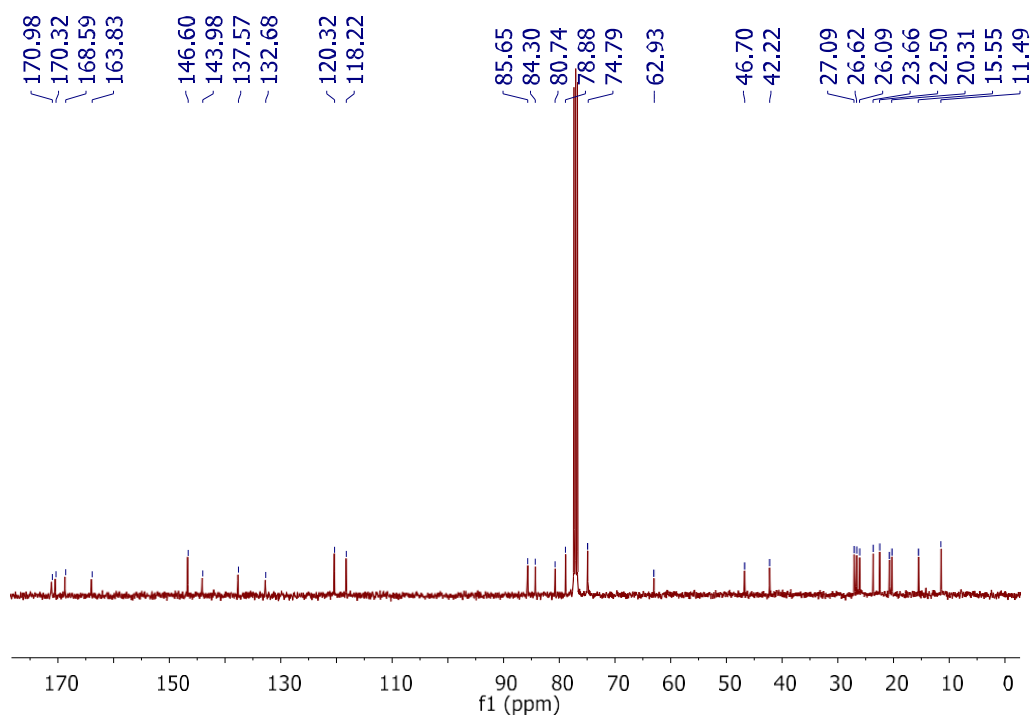
de singletos, referentes a grupos metil, com deslocamento químico em δ 1,19 (3H-12), 1,38 (3H-15), 1,54 (3H-14), 1,62 (3H-9'), e um grupo metil na forma de um duplete em δ 1,30 (H-10'). Os sinais de hidrogênio vinílicos exocíclicos foram encontrados em δ 5,72 (H-1' β) e 5,49 (H-1' α), e, portanto, detectamos os sinais referentes aos hidrogênios da anel γ -lactônico α,β -insaturado em δ 6,63 (H-1) e 6,10 (H-2). Ao analisar o espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.14), notamos sinais referentes ao grupo carbonila com deslocamento químico em δ 171,11 (C-8'), 170,45 (C-4'), 168,71 (CH₃CO-11), 163,96 (C-3). Além disso, também observamos a presença de seis carbonos olefínicos em δ 118,34 (C-1'), 120,45 (C-2), 132,81 (C-9), 137,70 (C-2'), 144,11 (C-10) e 146,72 (C-1). Os valores obtidos por RMN foram comparados com a literatura (CHEXAL *et al.* 1976), mostrando boa concordância, sendo fundamental para a definição estrutural da austina (Figura 4.15).

Figura 4.13: Espectro de RMN de ^1H da austina em CDCl_3 .



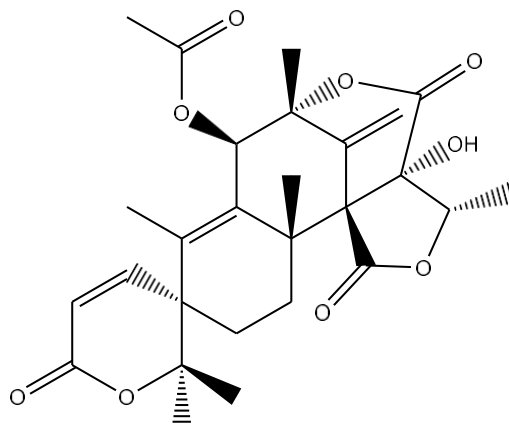
Fonte: A autora, 2025.

Figura 4.14: Espectro de RMN de ^{13}C da austina em CDCl_3



Fonte: A autora, 2025.

Figura 4.15: Estrutura química do meroterpeno austina (S4).

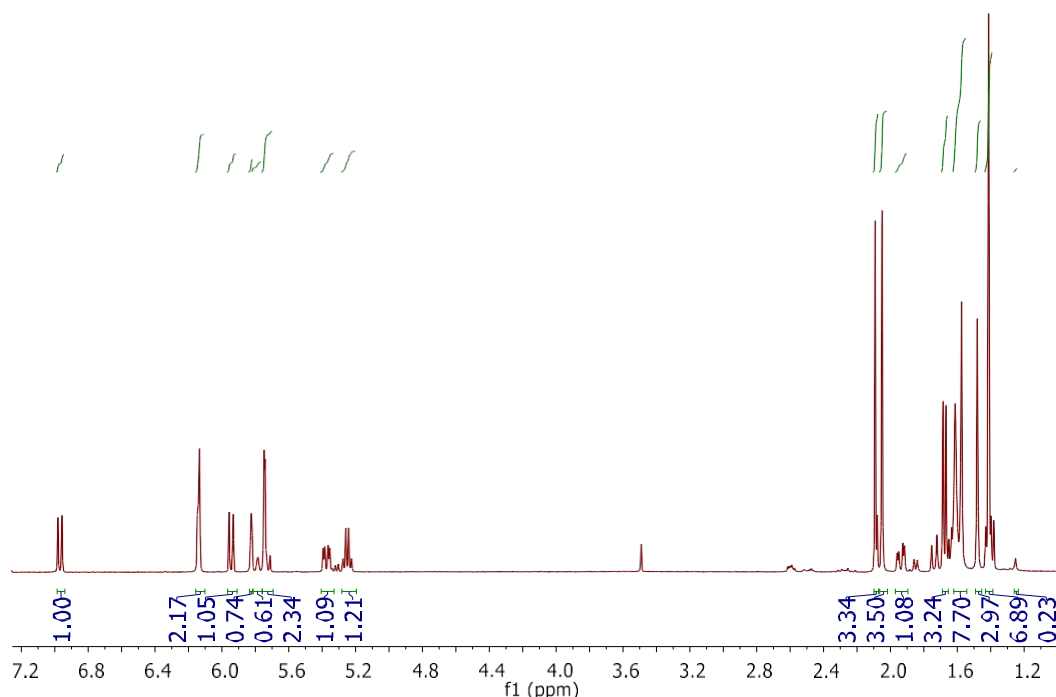


Fonte: A autora, 2025.

O meroterpeno acetoxidetraidina (S5, 27.2 mg) foi isolado como um sólido branco amorfo através de CLAE-R, a partir das subfrações L9-AD-7 e L9-AC-3, solúvel em diclorometano, absorção máxima em 240 nm, com fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$, localizado no espectro massas por ionização por *electrospray* sob a forma do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 557.20. Ao analisar o espectro de RMN ^1H (Figura 4.16) podemos observar a presença de quatro sinais singletos referentes as metilas em δ 1,38 (s, 3H-15), 1,48 (s, 3H-14), 1,41 (s, 3H-12), 1,61 (s, 3H-9', $J = 15.1$ Hz) e um duplete em δ 1,67 (d, 3H-10', $J = 6.9$ Hz). Adicionalmente foram observados os sinais de

hidrogênios vinílicos de metilenos exocíclicos em δ 5,80 (d, 1H-13 α , J = 2.1 Hz), 6,13 (d, 1H-13 β , J = 2.1 Hz), 5.71 (1H-1' α), 6.13 (1H-1' β). Além disso observamos sinais de hidrogênios em δ 6.96 (d, 1H-1, J = 9.8 Hz) e δ 5.94 (d, 1H-2, J = 9.8 Hz) referentes a δ -lactona α,β -insaturada.

Figura 4.16: Espectro de RMN ^1H da acetoxidehidroaustina (S5).



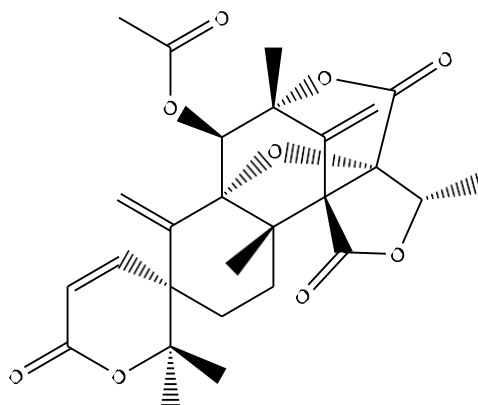
Fonte: A autora, 2025.

A substância S6, dehidroaustina (57,4mg), de fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_9$, foi isolada da subfração L9AD-7 via CLAE-R na forma de um sólido branco cristalino, solúvel em diclorometano, com absorção máxima em 240 nm. A análise por espectrometria de massas por ionização por *electrospray* permitiu localizar o m/z 499.1956, com Δ 1.20 ppm.

No espectro de RMN ^1H são encontrados os deslocamentos químicos referentes às metilas em δ 1.31 (3H-12), 1.43 (3H-14), 1.50 (3H-15) e 1.57 (3H-9'), todos na forma de singletos. Também foi observado a presença de um sinal da metila em δ 1.65, o qual aparece como um dubleto proveniente do acoplamento com um próton carbinólico desblindado em δ 5,29 com J = 7.0 Hz.

Nesse espectro também observamos sinais referentes aos dos hidrogênios olefínicos em δ 5.74, δ 6.14, δ 5.65 e δ 5.87 (d, J = 9.8 Hz). Com base nesses dados físicos, observamos uma similaridade com a substância S5, e ao comparar esses dados com a literatura (HAYASHI *et al.*, 1994), foi possível determinar S6 como dehidroaustina (Figura 4.17).

Figura 4.17: Estrutura química do meroterpeno dehidroaustina (S6).



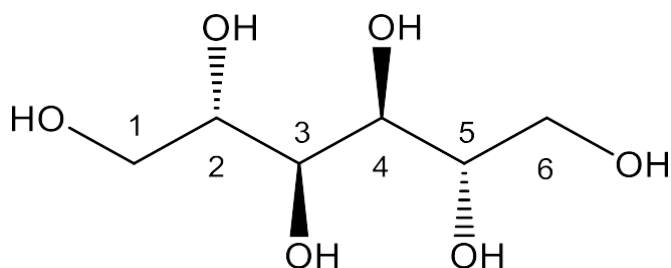
Fonte: A autora, 2025.

4.4.2.3 Identificação do poliol da fração L9-AF

Ao concentrar a fração L9-AF em evaporador rotativo, observou-se a formação de um precipitado. Este material foi lavado com metanol e obtivemos um sólido branco cristalino (S7; 87,3 mg), solúvel apenas em água. Sua identificação foi realizada usando RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H mostra sinais referentes a hidrogênios carbinólicos na região entre 3.0 – 5.0 ppm. O espectro de RMN ^{13}C mostra apenas três sinais de átomos de carbonos, sendo um deles um carbono metilênico. O padrão espectral observado sugere que este metabólito se trata de um poliol simétrico com seis átomos de carbono e a comparação com dados da literatura confirma que esse metabólito corresponde ao manitol (Figura 4.19). A análise comparativa (Tabela 4.5) desses resultados com dados da literatura (HAGIWARA et al., 2005) indicaram que o metabólito S7 é o manitol.

Figura 4.18: Estrutura química do manitol (S7).



Fonte: A autora, 2025.

Tabela 4.3: Dados de RMN de ^{13}C (D_2O) de S7 em comparação com os dados da literatura no mesmo solvente.

Posição dos carbonos	δ_c S1	δ_c HAGIWARA et al., 2005
1 e 6	63.48	63.58
2 e 5	70.98	71.19
3 e 4	69.54	69.63

Fonte: A autora, 2025.

4.5 Conclusão parcial: cultivo em arroz na presença de metais

A presença desses cátions metálicos é amplamente reconhecida por influenciar de maneira significativa o metabolismo de micro-organismos, frequentemente resultando em alterações na produção de compostos secundários. Nesse contexto, observou-se que, na presença de cobalto, o fungo *Talaromyces* sp. apresentou dificuldade de crescimento micelial, sugerindo um possível efeito tóxico. Em contrapartida, a adição de manganês promoveu um aumento expressivo na produção de pigmento vermelho, indicando uma interação específica com as vias biossintéticas do metabolismo secundário.

Apesar do ambiente adverso, *Talaromyces* sp. manteve a capacidade de sintetizar meroterpenos. Este fato foi claramente demonstrado por meio da análise LC-MS, que confirmou a presença contínua de meroterpenos, mesmo na presença dos cátions metálicos. A manutenção da produção desses compostos sob estresse químico sugere que *Talaromyces* sp. possui um metabolismo robusto e adaptativo, que lhe permite sustentar a biossíntese de metabólitos mesmo quando exposto a condições que poderiam induzir a supressão ou alteração das vias metabólicas.

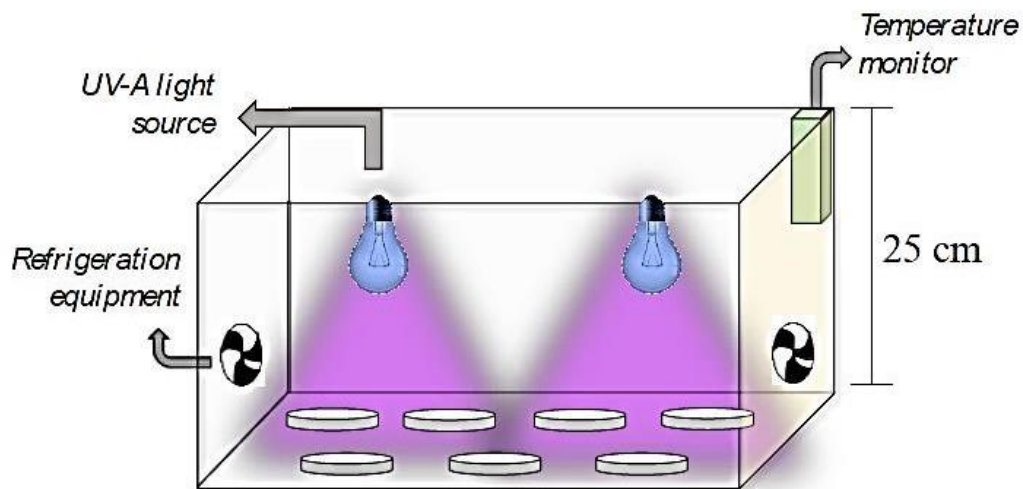
CAPÍTULO 5

5 CULTIVO DO *Talaromyces* sp. SOB LUZ UV-A

5.1 Cultivo em escala analítica

Para realizar o cultivo do *Talaromyces* sp. sob luz selecionamos dois meios de cultivo: BDA e Czapeck com 2% de extrato de levedura. O cultivo em placas contendo BDA foi realizado utilizando caixas fotobiorreatoras desenvolvidas no LaBioMMi, projetadas para fornecer um ambiente controlado para o crescimento fúngico sob luz UV-A (Figura 5.1). Essas caixas são equipadas com duas fontes luminosas de radiação UV-A, estrategicamente posicionadas para garantir uma distribuição uniforme da luz sobre as placas de cultivo. Além disso, o sistema inclui um mecanismo eficiente de refrigeração, composto por duas ventoinhas acopladas a um termostato. Este termostato foi configurado para monitorar constantemente a temperatura interna da caixa e ativar o sistema de refrigeração automaticamente sempre que a temperatura ultrapassasse o limite de 25°C.

Figura 5.1: Representação do fotobiorreator para o cultivo em placa de Petri.



Fonte: Alef Santos, LaBioMMi.

O cultivo do L9 foi realizado em triplicata tanto na luz quanto no escuro. O inóculo foi realizado adicionando pedaços do micélio com 5 cm de diâmetro. Ao final do período de crescimento de 15 dias foi realizada a extração usando a metodologia *salting out*. Neste procedimento utilizamos tubo falcon de 175mL para cada placa, onde foram adicionados o micélio do fungo mais o meio, 50 mL de água destilada, 50 mL de acetato de etila, 20g de MgSO₄ e 5g de AcONa. O material foi agitado vigorosamente e, após a separação das fases retirou-se o sobrenadante que foi

transferido para um tubo Falcon de 50 mL e foi adicionado 300mg de sulfato de magnésio (MgSO₄). Este material foi centrifugado durante 15 min, e transferido para um recipiente devidamente pesado.

Os extratos obtidos a partir do cultivo na presença e ausência de luz UV-A foram analisados por UPLC-DAD e HRESIMS. Os dados de espectrometria de massas foram convertidos para a extensão MZxml via *DataAnalysis* versão 4.3, e foram processados no software MzMine (versão 2.53) e submetidos na plataforma GNPS e *MetaboAnalyst* visando obter a rede molecular destes cultivos e um perfil estatístico.

5.1.1 Análises cromatográficas e processamento via *GNPS* e *MetaboAnalyst*

Para a análise cromatográfica por UPLC-DAD foi utilizada uma coluna analítica C18 de 1.7 µm, modo reverso de eluição e gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O durante 12min. Para estas análises, foi usada a vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de amostra de 5 µL.

A análise por HRESIMS foi realizada utilizando um sistema Shimadzu Nexera X2 de UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução (Q-TOF Impact II, Bruker Daltonics, Alemanha). Para as separações cromatográficas, empregou-se uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm; Waters, EUA), com o forno mantido a uma temperatura constante de 40 °C. A fase móvel foi composta por água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B), seguindo um gradiente de eluição iniciado com 5% de B de 0 a 1 minuto, aumentando para 50% de B de 1 a 10 minutos, alcançando 98% de B entre 12 e 16 minutos, e retornando a 5% de B de 16 a 20 minutos. Os dados de massa foram coletados na faixa m/z de 50 a 1500, com uma taxa de aquisição de 5 Hz. Os cinco íons de maior intensidade foram selecionados automaticamente para fragmentação (Auto MS/MS), utilizando energias de colisão induzida (CID) entre 15 e 40 eV, a fim de obter dados de fragmentação. Os espectros obtidos foram convertidos para o formato MZxml por meio do software *DataAnalysis* (versão 4.3), processados no MzMine (versão 2.53) e posteriormente submetidos à plataforma GNPS. Foram aplicados parâmetros de 2,0 Da para a tolerância de massa do íon fragmento e 0,5 Da para o limiar de pontuação. Para a organização e visualização das redes moleculares geradas, utilizou-se o software Cytoscape, versão 3.10.0.

5.2 Cultivo em escala preparativa em meio BDA sob luz UV-A

Inicialmente foram preparadas 46 placas do meio semi-sólido de BDA para o cultivo do fungo L9 nas caixas fotobiorreatoras, em temperatura constante em 24°C, modo estático e exposição contínua à luz UV-A roxa. Após o período de 14 dias de crescimento, foi realizada a extração da biomassa usando como solvente extrator o acetato de etila em banho ultrassônico durante 15 min. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo com pressão reduzida. Depois realizado o fracionamento do extrato bruto em coluna de sílica gel e sistemas de eluente com gradiente de polaridade (Tabela 5.1), obtendo um total de 6 frações. Após a secagem das frações foi realizada análise das mesmas em CCD, UPLC UV-Vis e LC-MS. Os dados de espectrometria de massas foram processados via *DataAnalysis* versão 4.3 juntamente com o software MzMine (versão 2.53) e submetido na plataforma GNPS visando obter a rede molecular deste material.

Tabela 5.1: Frações do extrato AcOEt.

Sistemas de eluente	Frações	Massa (mg)
Hex:AcoEt (95:5) 0,1 %AF*	L9-AL	-
Hex:AcoEt (70:30)	L9-BL	66,7
AcoEt (100%)	L9-CL	286,1
AcoEt:MeOH (90:10)	L9-DL	226,8
AcoEt:MeOH (70:30)	L9-EL	20,9
MeOH (100%)	L9-FL	47,0

*AF: Ácido fórmico

Fonte: A autora, 2025.

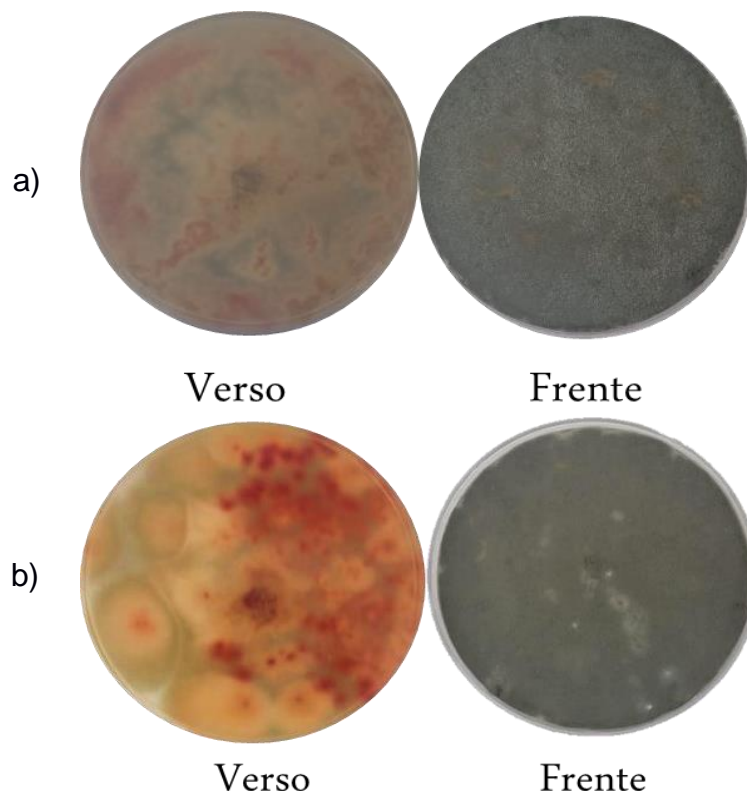
Nas análises cromatográficas das frações, observamos que as frações L9-AB e L9-CL apresentavam as regiões de interesse quando comparados com o cultivo controle em escala analítica (escuro). Essas frações foram purificadas via *Comibflash* da TELEDYNE-ISCO *Combiflash* RF 200 UV-vis. Foi utilizada uma coluna de sílica comum *RediSep* usando 40 g, como fase móvel composta por hexano e clorofórmio (1:1) na bomba A, e metanol na bomba B. Usamos um fluxo de 15 mL/min, comprimentos de onda em 220 nm e 280 nm, com tempo de corrida de 60 min.

5.3 Resultados

Na comparação dos cultivos realizados na presença e na ausência de luz UV-A, observou-se uma diferença notável nas características fenotípicas das colônias de *Talaromyces sp.* Especificamente, as placas de Petri contendo o fungo exposto à luz UV-A evidenciaram o surgimento de uma coloração vermelho intensa nas colônias, conforme mostrado nas figuras 5.2a e 5.2b. Essa alteração na coloração foi particularmente pronunciada nas regiões diretamente expostas à luz, sugerindo uma resposta específica à radiação UV-A.

A produção de pigmentos, como observado nas colônias de *Talaromyces sp.*, é um mecanismo frequentemente relacionado à adaptação e proteção do fungo contra os efeitos nocivos da radiação UV. Estudos na literatura (SHUMACHER, 2017; VELMURUGAN et al., 2010; FANELLI et al., 2012; CHEONG, 2016) relatam que muitos fungos, ao serem expostos à luz UV-A, induzem a síntese de pigmentos como uma forma de proteção contra o estresse oxidativo causado pela radiação. Esses pigmentos funcionam como agentes protetores, absorvendo e dissipando a energia UV, minimizando os danos celulares causados por radicais livres gerados durante a exposição.

Figura 5.2: Micélio do fungo *Talaromyces sp.* cultivado na a) ausência e b) presença de luz UV-A.

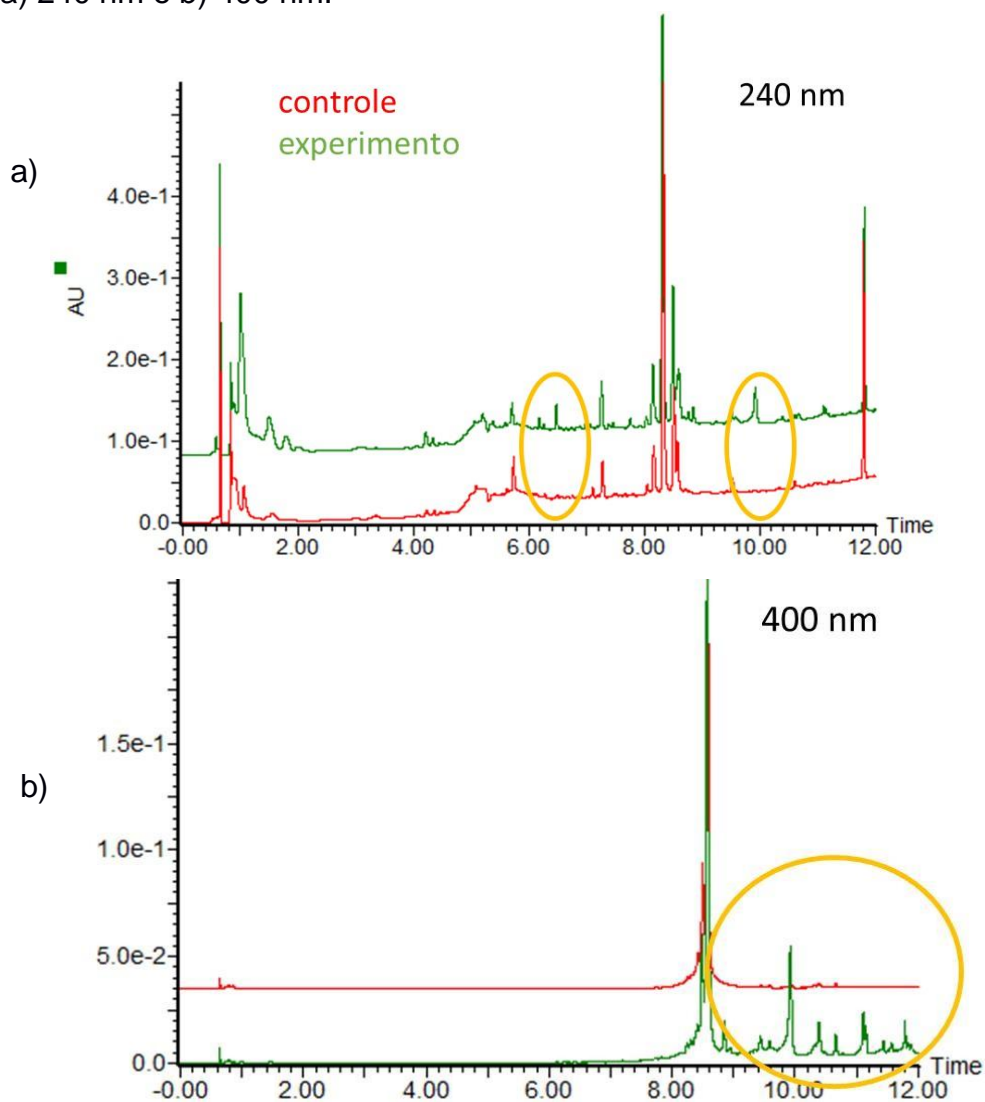


Fonte: A autora, 2025.

5.3.1 Perfil cromatográfico por CLUE-DAD

Além da diferença morfológica observada no crescimento do L9 sob luz UV-A, foram identificadas modificações na produção de metabólitos por meio da análise CLUE-DAD. Essas mudanças na produção de metabólitos foram detectadas nos extratos de AcOEt dos cultivos realizados na presença de luz UV-A. As Figuras 5.3a e 5.3b mostram as diferenças nos perfis cromatográficos dos extratos de AcOEt nas duas condições. Observou-se a produção de novos compostos de média polaridade detectáveis entre 6 a 8 minutos e 9 a 10 minutos, com absorção a 240 nm. Além disso, notou-se a produção de compostos polares entre 9 a 12 minutos com absorção a 400 nm, os quais não estavam presentes no controle.

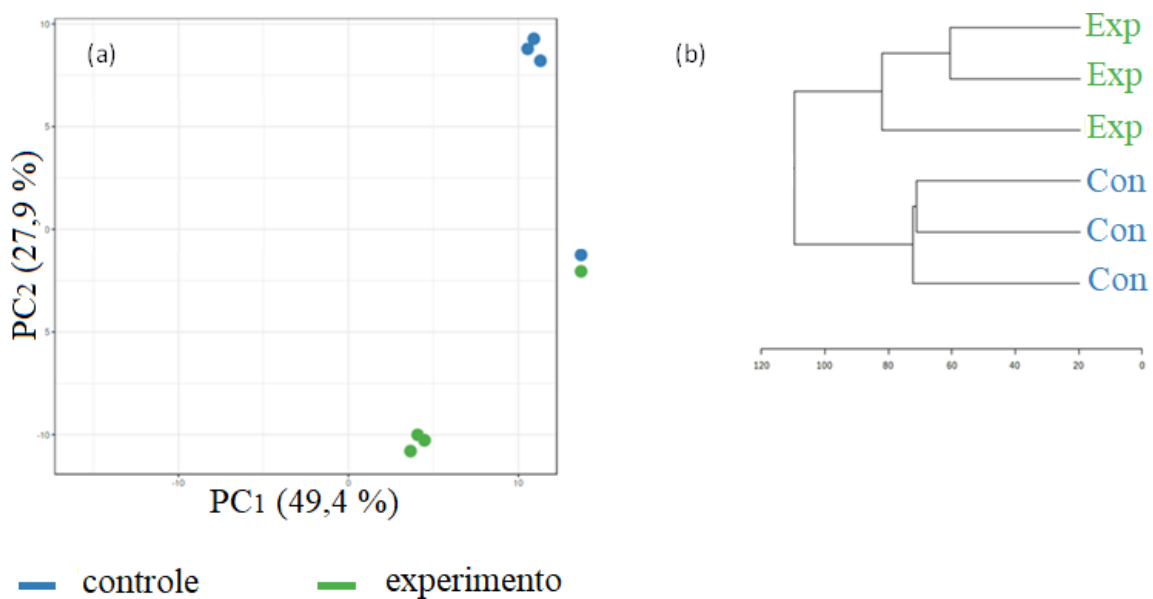
Figura 5.3: Cromatogramas dos cultivos realizados na presença e ausência de luz UV-A em a) 240 nm e b) 400 nm.



Fonte: A autora, 2025.

Ao analisar o gráfico PC1 x PC2 e o dendrograma (Figura 5.4a e Figura 5.4b), é possível identificar agrupamentos distintos que refletem as diferenças nos perfis metabólicos dos cultivos realizados no escuro e sob irradiação de luz UV-A. No gráfico de PCA, observa-se que os pontos correspondentes a ambos os cultivos se concentram predominantemente no lado direito do gráfico. Essa disposição sugere que, embora existam diferenças detectáveis, os cultivos apresentam uma composição metabólica geral semelhante, refletida por sua proximidade no espaço bidimensional definido pelos dois primeiros componentes principais. O dendrograma (Figura 5.4b), gerado pela análise de agrupamento hierárquico, complementa os resultados obtidos no gráfico de PCA. Ele confirma a formação de dois grupos principais, correspondentes às condições de cultivo no escuro e sob luz UV-A.

Figura 5.4: Gráfico de PCA (a) e dendrograma (b) dos cultivos realizados na presença e ausência de luz UV-A.



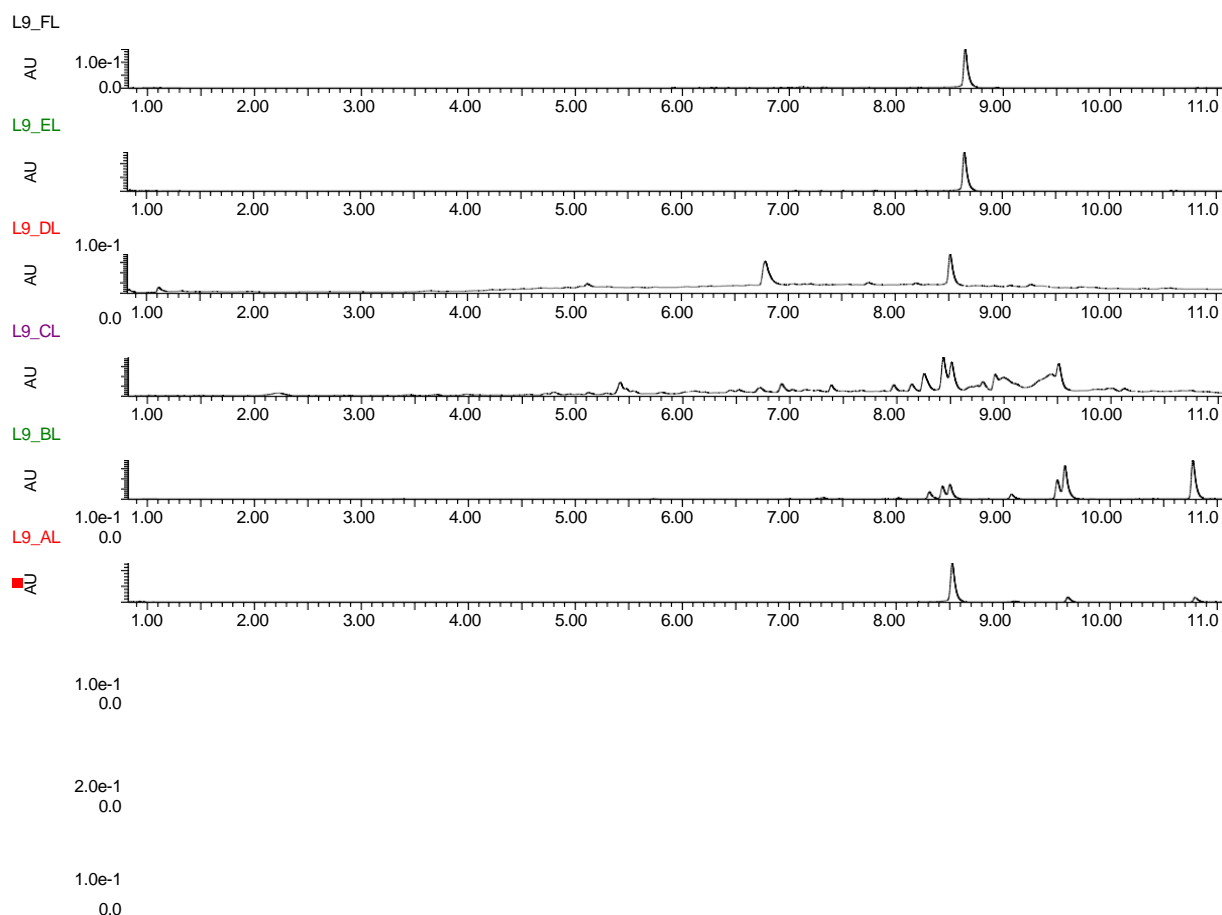
Fonte: A autora, 2025

5.3.2 Isolamento de metabólitos

A partir do fracionamento do extrato em acetato de etila (AcOEt), foram obtidas seis frações, que foram posteriormente analisadas por CLUE-DAD usando como padrão interno a curcumina (tempo de retenção em 8.71 min). A análise dos cromatogramas gerados (Figura 5.5) permitiu a identificação das frações que continham os metabólitos induzidos, o que possibilitou uma seleção direcionada para

o isolamento dos compostos de interesse. Com base nos perfis cromatográficos obtidos, as frações L9-CL e L9-DL foram selecionadas para o isolamento dos metabólitos, dado seu conteúdo enriquecido com as substâncias alvo. Esse processo de seleção criteriosa garantiu uma purificação mais eficiente e direcionada para a análise e caracterização dos metabólitos secundários induzidos.

Figura 5.5: Cromatogramas das frações do extrato AcOEt em 310 nm.



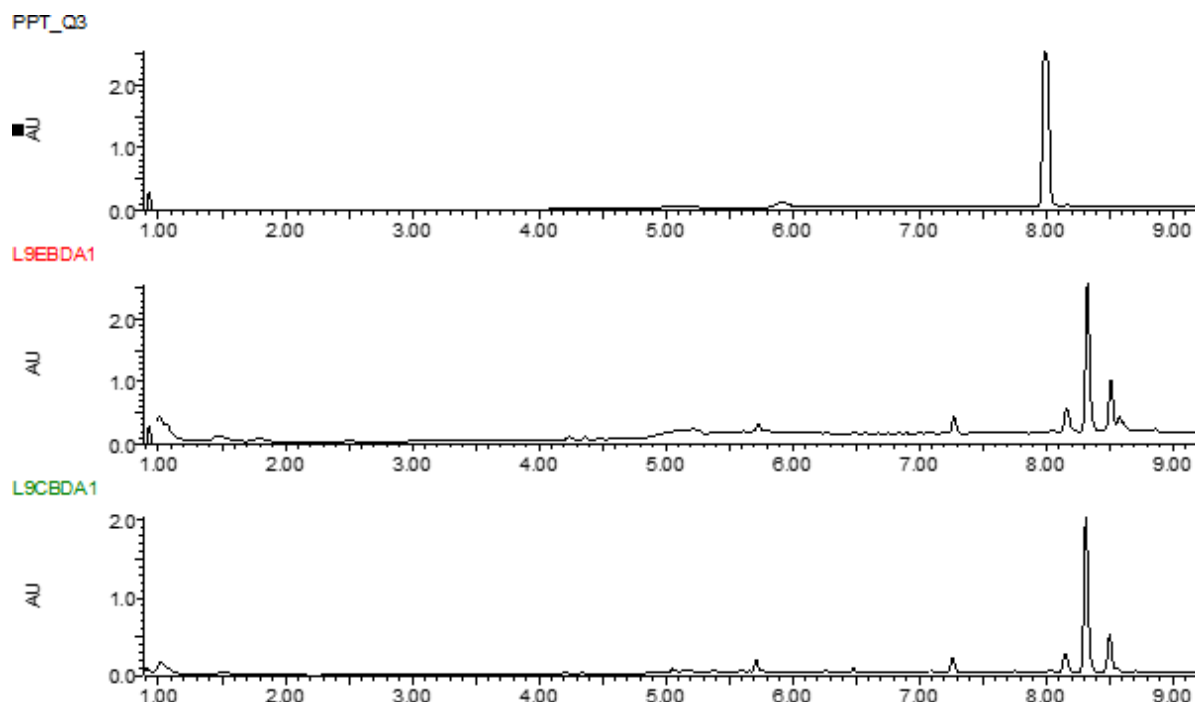
Fonte: A autora, 2025.

A partir da fração L9-CL, foram isolados na forma de três sólidos cristalinos brancos, cujas características sugeriram uma estrutura semelhante à dos meroterpenos previamente obtidos no cultivo em arroz. A análise dos espectros de RMN ¹H permitiu a identificação precisa desses metabólitos, confirmando-os como austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina. A correspondência dos dados espectroscópicos com os compostos conhecidos forneceu evidências claras de que os metabólitos isolados pertencem à mesma classe química de meroterpenos.

A presença de uma banda cromatográfica de baixa intensidade no cromatograma de amostras expostas à luz indica a produção da austina (chamada de

PPT_Q3), mas em uma quantidade significativamente menor em comparação com as condições de ausência de luz. Isso sugere que a irradiação UV-A pode exercer um efeito inibitório sobre a produção desse meroterpeno, ou que a luz pode interferir na expressão gênica envolvida na biossíntese da austina.

Figura 5.6: Comparação dos cromatogramas da austina com os extratos obtidos do cultivo em meio BDA na presença (L9EBDA1) e ausência de luz UV-A (L9CBDA1).



Fonte: A autora, 2025.

5.4 Conclusão parcial: cultivo sob influência de luz UV-A

Os resultados obtidos evidenciam a influência da luz UV-A no metabolismo secundário do fungo *Talaromyces sp.*, destacando sua capacidade adaptativa diante de condições de estresse. A exposição à radiação UV-A induziu alterações tanto no perfil morfológico quanto metabólico do fungo. Foi observada a produção aumentada de pigmentos, sugerindo uma resposta protetora contra o estresse oxidativo causado pela radiação, o que corrobora com estudos prévios na literatura. Além disso, a análise dos extratos revelou a presença de meroterpenos, incluindo austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina, mesmo sob irradiação UV-A, no entanto, o perfil metabólico evidenciou uma possível redução na intensidade cromatográfica.

A avaliação dos metabólitos secundários do fungo *Talaromyces sp.*, cultivado na presença ou ausência de luz UV-A, demonstrou que, mesmo sob condições de estresse causadas pela exposição à radiação UV-A, o fungo foi capaz de manter a produção de meroterpenos, indicando a robustez do seu metabolismo secundário. Esses compostos, que incluem austina, dehidroaustina e

acetoxidehidroaustina, continuam a ser sintetizados apesar das condições adversas impostas pela luz UV-A. Além disso, ao comparar os cultivos observamos um aumento na produção de pigmentos nos cultivos expostos à luz UV-A. Esse aumento sugere que *Talaromyces sp.* responde ao estresse da radiação UV-A com a síntese de pigmentos, possivelmente como uma estratégia de proteção contra os danos causados pela radiação.

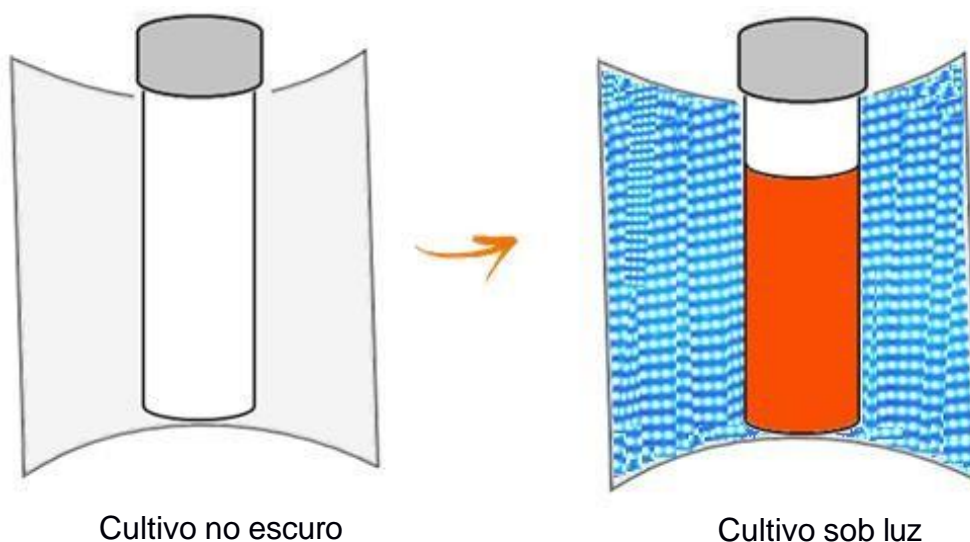
CAPÍTULO 6

6 CULTIVO DO *Talaromyces* sp. SOB LUZ UV-A E ADIÇÃO DE CÁTIIONS METÁLICOS

6.1 Cultivo em meio Czapeck convencional sob luz UV-A em escala analítica

Para a realização do cultivo em meio líquido, foi inicialmente confeccionada a estrutura necessária para o experimento (Figura 6.1). O sistema era composto por uma “jaqueta de led” na cor azul, um condensador, responsável pela refrigeração e manutenção da temperatura ideal durante o cultivo, evitando o superaquecimento do meio. Além disso, o fotobiorreator possuía uma entrada de ar, configurada para promover o borbulhamento constante do meio de cultivo, garantindo uma adequada aeração e distribuição homogênea dos nutrientes. Paralelamente, uma saída de ar foi incluída para liberar os gases gerados durante o processo metabólico do fungo, como o dióxido de carbono, assegurando a troca gasosa eficiente e evitando a saturação do sistema.

Figura 6.1: Representação do fotobiorreator para cultivo em meio líquido.



Fonte: A autora, 2025.

O cultivo do fungo L9 em meio líquido de czapeck foi realizado primeiramente em escala analítica utilizando 150 mL deste meio de cultivo estéril, e 1mL de suspensão de esporos. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, tanto na ausência quanto na presença de luz UV-A azul, para avaliar possíveis efeitos da irradiação de luz no desenvolvimento do fungo (Figura 6.2).

Figura 6.2: Fotobiorreator para o cultivo em meio líquido.



Fonte: A autora, 2025.

Além disso, foi utilizado um meio Czapeck modificado sob irradiação de luz UV-A, no qual o sulfato de ferro II (FeSO_4) foi substituído por solução de cloreto de cobalto (30 mmol) e cloreto de manganês (250 mmol).

Após 15 dias de crescimento, tanto na presença quanto na ausência de luz, com e sem a adição de cátions metálicos, realizou-se a extração dos cultivos por meio do método de extração *salting-out*. O processo empregou 50 mL acetato de etila (AcOEt), 20 g de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 5 g de acetato de sódio (AcONa). Os extratos obtidos foram transferidos para recipientes previamente pesados e armazenados sob refrigeração para análises futuras

De forma análoga descrito no capítulo 5, as análises por HRESIMS foram conduzidas utilizando um sistema de UHPLC Shimadzu Nexera X2 acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução Q-TOF Impact II (Bruker Daltonics, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 μm ; Waters, EUA), com o forno mantido a 40 °C. A fase móvel consistiu de água deionizada contendo 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B), empregando-se um gradiente de eluição iniciado com 5% de B entre

0 e 1 minuto, seguido por um aumento para 50% de B de 1 a 10 minutos, atingindo 98% de B de 12 a 16 minutos, e retornando a 5% de B de 16 a 20 minutos.

A aquisição dos dados foi realizada na faixa m/z de 50 a 1500 com uma taxa de 5 Hz. Os cinco íons mais abundantes foram automaticamente selecionados para fragmentação (Auto MS/MS), empregando energias de dissociação por colisão (CID) entre 15 e 40 eV para obtenção de espectros de fragmentação.

Os espectros de massas gerados foram convertidos para o formato MZxml com o software *DataAnalysis* (versão 4.3), processados no programa MzMine (versão 2.53) e submetidos à análise na plataforma GNPS. Os parâmetros definidos incluíram uma tolerância de massa para íons fragmento de 2,0 Da e um limiar de pontuação de 0,5 Da. As redes moleculares geradas foram organizadas e visualizadas no software Cytoscape, versão 3.10.0.

6.2 Cultivo em escala preparativa

O cultivo do fungo L9 foi realizado em 7,2 L de meio Czapeck, inoculando 1000 μL da suspensão de esporos do fungo. O período de cultivo foi 14 dias, exposição contínua à luz de LED, agitação por borbulhamento de ar, temperatura da caixa foi 25°C, temperatura do banho foi 9°C, temperatura do meio Czapeck foi 22°C. Após o período de cultivo, o meio líquido e o micélio (Figura 6.3) foram transferidos para recipientes apropriados, congelados em nitrogênio líquido e submetidos ao processo de liofilização.

Figura 6.3: Cultivo em escala preparativa na presença de luz UV-A.



Fonte: A autora, 2025.

A extração dos metabólitos foi realizada utilizando acetato de etila (AcOEt) grau analítico. A biomassa obtida foi submersa ao banho ultrassônico durante 15 min, filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Ao final do procedimento de extração foi obtido um extrato bruto de AcOEt com massa de 2,5237 g. Após a extração com AcOEt, adicionou-se metanol grau analítico a fim de obter maior extração de metabólitos, seguindo o procedimento mencionado anteriormente, gerando assim o extrato MeOH com 3,6587g, o qual foi reunido com o extrato AcOEt. Esse extrato foi analisado por UPLC-DAD utilizando uma coluna analítica C18 de 1.7 μm , modo reverso de eluição e gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O durante 12min. Para estas análises, foi usada a vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de amostra de 5 μL .

O extrato bruto obtido foi fracionado em coluna cromatográfica de bancada, utilizado como fase estacionária sílica gel e seis variações de combinações dos solvente hexano, acetato de etila e metanol, em modo gradiente conforme exposto na Tabela 6.1. Vale ressaltar que todas as frações obtidas foram analisadas por UPLC-DAD no método descrito no início desta seção, e por CCD.

Tabela 6.1: Frações obtidas da biomassa do L9 cultivado na presença de luz UV-A

Sistemas de eluente	Frações	Massa (mg)
Hex:AcoEt (95:5) 0,1 %AF*	L9LLA	-
Hex:AcoEt (70:30)	L9LLB	322,4
AcoEt (100%)	L9LLC	304,9
AcoEt:MeOH (90:10)	L9LLD	433,5
AcoEt:MeOH (70:30)	L9LLE	555,9
MeOH (100%)	L9LLF	941,3

Fonte: A autora, 2025.

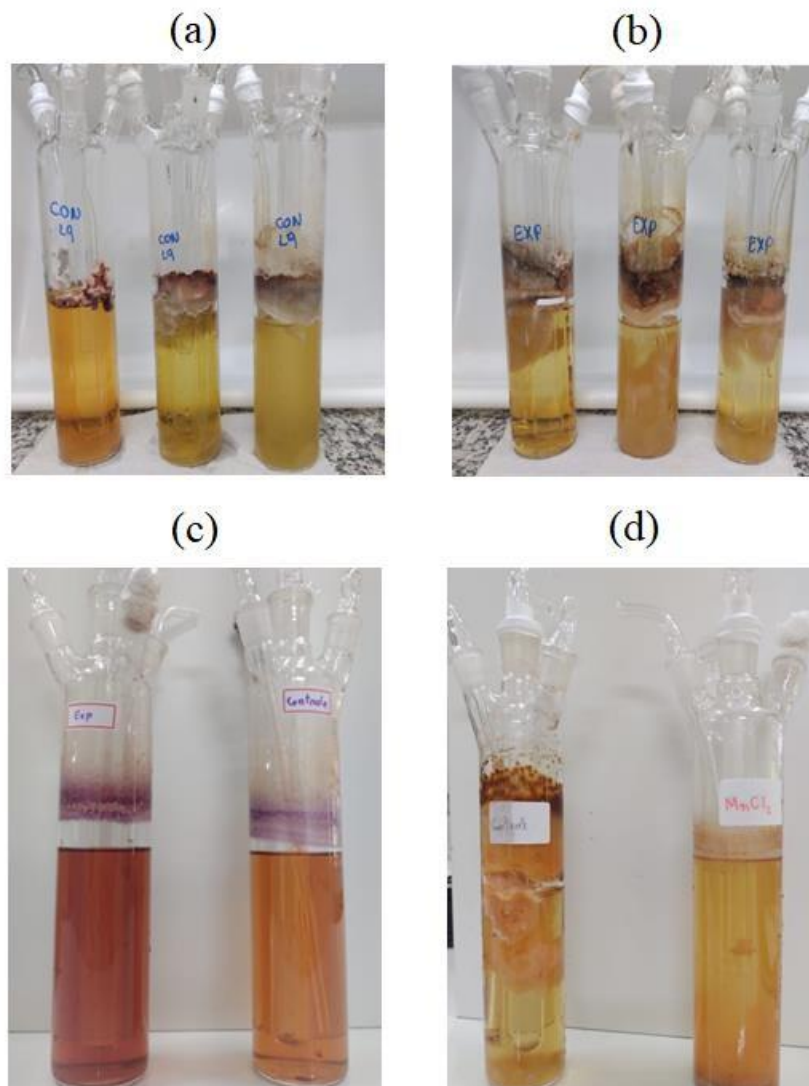
6.3 RESULTADOS

As observações realizadas nos cultivos sob diferentes condições experimentais (Figura 6.4) reforçam as características adaptativas do fungo *Talaromyces* sp. Nos frascos controle (CON, sem exposição à luz UV-A, o crescimento micelial foi mais discreto, com biomassa menos densa e coloração mais clara. Já nos

frascos submetidos à luz UV-A (EXP), o meio de cultivo apresentou maior intensidade de coloração, com formação de biomassa mais espessa e pigmentada, evidenciando uma possível resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado pela luz.

Ao combinar a irradiação de luz UV-A com a adição de cátions metálicos, como Co^{2+} e Mn^{2+} , ao meio de cultivo, observou-se uma diminuição significativa no crescimento micelial quando comparado ao cultivo no meio czapeck convencional. Além disso, a adição de Mn^{2+} resultou em mudanças visíveis na morfologia do micélio, com formação de agregados mais compactos e coloração distinta, sugerindo que os cátions metálicos modulam a resposta do fungo ao estresse oxidativo.

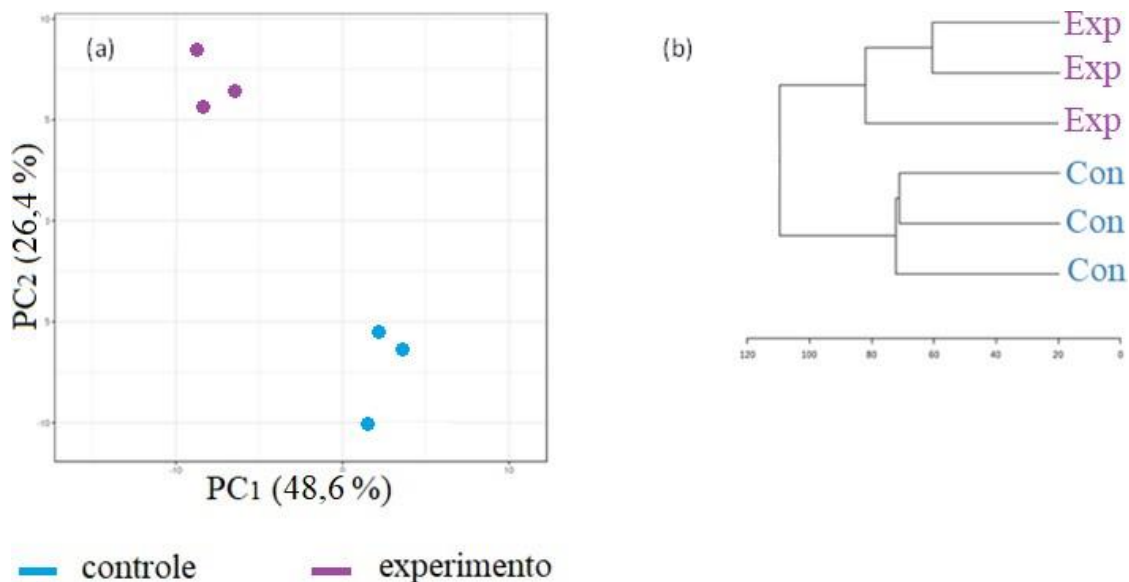
Figura 6.4: Cultivo do fungo L9 na ausência de luz no meio czapeck convencional (a), meio czapeck convencional na presença de luz (b), cultivo na presença de Co^{2+} (c), e cultivo na presença de Mn^{2+} (d).



Fonte: A autora, 2025.

No gráfico de PCA (Figura 6.5a), os dois primeiros componentes principais explicam 48,6% (PC₁) e 26,4% (PC₂) da variância total, totalizando 75% da variância. A análise revela uma separação clara entre os dois grupos de amostras, evidenciando que as condições experimentais induziram alterações no perfil metabólico em comparação às amostras controle. As amostras experimentais (Exp) apresentam um agrupamento coeso e distinto das amostras de controle (Con), indicando uma modulação metabólica específica sob as condições impostas. Essa separação confirma que as condições experimentais tiveram impacto sobre o metabolismo secundário do fungo, reforçando a eficácia dos tratamentos aplicados. Além disso, o dendrograma gerado pela análise de agrupamento hierárquico (Figura 6.5b) corrobora os resultados obtidos no PCA, evidenciando a formação de dois grupos bem definidos. Esses agrupamentos correspondem de forma consistente às condições controle e experimentais, destacando uma organização clara das amostras com base nos perfis metabólicos.

Figura 6.5 Gráfico de PCA (a) e dendrograma (b) para o cultivo na presença e ausência de luz UV-A no meio czapeck convencional

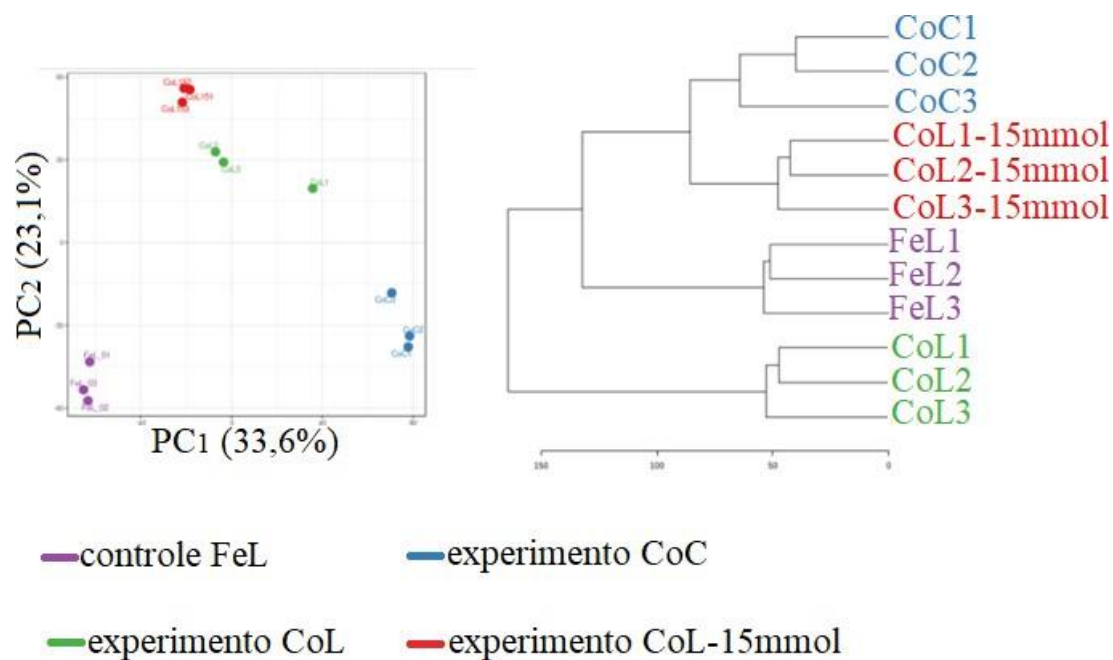


Fonte: A autora, 2025.

Na análise das condições de cultivo contendo cobalto, observa-se uma separação clara entre o grupo controle (FeL) e os experimentos envolvendo o cobalto (CoC, CoL e CoL-15mmol). O gráfico de PCA (Figura 6.6) indica que os dois primeiros

componentes principais explicam 33,6% (PC1) e 26,4% (PC2) da variância total, destacando a relevância das diferenças entre os grupos. No dendrograma, as amostras controle (FeL) formam um agrupamento distinto, enquanto os experimentos com cobalto se distribuem em subgrupos de acordo com as condições experimentais (presença de luz e concentração de cobalto). Destaca-se que o experimento com cobalto no escuro forma um agrupamento separado dos demais cultivos realizados.

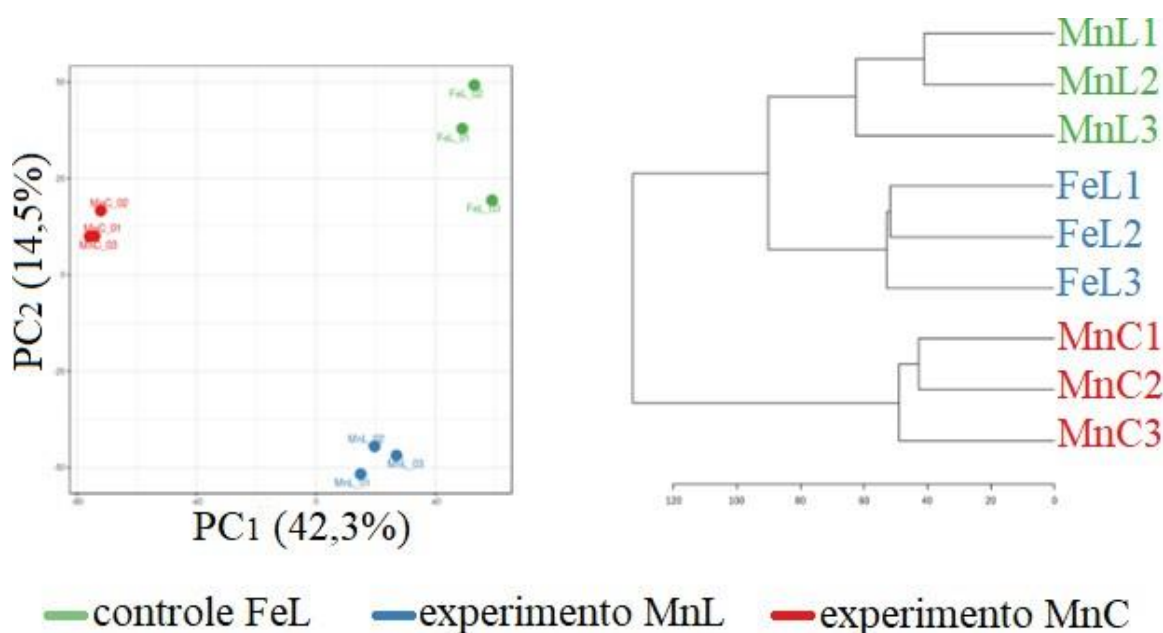
Figura 6.6: Gráfico de PCA do cultivo na presença de cobalto.



Fonte: A autora, 2025.

Já na análise das condições de cultivo na presença de manganês, o gráfico de PCA (Figura 6.7) apresenta uma maior variância explicada pelo PC1 (42,3%), enquanto o PC2 (14,5%) complementa a separação entre os grupos. O controle (FeL) está claramente separado dos experimentos com manganês (MnL e MnC), indicando que tanto a presença do metal quanto as condições de luz afetam o perfil metabólico. O dendrograma reforça essas observações, mostrando agrupamentos distintos para os controles (FeL) e para os experimentos com manganês. Nota-se ainda que as condições de luz (MnL) e escuro (MnC) resultam em perfis metabólicos bem diferenciados, sugerindo que a irradiação de luz UV-A azul é um fator crítico no metabolismo do fungo em presença de manganês.

Figura 6.7: Gráfico de PCA para o cultivo na presença de manganês.



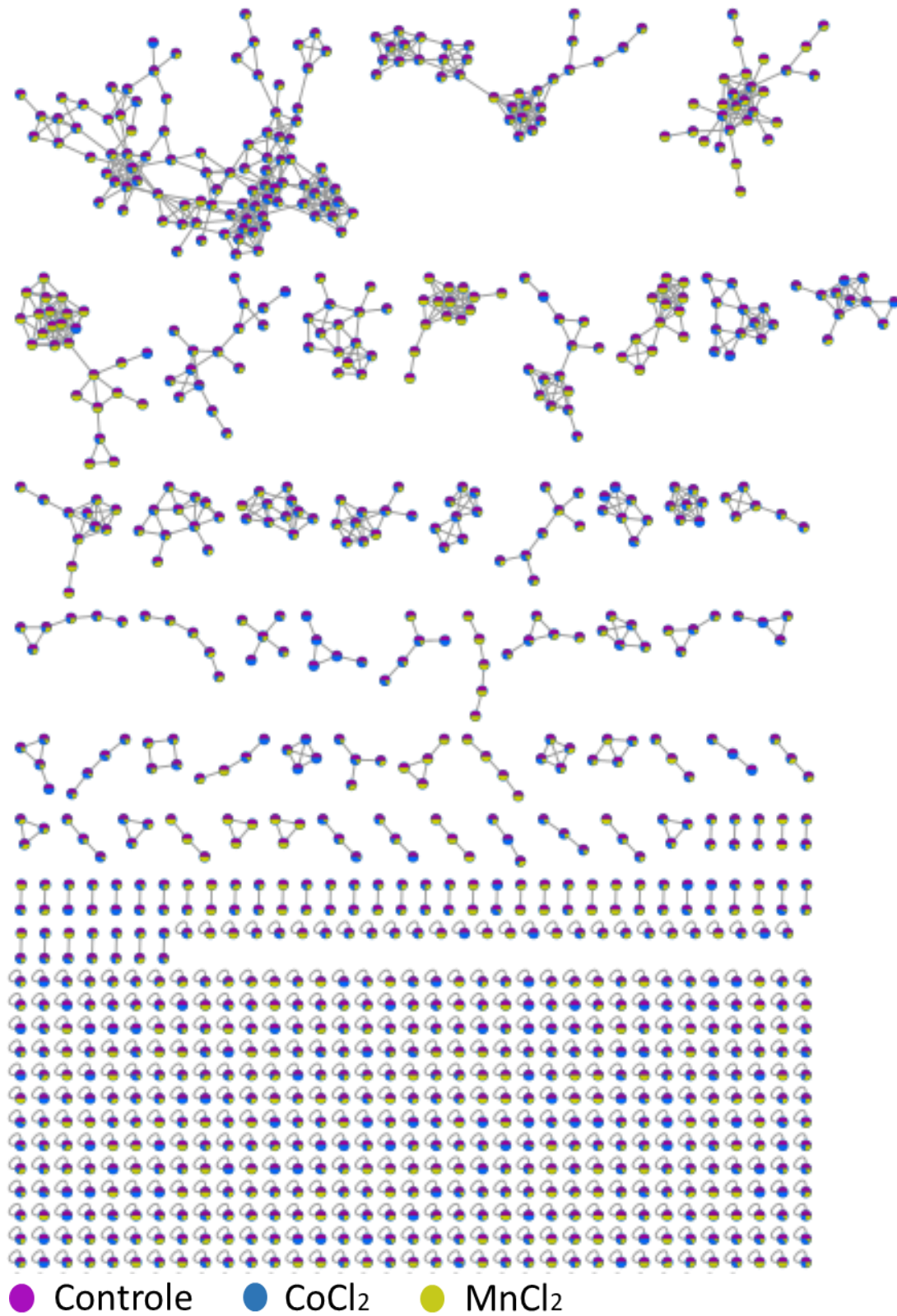
Fonte: A autora, 2025.

6.3.1 Processamento por GNPS

A análise da rede molecular (Figura 6.8) gerada a partir dos extratos obtidos nos cultivos do fungo *Talaromyces* sp. revelou um total de 1099 nodos, permitindo a anotação de diferentes classes metabólicas. Os dados obtidos evidenciam a diversidade química produzida pelo fungo sob as condições avaliadas, tanto no meio Czapeck convencional quanto no modificado, com ou sem luz UV-A.

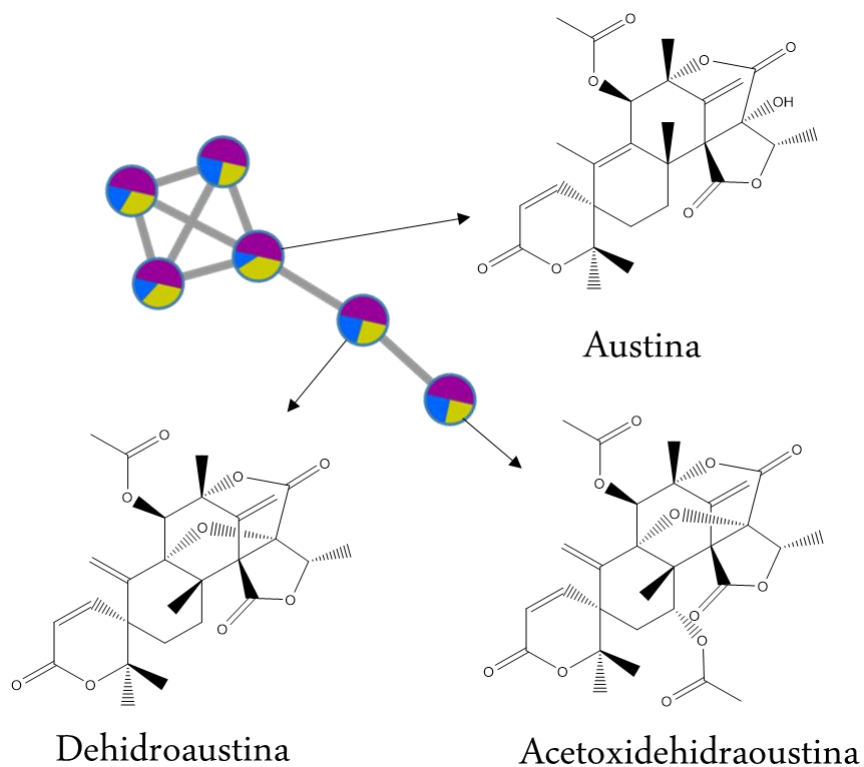
O primeiro cluster molecular (Figura 6.9) foi composto por nodos relacionados aos meroterpenos isolados nesta pesquisa, como austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina, evidenciando a presença e a interconexão desses compostos no perfil metabólico do *Talaromyces* sp.. O segundo cluster molecular (Figura 6.10) apresentou nodos com características espectrais correspondentes a nucleosídeos, como adenina, uridina, adenosina, hipoxantina e triancatina, sugerindo a importância dessa classe metabólica na diversidade química produzida pelo fungo. Já no terceiro cluster (Figura 6.11), foram anotados metabólitos derivados da L-tirosina, incluindo N-acetil-tiramina, N-acetil-feniletilamina e *p*-aminofenol.

Figura 6.8: Rede molecular dos cultivos realizados na presença de cátions metálicos e luz UV-A.



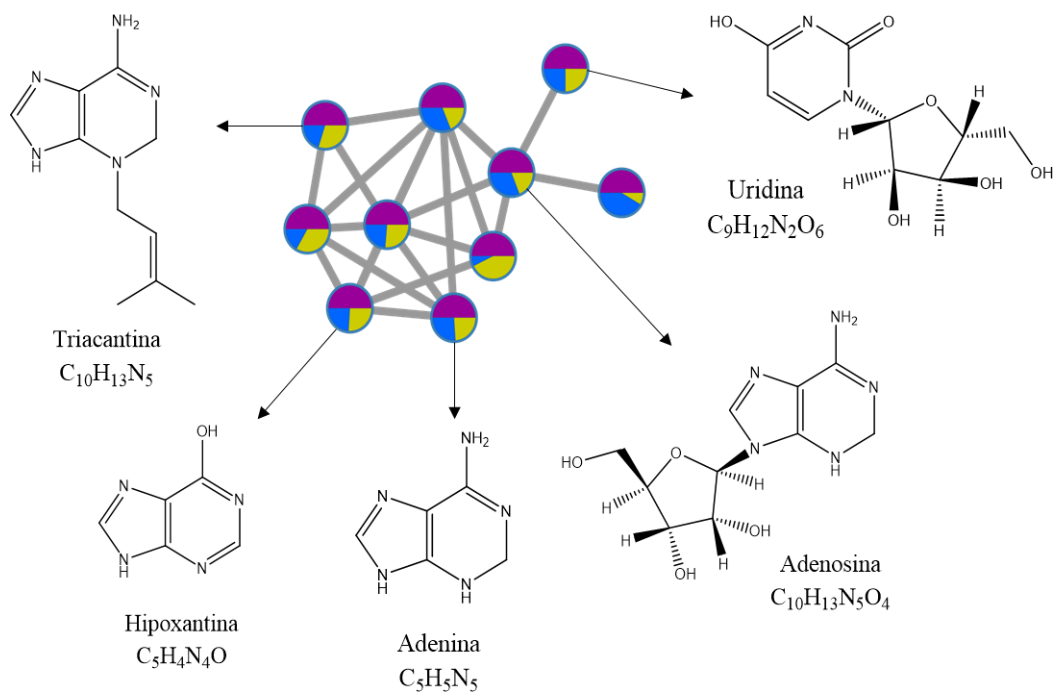
Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.9: Cluster molecular dos meroterpenos anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A



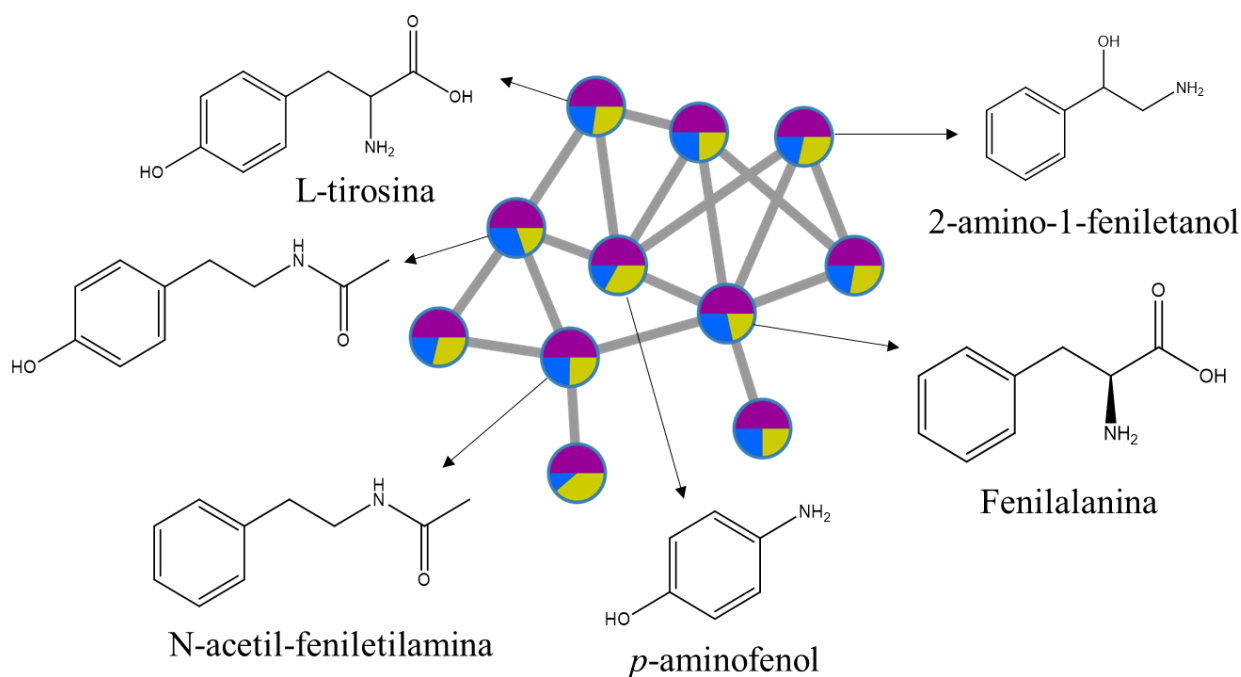
Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.10: Cluster molecular dos nucleosídeos anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A



Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.11: Cluster molecular dos derivados da L-tirosina anotados na presença dos cátions metálicos e luz UV-A



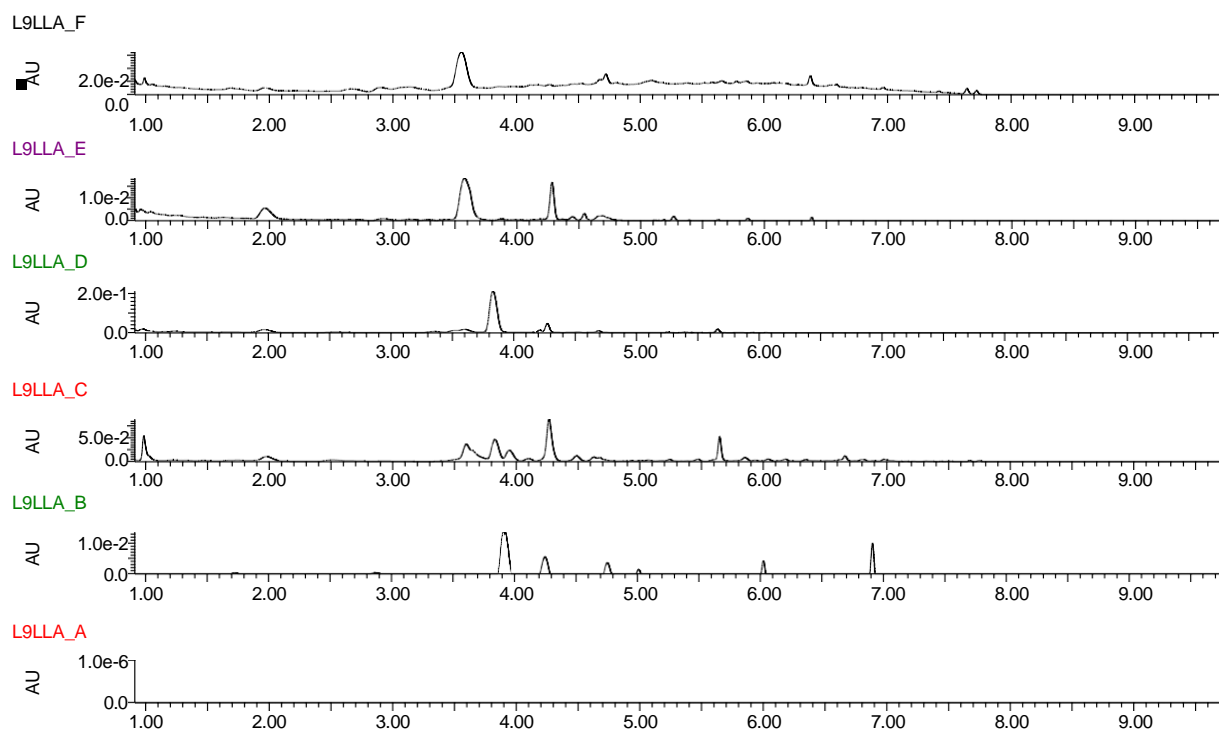
Fonte: A autora, 2025.

6.3.2 Isolamento dos metabólitos do fungo cultivado no meio líquido de Czapeck sob luz UV-A

O fracionamento do extrato acetato de etila resultou na obtenção de seis frações, as quais foram analisadas por CLUE-DAD. Os cromatogramas gerados (Figura 6.12) revelaram diferenças significativas nos perfis metabólicos entre as frações, permitindo a identificação dos metabólitos cuja produção foi induzida pela exposição à luz UV-A. A análise detalhada desses perfis permitiu distinguir claramente as frações enriquecidas com os compostos induzidos, proporcionando uma base sólida para a seleção das frações de interesse para o isolamento e caracterização dos metabólitos produzidos sob esse fator de estresse.

Com base nos perfis cromatográficos, foi possível selecionar de forma direcionada as frações L9LLA-B e L9LLA-C, que apresentaram maior concentração de metabólitos induzidos. Essas frações foram submetidas ao isolamento de composto por cromatografia líquida de alta eficiência em escala reciclante (CLAE-R), maximizando a eficiência na separação e purificação dos compostos de interesse.

Figura 6.12: Cromatogramas das frações obtidas do extrato AcOEt em 280 nm.



Fonte: A autora, 2025.

Após as análises cromatográficas das frações obtidas, realizamos uma etapa adicional de purificação das frações L9LLA-B e L9LLA-C utilizando o *Combiflash* com o sistema TELEDYNE-ISCO *Combiflash* RF 200 UV-vis. Para essa purificação, empregamos uma coluna de sílica comum *RediSep*, utilizando 40 g de material para cada fração. A fase móvel foi composta por uma mistura de hexano e clorofórmio na proporção 1:1 na bomba A, enquanto a bomba B foi carregada com metanol. A separação foi realizada a um fluxo constante de $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, monitorada em dois comprimentos de onda: 220 nm e 280 nm, e o tempo de corrida foi ajustado para 60 minutos.

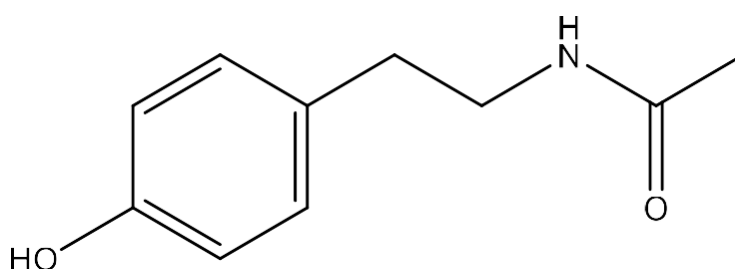
Após as etapas de purificação usando o *Combiflash*, realizamos o isolamento dos metabólitos por CLAE-R. Durante esse processo, isolamos dois derivados da L-tirosina que foram anotados a partir do processamento no *GNPS*: a *n*-acetil-tiramina (S8; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$) e o *p*-aminofenol (S9; $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$).

A substância S8 (Figura 6.13) foi isolada na forma de óleo amarelo e com absorção máxima em 275 nm. Os dados de RMN ^1H (Figura 6.14) (400 MHz, CD_3OD) mostraram deslocamentos químicos em: 6.92 ppm (2H, d, $J = 8.4$, H-2, 6), 6.61 ppm (2H, d, $J = 8.5$, H-3, 5), 3.23 ppm (2H, t, $J = 7.3$, H-8), 2.59 ppm (2H, t, $J = 7.2$, H-7), 1.80 ppm (3H, s, H-10). E dos dados de ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD) (Figura

6.15) mostraram sinais em: 173.2 ppm (C, C-9), 156.9 ppm (C, C-4), 131.2 ppm (C, C-1), 130.7 ppm (CH, C-2, C-6), 116.3 ppm (CH, C-3, 5), 42.4 ppm (CH₂, C-8), 35.6 ppm (CH₂, C-7), 22.5 ppm (CH₃, C-10).

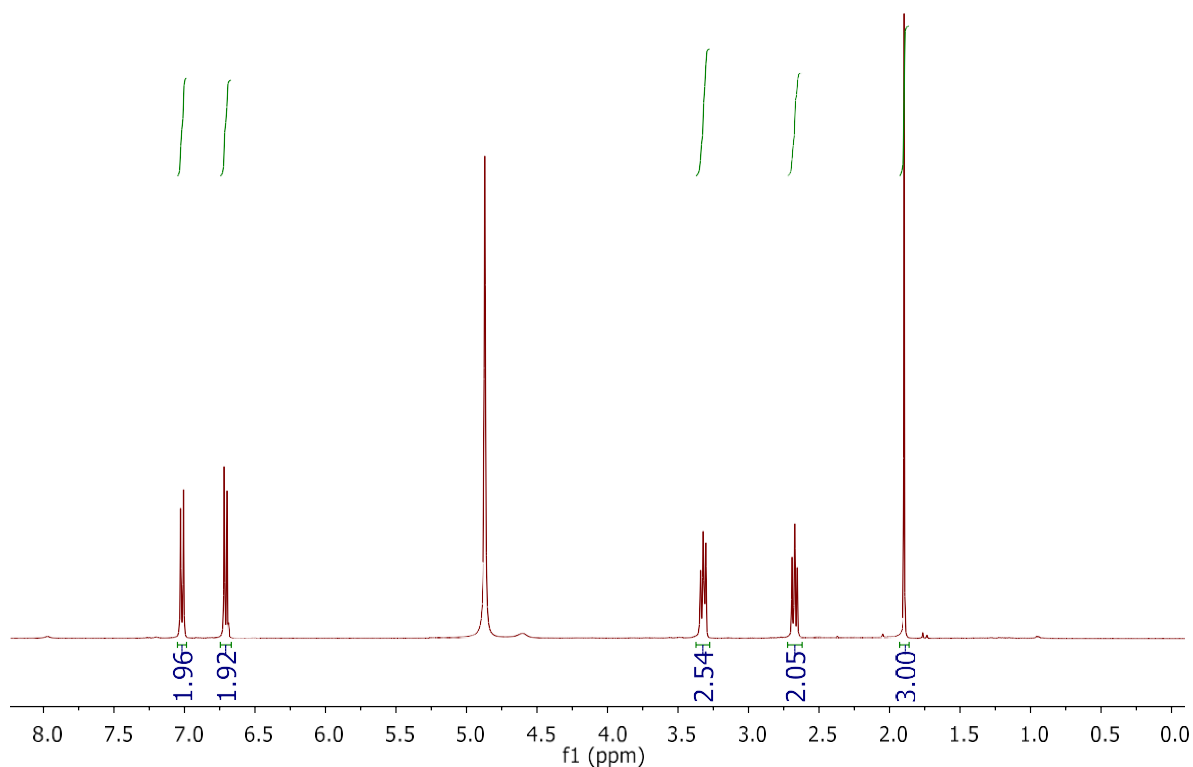
A análise desses deslocamentos químicos, juntamente com a comparação com dados da literatura, indicou que a substância isolada corresponde à N-acetil-tiramina, um derivado da L-tirosina (Figura 6.15). Este composto é caracterizado pela presença de um grupo amida (acetila) conectado a uma cadeia lateral etilamina, configurando uma estrutura para-substituída no anel aromático (RAN et al., (2022).

Figura 6.13: Estrutura química da N-acetiltiramina (S8).



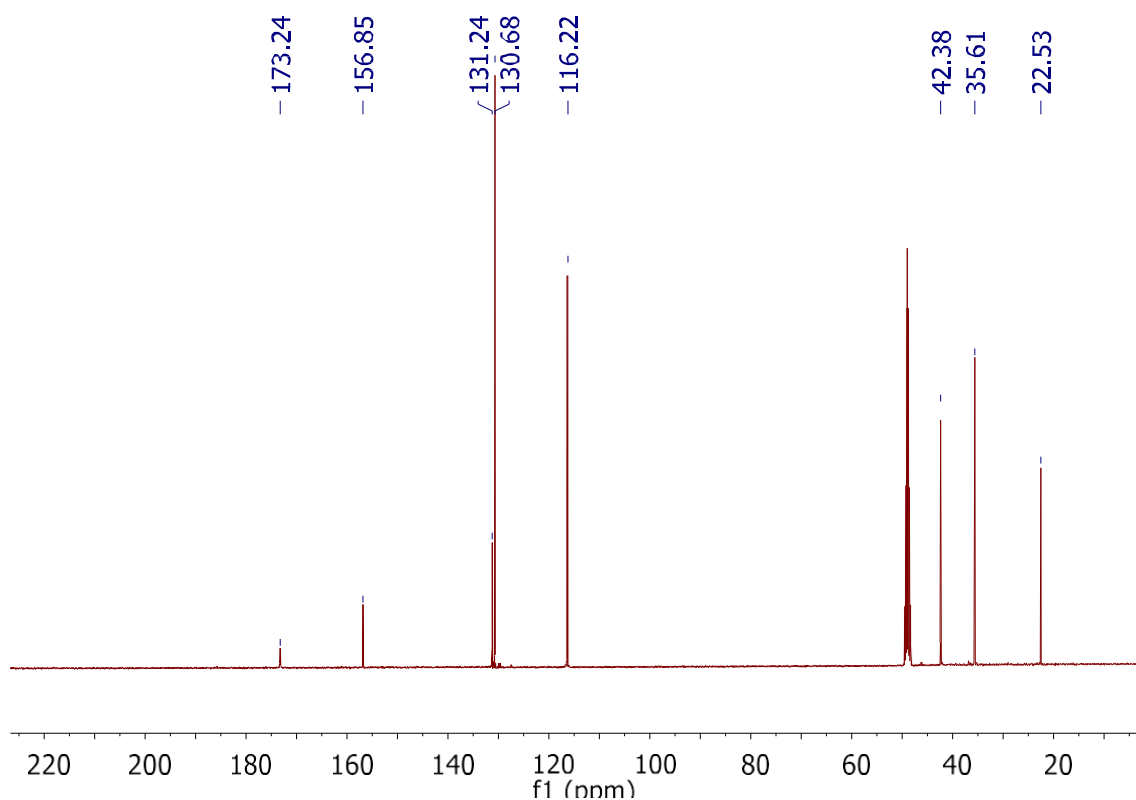
Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.14: Espectro de RMN 1H da N-acetil-tiramina.



Fonte: A autora, 2025.

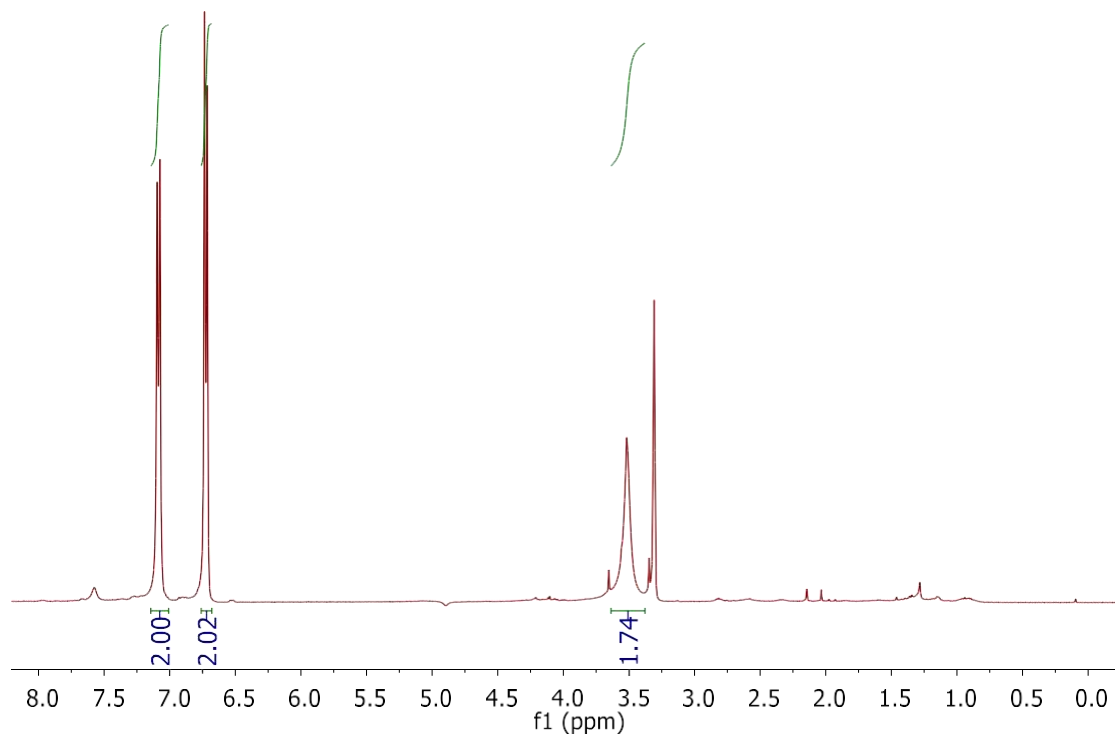
Figura 6.15: Espectro de RMN ^{13}C da n-acetiltiramina.



Fonte: A autora, 2025.

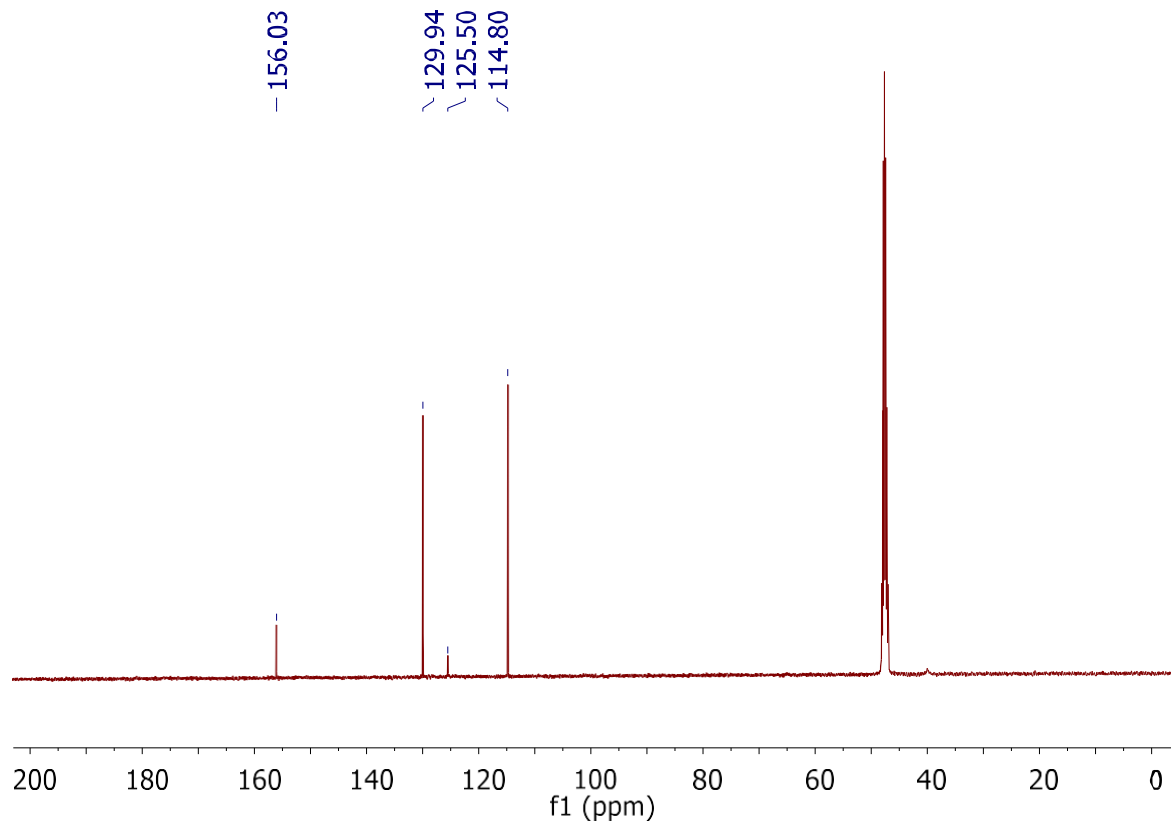
A substância S9 foi isolada na forma de um óleo amarelo, cuja caracterização foi realizada por espectroscopia de RMN. Os dados de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) (Figura 6.16) revelaram deslocamentos químicos em: δ 6,87 ppm (2H, dd, $J = 8,8$ Hz, H-3 e H-5) e δ 6,68 ppm (2H, dd, $J = 8,8$ Hz, H-2 e H-6), indicando um sistema aromático simétrico. Os dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) (Figura 6.17) mostraram sinais em δ 156,03 ppm (C, C-4), δ 129,94 ppm (CH, C-3 e C-5), δ 125,50 ppm (CH, C-2 e C-6) e δ 114,80 ppm (C, C-1), que são consistentes com a presença de um núcleo aromático substituído, com os carbonos C-3 e C-5, C-2 e C-6 apresentando sinais para carbonos ligados a hidrogênios (CH), e os carbonos C-1 e C-4 apresentando sinais para carbonos diretamente envolvidos com os grupos substituintes. Esses dados confirmam a estrutura do composto como sendo um derivado aromático com substituições nas posições *para* típicas do *p*-aminofenol. A comparação desses dados com informações presentes na literatura permitiu a conclusão de que a substância isolada é, de fato, o *p*-aminofenol (Figura 6.18), um composto aromático amplamente estudado e caracterizado pela presença de um grupo amino ($-\text{NH}_2$) na posição *para* em relação ao grupo hidroxila ($-\text{OH}$) no anel benzênico.

Figura 6.16: Espectro de RMN de ^1H do *p*-aminofenol (S9).



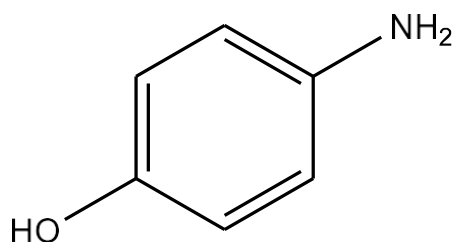
Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.17: Espectro de RMN ^{13}C do *p*-aminofenol.



Fonte: A autora, 2025.

Figura 6.18: Estrutura química do *p*-aminofenol (S9).



Fonte: A autora, 2025.

6.4 Conclusão parcial: cultivo sob luz UV-A e na presença de cátions

A comparação entre os cultivos expostos à luz UV-A e aqueles mantidos na ausência de luz revelou diferenças significativas tanto no perfil metabólico quanto na morfologia do fungo, evidenciando sua capacidade adaptativa frente às condições ambientais impostas. Morfologicamente, a exposição à luz UV-A promoveu um aumento expressivo na produção micelial, indicando que a luminosidade pode atuar como um sinalizador ambiental capaz de modular o crescimento do fungo.

Quando o estresse luminoso foi associado à presença de cátions metálicos, padrões de resposta ainda mais específicos foram identificados. Em meio contendo cobalto, o desenvolvimento do fungo foi completamente inibido, independentemente das condições de luminosidade, sugerindo uma toxicidade elevada desse cátion para o micro-organismo. Já no meio com manganês, o crescimento foi observado apenas na ausência de luz, apontando para uma possível interação entre o estresse luminoso e a presença desse metal que prejudica o crescimento do fungo sob irradiação UV-A.

Com relação ao metabolismo do fungo, os resultados reafirmaram a produção consistente de meroterpenos austina, deidroaustina e acetoxideidroaustina, que também foram detectados em cultivos previamente descritos. Esses compostos reforçam o perfil químico característico do fungo *Talaromyces sp.* e sua capacidade de biossíntese desses metabólitos.

Adicionalmente, análises realizadas por meio da plataforma GNPS permitiram identificar outras classes metabólicas como nucleosídeos e derivados da L-tirosina. A detecção desses metabólitos destaca a diversidade do perfil químico do fungo, sugerindo uma diversidade de rotas biossintéticas ativas que podem ser moduladas pelas condições de cultivo.

Esses resultados indicam que tanto a luz quanto os cátions metálicos exercem papéis interdependentes na regulação do metabolismo e no desenvolvimento morfológico do *Talaromyces sp.*, ressaltando a complexidade das respostas adaptativas desse micro-organismo a múltiplos fatores.

CAPÍTULO 7

7 ENSAIO ANTIBACTERIANO

O potencial antibacteriano das frações e óleos essenciais foi avaliado utilizando o método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações descritas no *Guideline of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)*.

7.1 Ativação das bactérias

As bactérias testadas gram-positiva *S. aureus* e gram-negativa *E. coli* foram ativadas em placa de Petri de 9cm de diâmetro, contendo meio de Muller-Hinton ágar (MHA), por um período de 24h. Após esse tempo foram transferidas, com o auxílio de uma alça estéril, aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaio contendo 3mL de caldo Muller-Hinton (MH) e foram incubadas em estufa a 36°C por um período de 24h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias).

7.2 Padronização das culturas

Primeiramente preparou-se uma solução de sulfato de bário em uma concentração referente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para se obter essa concentração foi necessário fazer uma mistura das soluções de ácido sulfúrico – cloreto de bário H_2SO_4 1% (9,95mL) e $BaCl_2$ 1% (0,05mL). Feito isso comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o do padrão contendo sulfato de bário. Com essa padronização o tubo contendo a bactéria apresentará uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC.

7.3 Preparo das amostras

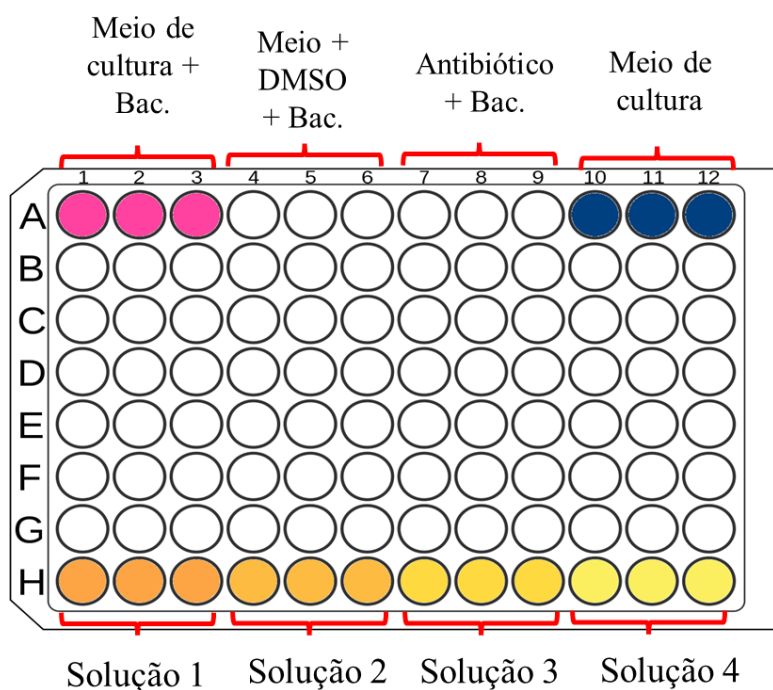
A partir de 500 µg dos COV's, e das frações obtidas dos cultivos realizados neste trabalho, foram cuidadosamente transferidas para tubos de Eppendorf estéreis, onde foram dissolvidas em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura inicial foi homogeneizada utilizando um vórtex, garantindo a completa solubilização do material e promovendo a uniformidade da solução. Em seguida, adicionaram-se 950 µL de caldo MH estéril ao tubo, com o objetivo de diluir a solução a uma concentração adequada para os ensaios antibacterianos. Após a adição do meio, a mistura foi novamente agitada em vórtex, assegurando uma dispersão

homogênea da fração no caldo e permitindo que a solução ficasse pronta para as etapas subsequentes de análise.

7.4 Teste em microplaca de 96 poços

Para a realização desse ensaio biológico utilizamos a linha A1 até A12 como controle negativo (MH), controle positivo (MH +bactéria), controle do antibiótico (MH + clorexidina + bactéria) e controle do DMSO (MH + DMSO + bactéria) conforme visualizado na Figura 7.1. Já na linha B1 em diante, os poços foram destinados para aplicação das amostras. Foram adicionados 100 μ L de cada solução (triplicata) e 5 μ L da suspensão bacteriana. Após 24h de incubação, foram adicionadas 5 μ L de resazurina em cada, e armazenada na estufa por 30 min para a ativação da coloração do poço.

Figura 7.1: Representação da placa de 96 poços.



Fonte: A autora, 2025.

7.5 Resultados

Os resultados dos ensaios biológicos para avaliar a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* estão presentes na Tabela 7.1. Vemos que apenas as frações L9-AC e L9-AD apresentaram, em nível moderado, atividade antibacteriana específica, em particular, atividade bacteriostática contra *S. aureus*. Grande parte das amostras, no entanto, não apresentaram qualquer efeito sobre *S.*

aureus, sugerindo que, nestas amostras, os componentes ativos antibacterianos podem estar ausentes, ou mesmo presentes em concentrações insuficientes.

Nota-se ainda que, com relação à bactéria *E. coli*, nenhuma das amostras apresentou atividade antibacteriana, sugerindo que os compostos presentes nas amostras não são eficazes contra esta bactéria, ao menos quando consideramos a concentração testada (500 µg/mL).

A seletividade observada pode ser atribuída às diferenças celulares entre bactérias *S. Aureus* e *E. coli*. Além disso, a eficácia limitada contra *E. coli* sugere a necessidade de explorar concentrações mais altas ou combinações de compostos para alcançar uma atividade antibacteriana mais ampla. Esses resultados podem, portanto, orientar futuras pesquisas e auxiliar o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Tabela 7.1: Frações ensaiadas com *S. aureus* e *E. coli*.

AMOSTRAS (500 µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
L9-A	-	-
L9-B	-	-
L9-C	+	-
L9-D	+	-
L9-E	-	-
L9-F	-	-
L9LL-A	-	-
L9LL-B	-	-
L9LL-C	-	-
L9LL-D	-	-
L9LL-E	-	-
L9LL-F	-	-
L9-AL	-	-
L9-BL	-	-
L9-CL	-	-
L9-DL	-	-
L9-EL	-	-
L9-FL	-	-

Fonte: A autora, 2025

CAPÍTULO 8

8 CONCLUSÃO

Nesta tese, investigamos a diversificação metabólica do fungo *Talaromyces sp.*, sob a influência e ação combinada de fatores abióticos, particularmente radiação UV-A e cátions metálicos. O objetivo foi compreender como esses fatores influenciaram a produção de metabólitos. Para isso, experimentos foram conduzidos sob diferentes condições de cultivo, utilizando meios sólidos e líquidos suplementados com Mn^{2+} e Co^{2+} , além de variações na exposição à luz UV-A. Os COV's foram analisados utilizando técnicas avançadas de espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática, como *MetaboAnalyst* e *GNPS*, com o intuito de identificar alterações metabólicas e agrupamentos químicos.

Observou-se inibição do crescimento do fungo em meio líquido de Czapeck suplementado com Co^{2+} , enquanto o cultivo em meio sólido de arroz resultou em uma produção diversificada de sesquiterpenos e ácidos graxos, evidenciando alterações metabólicas induzidas pelos fatores abióticos. A análise por PCA revelou que tanto a luz UV-A quanto os cátions metálicos influenciam a produção metabólica, gerando perfis químicos distintos. As redes moleculares geradas demonstraram uma redução no número de nodos nas condições de estresse por Co^{2+} e Mn^{2+} , mas também preservaram rotas robustas, como a produção de meroterpenos (austina, dehidroaustina e acetoxidehidroaustina). Além disso, os dados indicaram a presença de um grupo metabólico contendo produtos derivados da L-tirosina, como N-acetiltiramina e *p*-aminofenol.

Os COV's e os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos para avaliar a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, revelando uma atividade seletiva contra *S. aureus*, embora em níveis moderados. Os resultados obtidos reforçam a importância de explorar fatores abióticos, como radiação UV-A e cátions metálicos, na modulação do metabolismo secundário de fungos extremófilos como *Talaromyces sp.* A capacidade do fungo em ajustar sua produção metabólica às condições do ambiente, mantendo rotas críticas como a dos meroterpenos, reflete sua extraordinária adaptabilidade.

Este estudo contribui para o entendimento de como as condições de cultivo influenciam a produção de metabólitos e oferece subsídios para futuras pesquisas e potenciais aplicações. Em última análise, demonstra que a integração de abordagens experimentais com ferramentas analíticas avançadas é fundamental para explorar o potencial metabólico de fungos em condições desafiadoras.

REFERÊNCIAS

BERLEMONT, R., PIPERS, D., DELSAUTE, M., ANGIO, F., FELLER, G., GALLEN, M., POWER, P. Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of 73 novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. *Revista Argentina de microbiologia*, v. 43, n. 2, p. 94–103, 2011.

BRIDGE, P. D.; SPOONER, B. M.; ROBERTS, P. J. Non-lichenized fungi from the Antarctic region. *Mycotaxon*, v. 106, p. 485–490, 2008.

BRUNATI et al. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. 2009.

CERÓN-BUSTAMANTE, M. E. BALDUCCI, E., BECCARI, G., NICHOLSON, P., COVARELLI, L., BENINCASA, P. Effect of light spectra on cereal fungal pathogens, a review. *Fungal Biology Reviews*, 43 (2023).

CHANG, S.T; MILES, P. G. Mushrooms – cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. **Boca Raton**: CRC Press, 2nd ed., 2004

CHAUD, L.; LARIO, L. D.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, v. 33, p. 807- 814, 2016.

CHEXAL, K. K.; SPRINGER, J. P., CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; DORNER, J. W.; CUTLER, H. G. & STRAWTER, B. J. Austin, a novel polyisoprenoid mycotoxin from *Aspergillus ustus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 270, 1976.

CHEONG, K, H.; STRUB, C; MONTET, D; DURAND, N; ALTER, P.; MEILE, J.; GALINDO, S. S.; FONTANA, F. Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus westerdijkiae*. **FUNGAL BIOLOGY**, 1 2 0, 7 4 5 -7 5 1, 2016.

CHRISTENSEN M (1989). A view of fungal ecology. *Mycologia*, 81:1-19.

CULOTTA, V. C.; DALY, M. J. “Manganese Complexes: Diverse Metabolic Routes to Oxidative Stress Resistance in Prokaryotes and Yeast”. **Antioxidants & redox signaling**, 00, 2013.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3ed. 2008.

DUBEY, M. K.; MEENA, M.; AAMIR, M.; ZEHRA, A.; UPADHYAY, R. S. Chapter 19 - Regulation and Role of Metal Ions in Secondary Metabolite Production by Microorganisms. **Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications**, Elsevier, 2019, p.259.

FANELLI, F.; SCHMIDT-HEYDT, M.; HAIDUKOWSKI, M.; SUSCA, A.; GEISEM, R.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **FUNGAL BIOLOGY**. 116, 241-248, 2012.

FELLER, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. **Scientifica**, v. 2013, p. 512840, 2013.

FILL, T. P.; PALLINI, H. F.; AMARAL, L. S.; SILVA, J. V.; BIDÓIA, D. L.; PERON, F.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; RODRIGUES FILHO, E. 167. "Copper and Manganese Cations Alter Secondary Metabolism in the Fungus *Penicillium brasilianum*". **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27(8), 2016.

FOSTER, A. W.; OSMAN, D.; ROBINSON, N. J. "Metal Preferences and Metallation". **The Journal of Biological Chemistry**, 289(41):28095, 2014.

FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G.; ROSA, L. H. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 775–787, 2014.

GERIS, R. M. S. METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS *Penicillium* sp E *Fusarium* moniliforme ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Melia azedarach* (MELIACEAE). Tese de Doutorado – PPGQ UFSCar. 453p., 2003

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. "Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*". **Microbiological Research**, 160 (3): 243, 2005.

GODINHO, V. M. et al. Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. **Fungal Biology**, maio 2019.

GOMAA, O.M., JASSIM, A.Y. & CHANDA, A. Bioremoval of PVP-coated silver nanoparticles using *Aspergillus niger*: the role of exopolysaccharides. **Environ Sci Pollut Res** 29, 31501–31510 (2022).

GOMES, E. C. Q. et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 381–393, 13 maio 2018.

GREN, T., OSTASH, B., HRUBSKYY, Y., TISTECHOK, S., FEDORENKO V. **Folia Microbiol.**, 2014, 59, 147–153.

HAGIWARA, S.; TAKAHASHI, M.; SHEN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZUSAKA, A.; TERAZAWA, M. A phytochemical in the Edible Tamogi–take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1603 – 1605, 2005.

HAN, Y. B.; BAI, W.; DING, C. X.; LIANG, J.; Wu, S. H. & TAN, R. X. Intertwined biosynthesis of skyrin and rugulosin A underlies the formation of cage-structured

bisanthraquinones. **Journal of the American Chemical Society**. v. 143 n. 35. p. 14218-14226. 2021.

HAYASHI, H.; MUKAIHARA, M.; MURAO, S.; ARAI, M.; LEE, A & CLARDY, J. Acetoxydehydroaustin, a new bioactive compound, and related compound neosaustin from *Penicillium* sp. MG-11. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 58(2): 334-338, 1994.

HE, J. et al. Two New Coumarins from *Talaromyces flavus*. **Molecules**, v. 2, n. 19, p. 20880–20887, 2014.

KLAUS FIEDLER, EDGAR SCHÜTZ, STEFAN GEH, Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Volume 204, Issues 2–3, 2001, Pages 111-121

KOOLEN, H. H. F. et al. Talaroxanthone, a Novel Xanthone Dimer from the Endophytic Fungus *Talaromyces* sp. Associated with *Duguetia stelechantha* (Diels) R. E. Fries. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 24, n. 5, p. 880–883, 2013.

JIE, M. Z. et al. The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2016.

JOFFE, A. Z., & LISKER, N. (1969). Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro. **Applied Microbiology**, 18(3), 517-518.

KIM, H. SON, H.; LEE, Y, -W. Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. **Journal of applied Microbiology**, 116, 380-389, 2013.

KOSTADINOVA, N. et al. Comparison of the oxidative stress response of two Antarctic fungi to different growth temperatures. **Polish Polar Research**, v. 38, n. 3, p. 393–408, 1 set. 10 2017.

LAMBERT, S.; TRAXLER, M. F.; CRAIG, M.; MACIEJEWSKA, M.; ONGENA, M.; VAN WEZEL, G. P.; KOLTER, R.; RIGALI, S. **Metallomics**, 2014, 6, 1390–1399.

LI Y, SUN B, LIU S, JIANG L, LIU X, ZHANG H, CHE Y (2008) Bioactive asterric acid derivatives from the Antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. **J Nat Prod** 71:1643–1646.

LIMA, A. M. DIFERENCIAÇÃO ABIÓTICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM *Aspergillus aculeatus* E *Penicillium brasilianum* UTILIZANDO SAIS INORGÂNICOS, Dissertação de Mestrado – PPGQ UFSCar. 191p., 2020.

LIRA, D. P. CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ORGANISMOS MARINHOS: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB, 2013. Tese de doutorado, 178 p.

- LIU JT, HU B, GAO Y, ZHANG JP, JIAO BH, LU XL, LIU XY (2014) Bioactive tyrosine-derived cytochalasins from fungus *Eutypella* sp. D-1. **Chem Biodivers**, 11(5):800-6.
- MACHELEIDT, J., MATTERN, J. D., FISCHER, J., NETZKER, T., WEBER, J., SCHROECKH, V. VALIANTE, V., BRAKHAGE, A. A. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. **Annual 5 Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 371–392, 23 nov. 2016.
- MAGGI, O., TOSI, S., ANGELOVA, M., LAGOSTINA, E., FABBRI, A. A., LORENZO PECORARO, L. (2013). Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. **Plant Biosystems**, 147(1), 247-258.
- MENEZES, G. C., GODINHO, V. M., PORTO, B.A. *et al.*, *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles** 2017;**21**:259–269.
- MING-MING ZHAI, JIE LI, CHUN-XIAO JIANG, YAN-PING SHI, DUO-LONG DI, PHILLIP CREWS & QUAN-XIANG WU. The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. **Natural Products and Bioprospecting**. Vol. 6, pages1–24. 2016.
- MORGENSTERN, A.; PAETZ, C.; BEHREND, A.; SPITELLER, D. “Divalent Transition-Metal-Ion Stress Induces Prodigiosin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145: Formation of Coeligiosins”. **Chemistry A European Journal**, 21 (16): 6027, 2015.
- OGAKI M. B., *et al.* Marine Fungi Associated with Antarctic Macroalgae. In: CastroSowinski S. (eds) 6The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment. **Springer Polar Sciences** 2019; Springer, Cham
- PAN, R. *et al.* Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1 – 20, 26 fev. 2019.
- PITT, J. in *Penicillium and Talaromyces: Introduction, Penicillium*, **Encyclopedia of Food Microbiology** (2nd edn) (2014), pp. 6–13
- PURIĆ, J. *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 530–536, jun. 2018.
- SINGH O V., GABANI P. Extremophiles: Radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. **J Appl Microbiol**. 2011.
- QIN H, HU T, ZHAI Y, LU N, ALIYEVA J. The improved methods of heavy metals removal by biosorbents: A review. *Environ Pollut*. 2020 Mar;**258**:113777
- RAN, Y. *et al.* Nematicidal Metabolites from the Actinomycete *Micromonospora* sp. WH06. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, 2022.
- REN J, XUE C, TIAN L, XU M, CHEN J, DENG Z, PROKSCH P, LIN W (2009) Asperelines A–F peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*. **J Nat Prod**, 72:1036–1044.

ROBINSON CT, Gessner MO, Callies Ka Jolidon C, Ward JV. Larch needle breakdown in contrasting streams of an alpine glacial floodplain. **J N Am Benthol Soc**, 19:250–262, 2000.

ROSA LH, Zani CL, Cantrell CL, Duke SO, Van Dijck P, Desideri A, Rosa CA. Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. In: Rosa LH (Ed) Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications. **Springer Nature Switzerland**, p.1-17, 2019

ROSA CA, ROSA LH. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, 16:95-103, 2012.

RUISI, S., BARRECA, D., SELBMANN, L. et al. Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6, 127–141, 2007.

SANTIAGO IF, ALVES TMA, RABELLO A, JUNIOR PAS, ROMANHA AJ, ZANI CL, STCHIGEL AM, CANO J, CORMACK WM, GARRO J (2001) *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, 105(3):377–382.

STCHIGEL AM, CANO J, MACCORMACK CW. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycol Res* 2001;105:377–382.

SELBMANN, L., EGIDI, E., ISOLA, D., ONOFRI, S., ZUCCONI, L., SYBREN DE HOOG, G. (2013). Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments. **Plant Biosystems**, 147(1), 237-246.

SOMMARUGA, R., LIBKIND, D., VAN BROOCK, M., & WHITEHEAD, K. (2004). Mycosporine-glutaminol-glucoside, a UV-absorbing compound of two *Rhodotorula* yeast species. **Yeast**, 21(13), 1077–1081.

TAO, H. et al. Penixanthonones A and B, two new xanthone derivatives from fungus *Penicillium* sp. SYFz-1 derived of mangrove soil sample. **Natural Product Research**, v. 31, n. 19, p. 2218–2222, 2 out. 2017.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiol Biotechnol**, 85, 1259-1277, 2010.

VARRELLA, S.; BARONE, G.; TANGHERLINI, M.; RASTELLI, E.; DELL'ANNO, A.; CORINALDESI, C. Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **J. Fungi**, 7, 391, 2021.

VELMURUGAN, P., LEE, Y. H., VENIL, C. H., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P, CHAE, J. & OH. BT. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-production filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 109(4), 346-350

VIRARAGHAVAN T, SRINIVASAN A. (2011) Fungal biosorption and biosorbents. Microbial biosorption of metals. **Springer**. p. 143–158

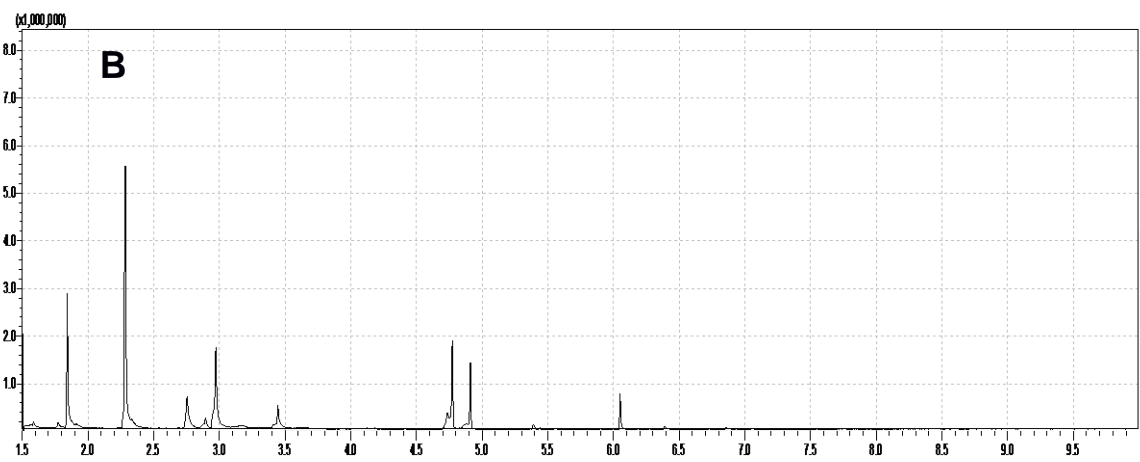
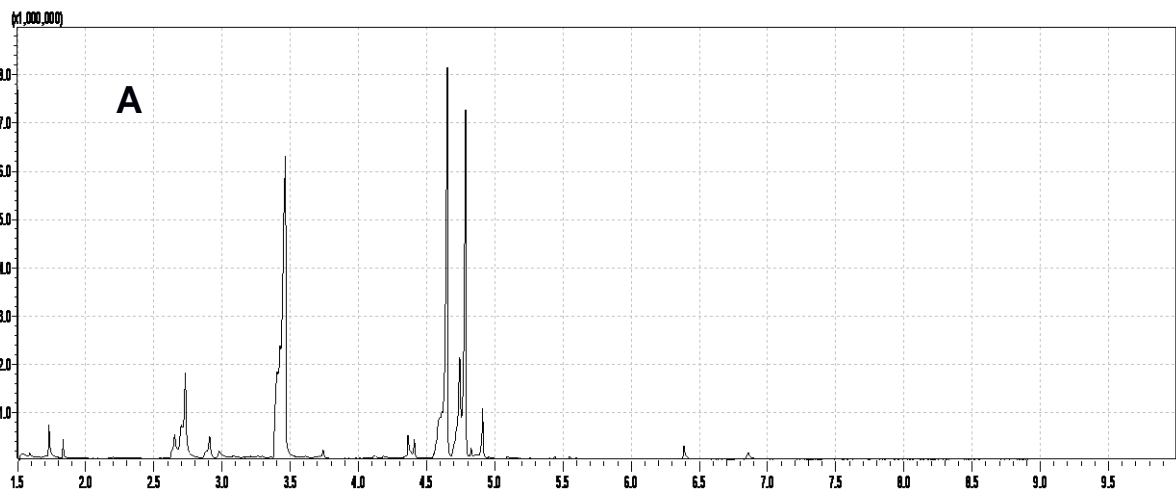
WENTZEL, L. C. P. et al. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 12–24, 19 jan. 2019.

YUSEF, H. M., & ALLAM, M. E. (1967). The effect of light on growth and sporulation

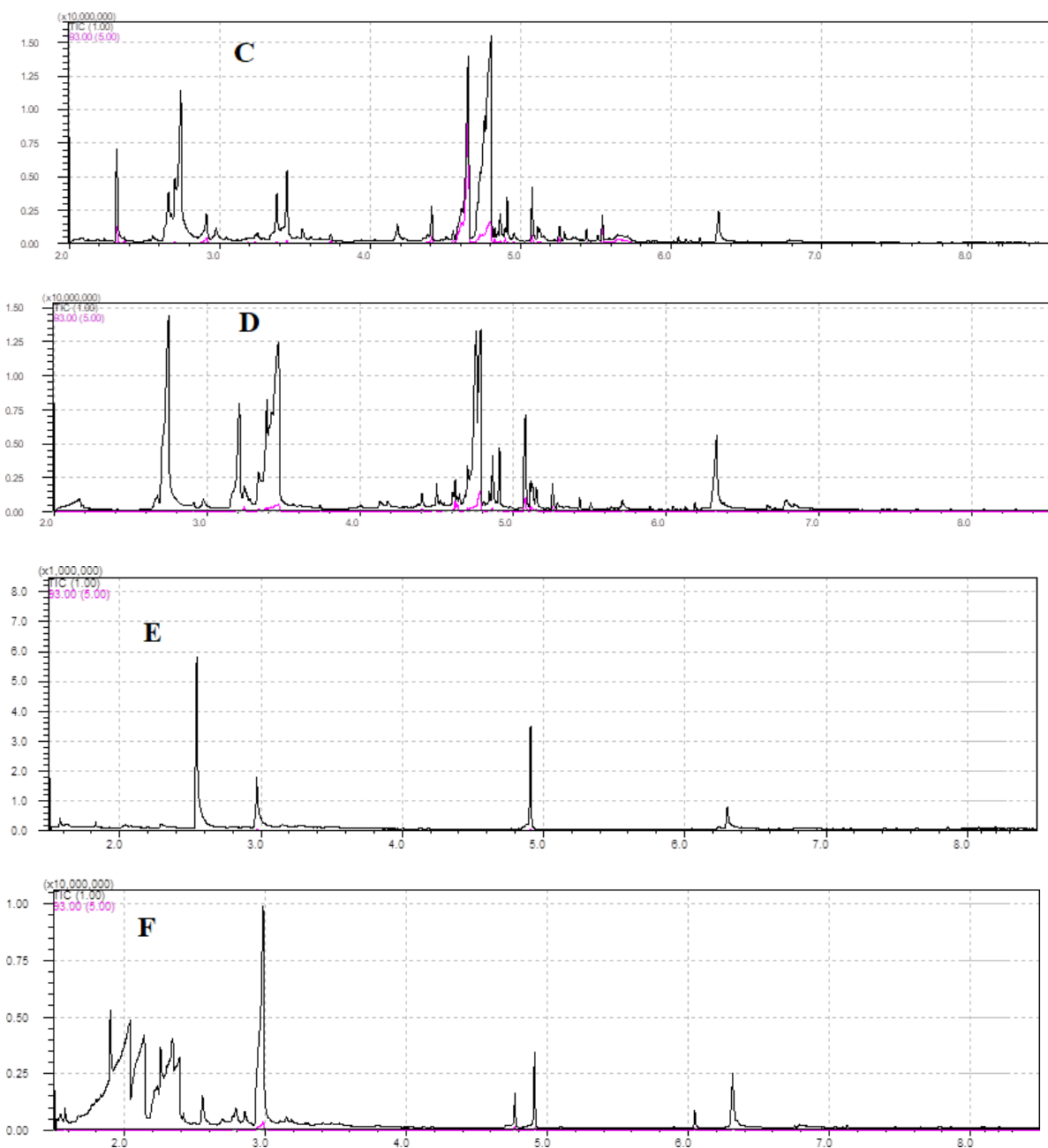
of certain fungi. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 33, 81–89.

ZHAI, M.; LI, J.; JIANG, C. The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces species*. **Natural Products and Bioprospecting**. v. 6. p. 1-24. 2016.

APÊNDICE 1: Cromatogramas dos COV' s do fungo *Talaromyces* sp. cultivado em meio sólido de arroz (A) e czapeck (B) sem a presença dos metais.

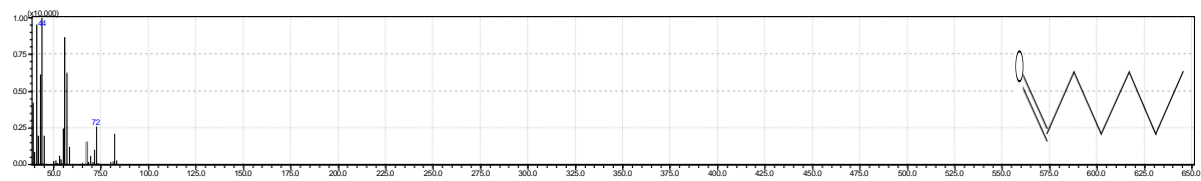


APÊNDICE 2: Cromatogramas do fungo *Talaromyces* sp. em meio sólido arroz contendo com 30 mmol de CoCl_2 (C) e 250 mmol de MnCl_2 (D) e, meio líquido czapeck contendo 30 mmol de CoCl_2 (E) e 250 mmol de MnCl_2 (F).

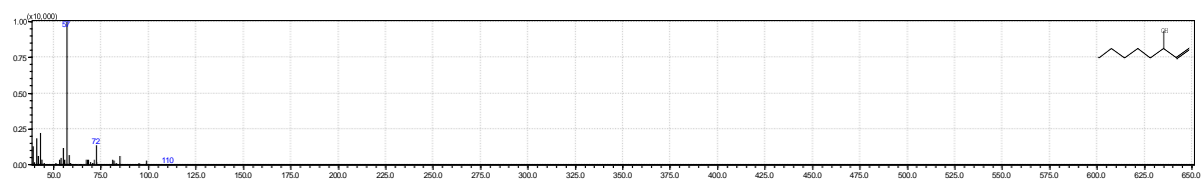


APÊNDICE 3: Espectros de fragmentação dos compostos orgânicos voláteis

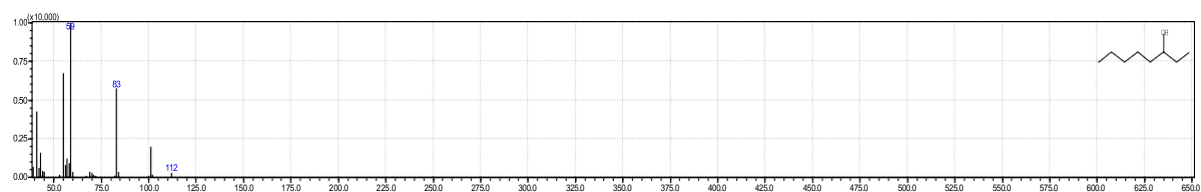
Hexanal



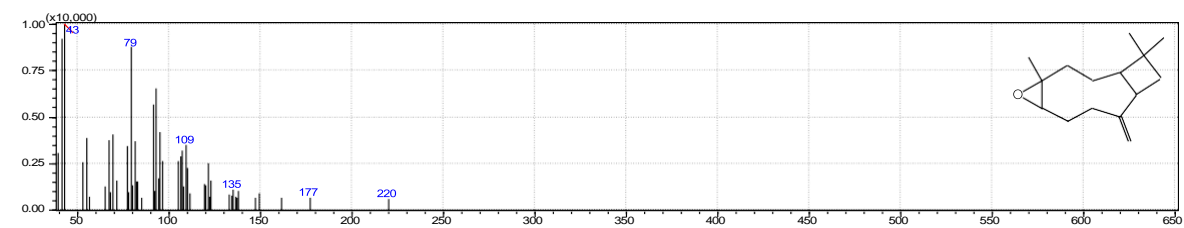
1-octen-3-ol



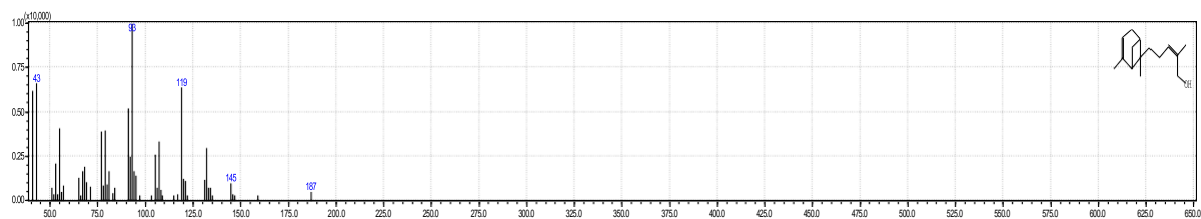
3-octanol



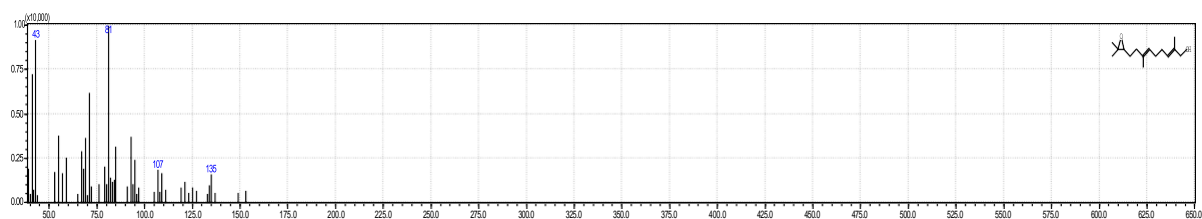
β -cariofileno



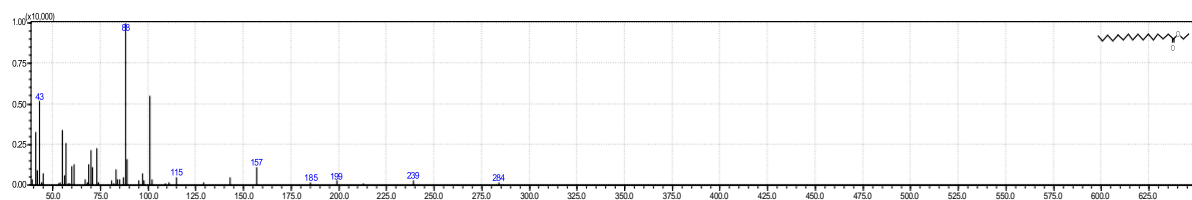
α -Bergamatol



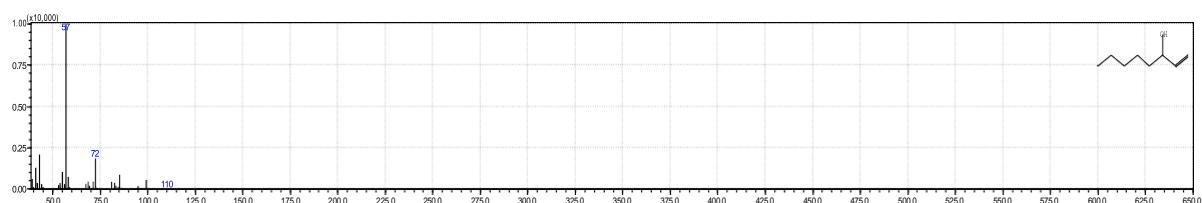
β -Bisabonelo



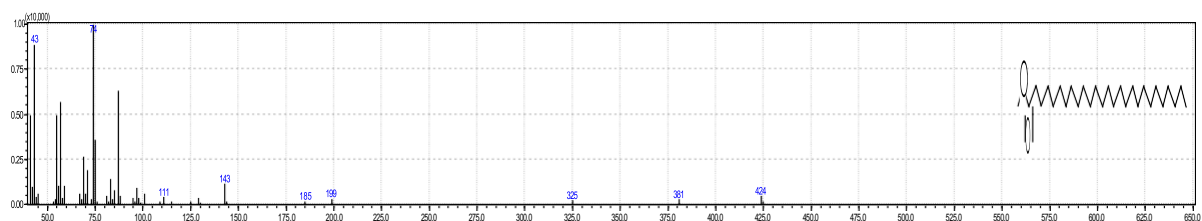
Ácido hexadecanoico



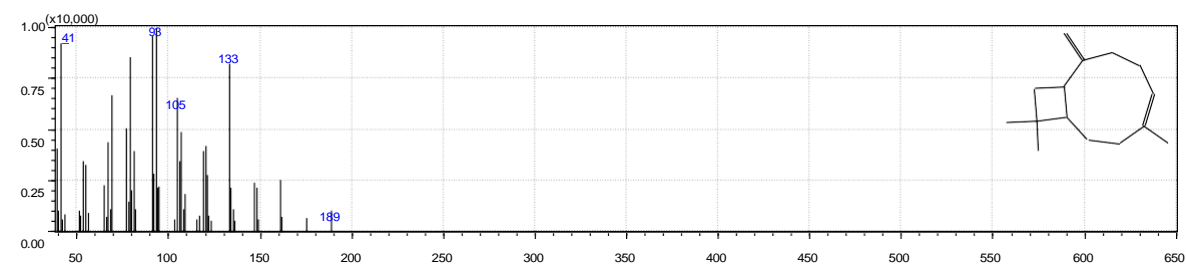
1-hexen-3-ol



Tetatriacontano

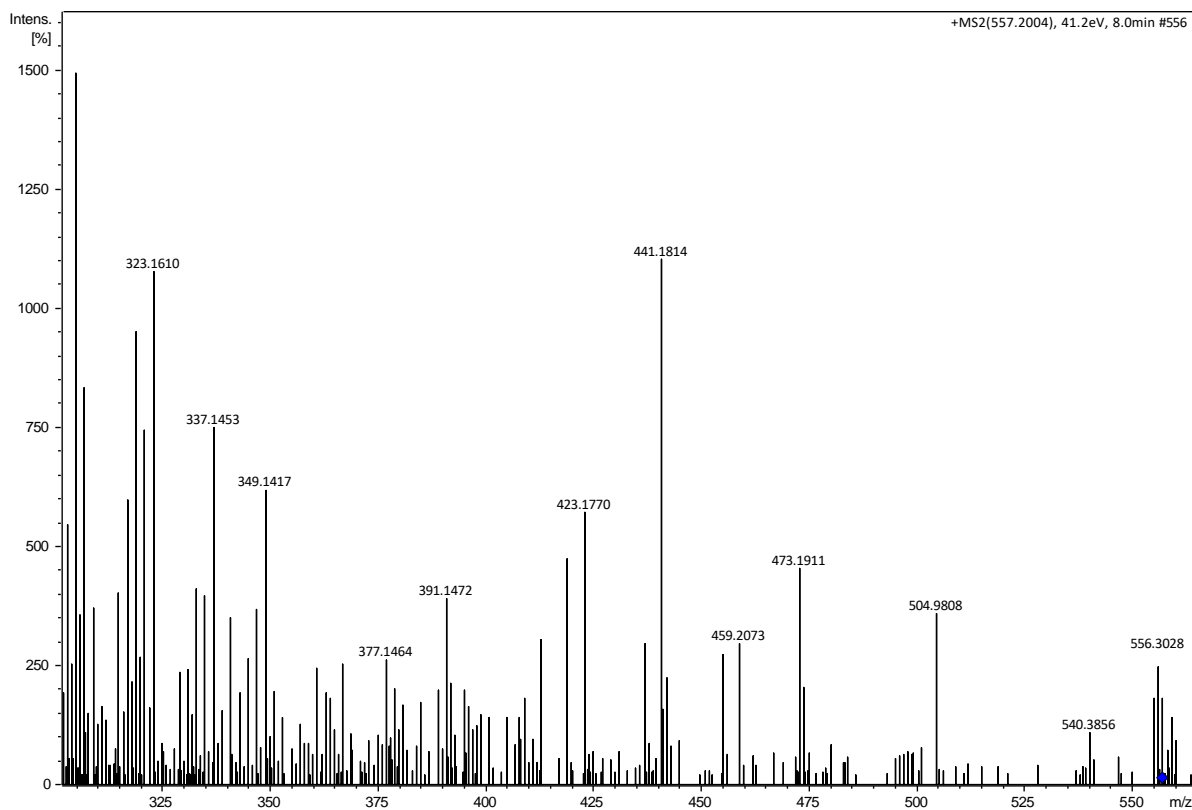


1H-Benzocycloheptene,2,4a,5,6,7,8,9,9a-octahydro-3,5,5-trimethyl-9-methylene-, (4aS-cis)

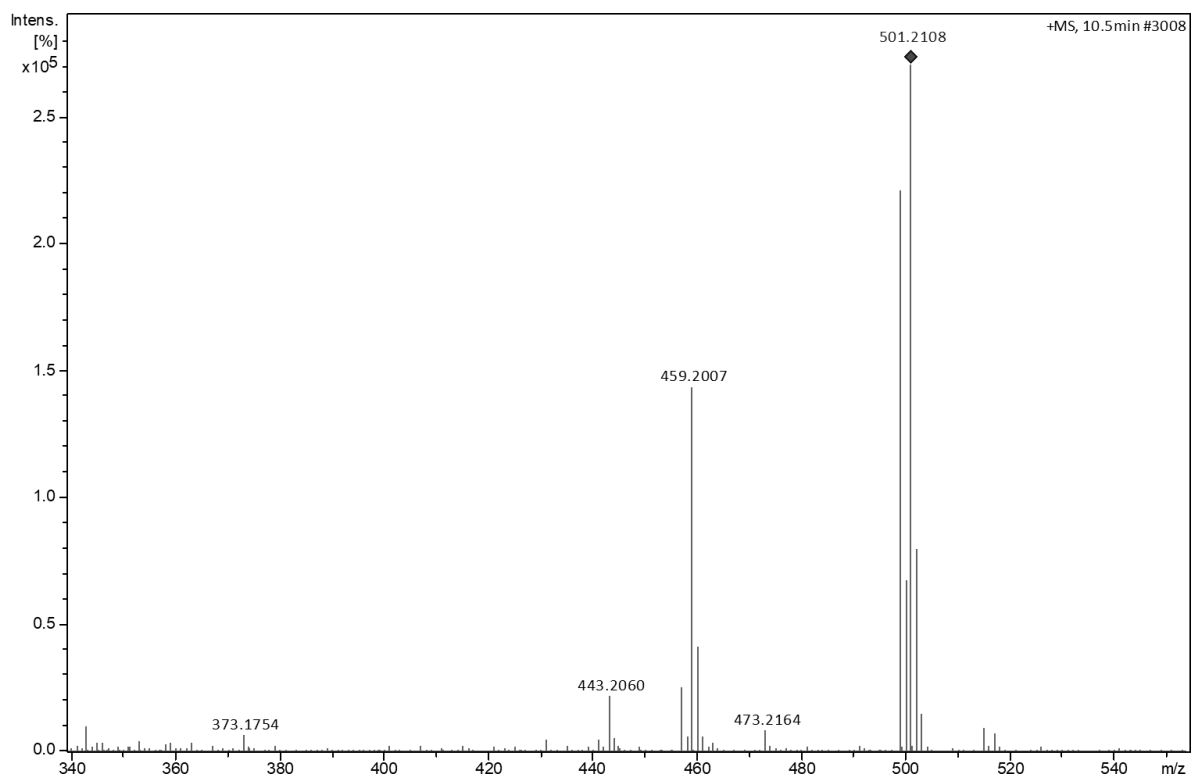


APÊNDICE 4: Espectros de massas dos meroterpenos anotados

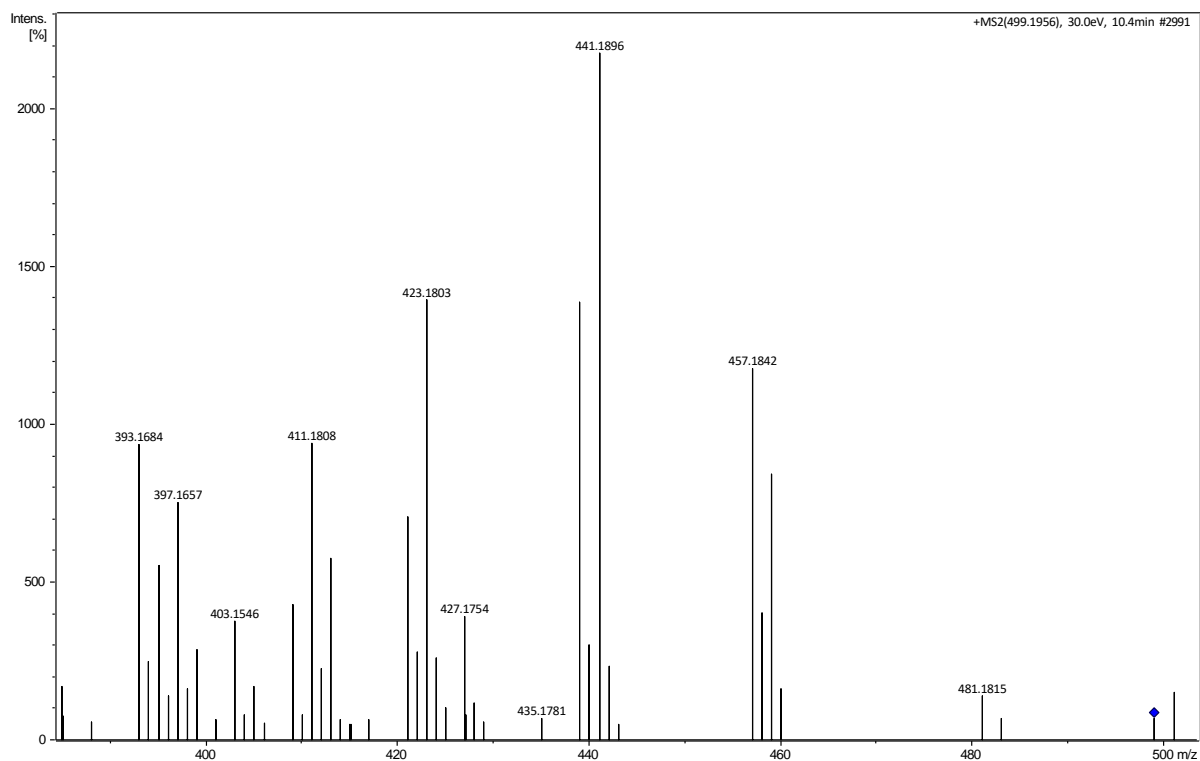
Acetoxidehidroaustina



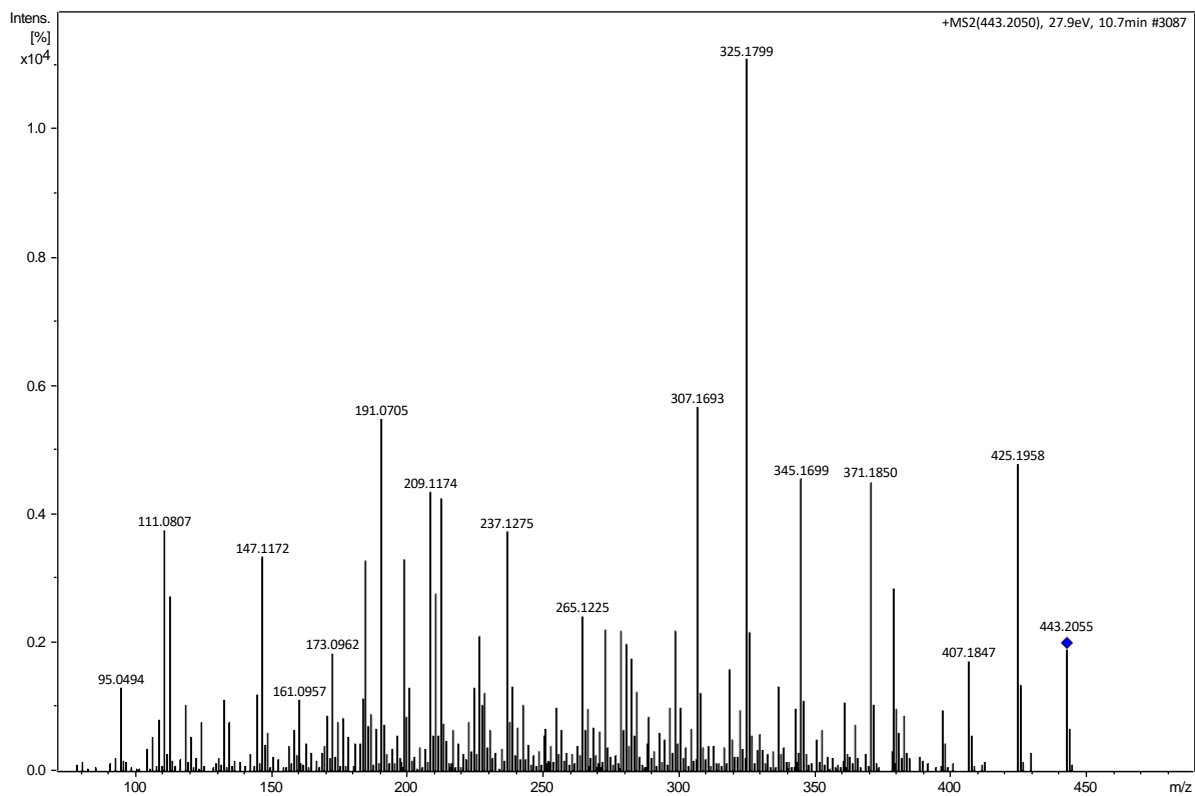
Austina



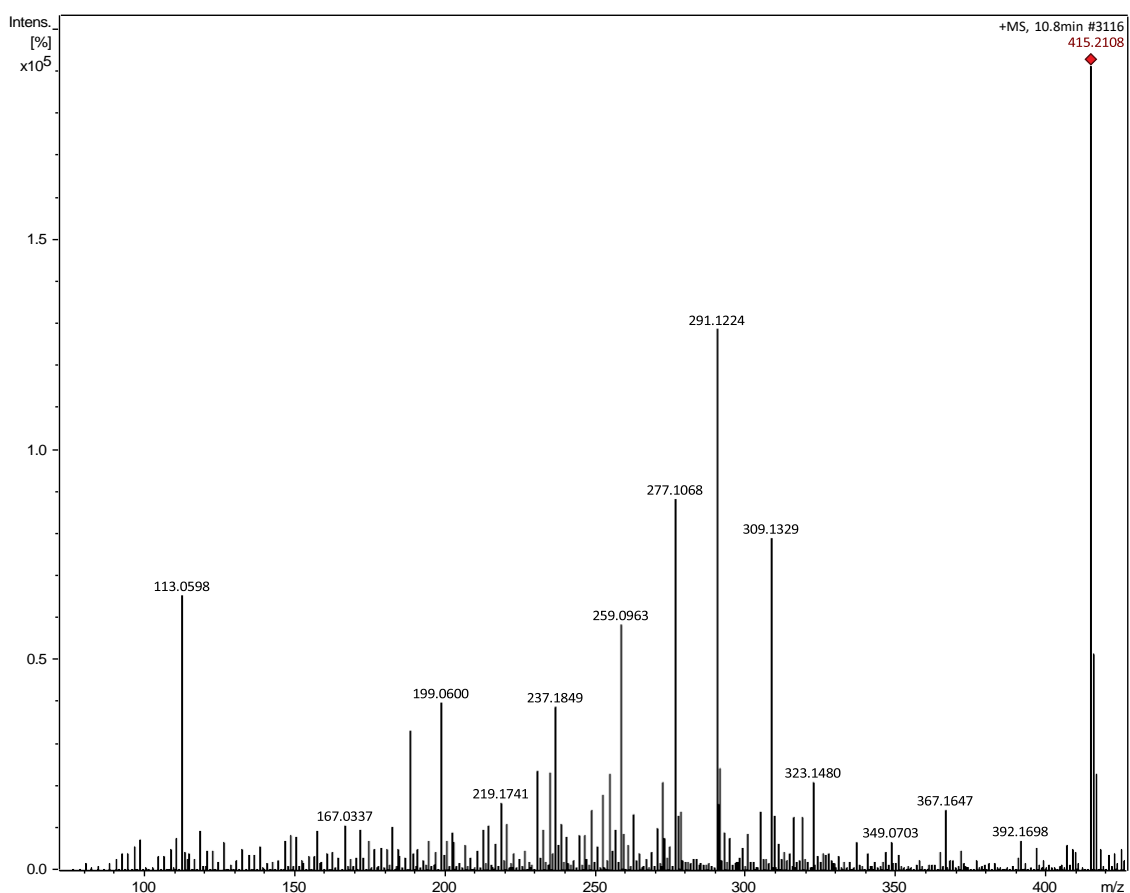
Dehidroaustina



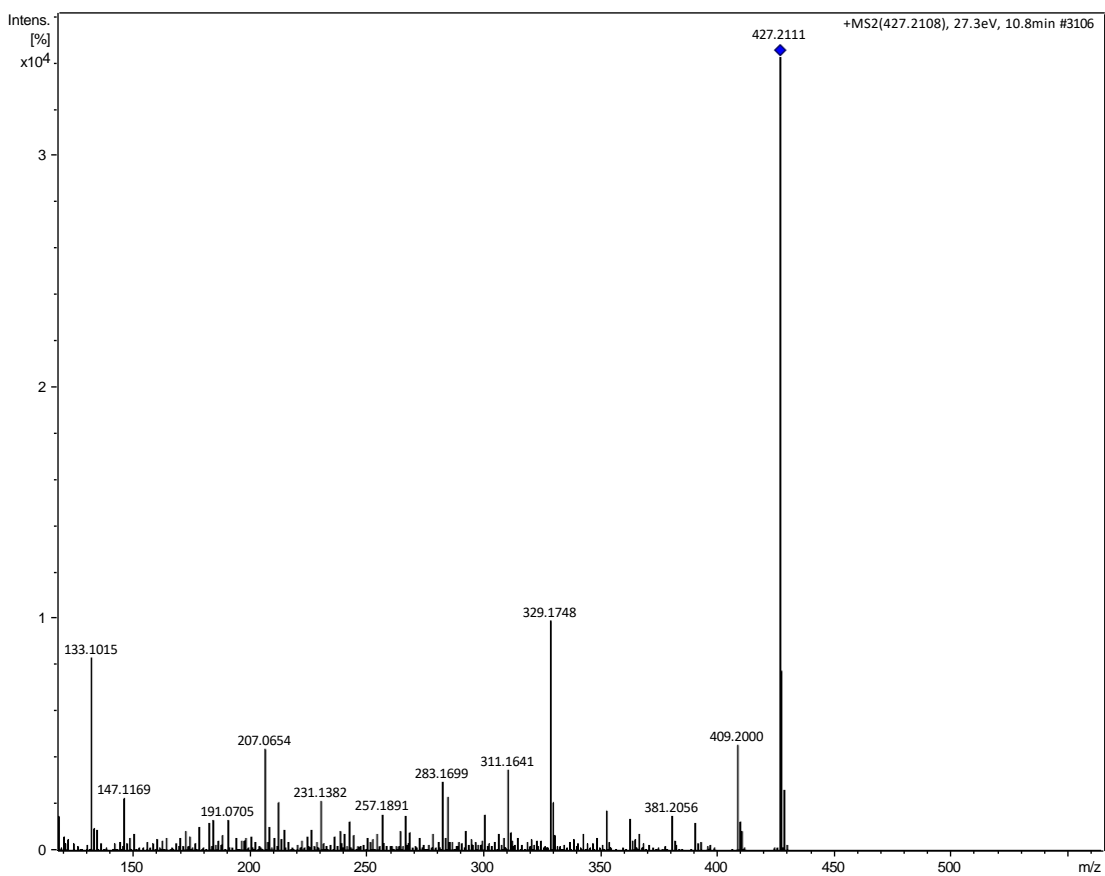
Austinolideo



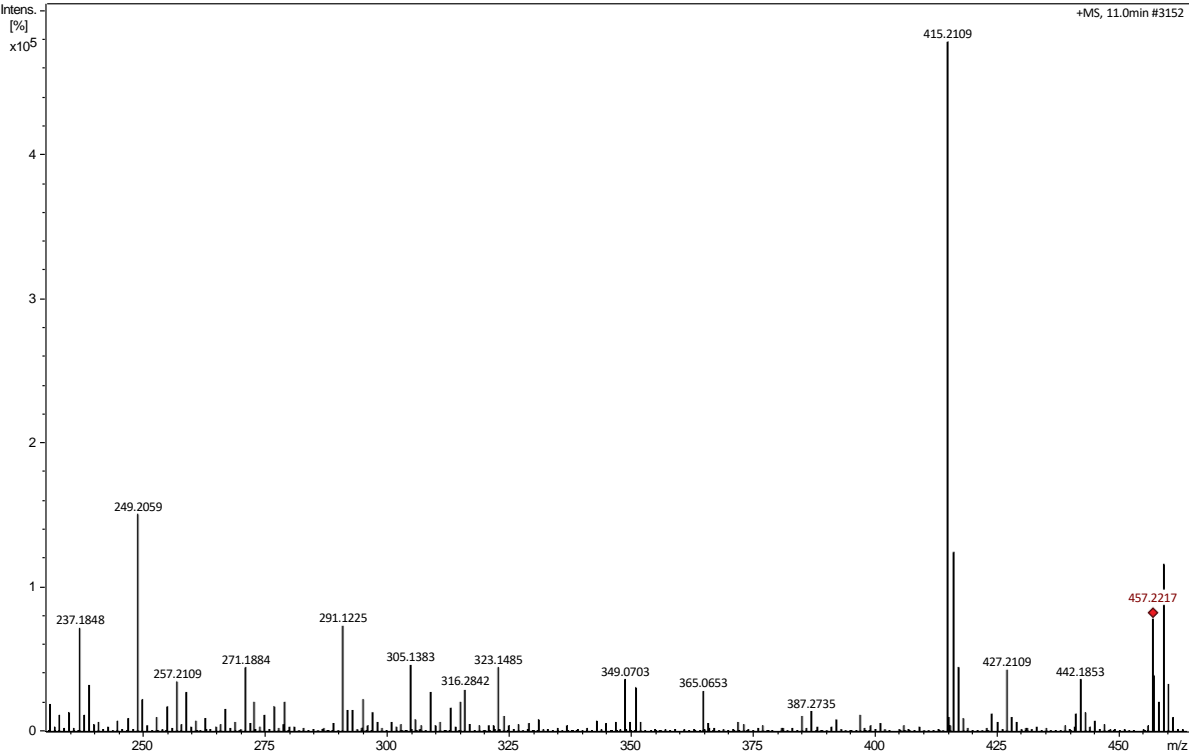
Austinoneol



Neoautina



Preaustinoide A3



ANEXO I: Manuscrito em elaboração sobre o estudo dos COV's

Metabólitos voláteis de fungos na presença de Mn^{2+} e Co^{2+} : Caracterização

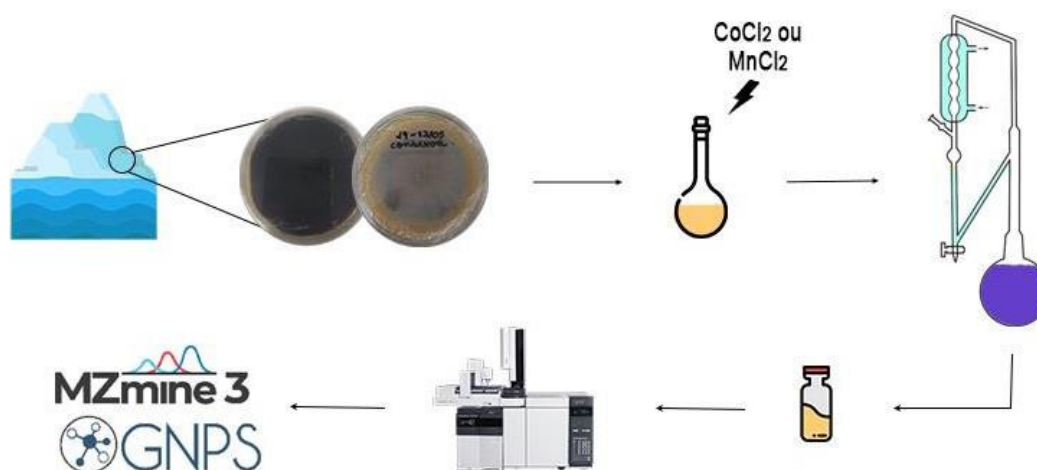
Nayara de Freitas Gomes¹, Maiara da Silva Medeiros¹, Lara Durães Sette², Edson Rodrigues Filho¹

¹Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luiz, s/n - São Carlos, SP, Brazil

²São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil.

nayaragomes@estudante.ufscar.br

Grafical Abstract



Resumo:

Os metabólitos voláteis desempenham um papel essencial na metabolômica de fungos, influenciando seu desenvolvimento, mecanismos de defesa e resposta ao estresse. Neste estudo, investigamos a resposta dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Talaromyces* sp. à presença de cátions metálicos, focando na variação na composição de seus óleos essenciais. Utilizamos hidrodestilação para extrair os compostos orgânicos voláteis (COVs) desses fungos cultivados em meios sólido de arroz e líquido de Czapeck, tanto na ausência quanto na presença de cloreto de manganês ($MnCl_2$) e cloreto de cobalto ($CoCl_2$). Caracterizamos os metabólitos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), complementada pelas plataformas GNPS e MetaboAnalyst. Identificamos uma variedade de COVs, incluindo

hidrocarbonetos, álcoois e sesquiterpenos, com composição variada conforme o meio de cultivo e a presença dos cátions metálicos.

Palavras-chave: COVs, Hidrodestilação, *Pestalotiopsis* sp., Sesquiterpenos, *Talaromyces* sp..

1 Introdução

A interação entre micro-organismos e elementos químicos tem despertado crescente interesse no campo da biotecnologia e das ciências ambientais devido ao seu impacto direto nos ciclos biogeoquímicos e na saúde dos ecossistemas. Fungos, especialmente aqueles pertencentes ao filo Ascomycota, desempenham um papel fundamental na decomposição de materiais orgânicos e na ciclagem de nutrientes, processos essenciais para a sustentabilidade dos ecossistemas. No entanto, a influência de cátions metálicos sobre esses organismos, apesar de sua importância ecológica, ainda não é totalmente compreendida [1, 2, 3].

Compreender como diferentes espécies de fungos toleram e acumulam metais é crucial para desvendar sua contribuição à estabilidade e funcionalidade dos ecossistemas, especialmente em ambientes contaminados ou ricos em metais. Essas variações de tolerância não apenas influenciam a biodiversidade, mas também permitem que os fungos se adaptem a habitats adversos. As adaptações envolvem mecanismos como a modificação da permeabilidade celular, a alteração da composição de lipídios de membrana e a expressão de proteínas que auxiliam na detoxificação de metais, como metalotioneínas e glutatonas [4, 5]. Tais estratégias são essenciais para a sobrevivência dos fungos em condições de estresse ambiental e podem ter aplicações em biotecnologia, como na biorremediação de solos contaminados.

Dado o papel crucial dessas adaptações, investigar como os fungos alteram seus processos metabólicos em resposta à presença de cátions metálicos torna-se fundamental. Em particular, a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) e óleos essenciais por fungos ascomicetos, como *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp., oferece uma rica diversidade de metabólitos secundários, incluindo sesquiterpenos

como germacrenos, α -cadinol, β -cariofileno e ácido helvólico. A presença de cátions metálicos pode influenciar a composição química desses óleos, atuando como cofatores em reações biossintéticas ou induzindo mudanças metabólicas adaptativas [6, 7, 8, 9].

Este estudo investiga as respostas dos fungos *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. à presença de cátions metálicos, com foco na variação da composição de seus óleos essenciais. Ao explorar como esses fungos se adaptam a diferentes concentrações de metais, buscamos contribuir para um melhor entendimento das interações fungo-metal. Essas interações são essenciais para a manutenção de ecossistemas saudáveis e para a compreensão dos processos naturais de ciclagem de nutrientes e metais.

2 Método:

2.1 Origem e identificação dos fungos:

As cepas fúngicas de *Talaromyces* sp. (LAMAI 2549 - L9) e *Pestalotiopsis* sp. (LAMAI 1351 - L1) foram obtidas a partir de amostras de solo coletadas a uma distância de 150 metros do recuo do *Glaciar Collins* (62° 09.794'S 58° 55.560'W) e de sedimento marinho na Baía do Almirantado (62° 04.341'S 58° 25.233'W), ambos localizados na Antártica. A referência completa será fornecida conforme Santos et al., 2020. Esses fungos foram depositados sob o código de identificação LAMAI no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Rio Claro, SP, Brasil.

2.2 Cultura dos fungos em arroz:

Os cultivos foram realizados em balões de fundo redondo (2000mL), contendo 360g de arroz e 240mL de água destilada. Os balões foram autoclavados duas vezes, a 120°C e 1atm, por 15 minutos em cada ciclo. Duas suspensões de esporos foram preparadas a partir de discos do meio BDA contendo micélio de *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. Em seguida, cada solução foi transferida em condições estéreis para dois balões de fundo redondo contendo arroz esterilizado. Após 20 dias de crescimento à temperatura ambiente (25°C), os óleos essenciais foram extraídos

utilizando a técnica da hidrodestilação com o extrator de Clevenger. Em seguida, cada solução foi transferida em condições estéreis para dois balões de fundo redondo contendo arroz esterilizado. Finalmente, os balões foram armazenados no local apropriado, permitindo o crescimento do fungo por 20 dias à temperatura ambiente (25°C).

2.3 Cultivo dos fungos em Czapeck:

Inicialmente, o meio líquido de Czapeck foi preparado com nitrato de sódio (NaNO_3 : 3.0 g.L^{-1}); cloreto de potássio (KCl : 0.5 g.L^{-1}); fosfato de potássio (K_2HPO_4 : 1,0 g.L^{-1}), dextrose (30.0 g.L^{-1}); sulfato de ferro II heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g.L^{-1}); sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g.L^{-1}), extrato de levedura (20.0 g.L^{-1}) e água destilada. Posteriormente, o meio foi transferido para balões de fundo redondo (2000mL), e autoclavados a 120°C e 1 atm por 15 minutos. As suspensões de esporos do *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. foram preparados a partir de discos de meio BDA e transferidos para balões esterilizados. Posteriormente, cada suspensão foi colocada, sob condições estéreis, em dois balões de fundo redondo contendo arroz esterilizado. Por fim, os frascos foram armazenados em um local adequado, permitindo o crescimento do fungo por 20 dias à temperatura ambiente (25°C).

2.4 Cultivo dos fungos na presença de cátions metálicos:

Para o cultivo dos fungos na presença de cátions de metálicos, foram preparadas soluções de MnCl_2 (80,0 mmol) e CoCl_2 (30,0 mmol). No cultivo em meio sólido de arroz, substituímos a água destilada pela solução de cátion. Já no cultivo em meio líquido de Czapeck, realizamos a troca do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pelas soluções de cátions metálicos mencionadas. Após a esterilização dos materiais em autoclave, adicionamos alíquotas de 1mL das suspensões de esporos de *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. separadamente para cada cátion. Por fim, os balões foram armazenados no local apropriado, permitindo o crescimento do fungo por 20 dias à temperatura ambiente (25°C).

2.5 Extração

Após 20 dias de crescimento à temperatura ambiente (25°C), os óleos essenciais foram extraídos utilizando a técnica da hidrodestilação com o extrator de Clevenger. Para a extração do óleo do meio sólido arroz, 1000mL de água destilada e 1g de cloreto de cálcio (CaCl₂) foram adicionados. Em seguida, utilizou-se uma separação de fases éter etílico/água para solubilizar o componentes volatéis e remover a maior parte da água. Posteriormente, sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi usado para eliminar qualquer água residual, e, por fim, a solução foi transferida para um vial para análise posterior no CG-EM.

O mesmo procedimento é seguido na extração do meio líquido Czapeck e meio sólido arroz e líquido Czapeck com adição de metais, no entanto, não é necessário a adição de 1g de cloreto de cálcio (CaCl₂) no meio sólido arroz.

2.6 Análise por CG-EM e processamentos via GNPS:

A análise dos óleos essenciais por CG-EM foi conduzida utilizando um cromatógrafo a gás (CG-2010) acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM QP2010 *Plus*), ambos da *Shimadzu*. Foi empregada uma coluna capilar Rxi-5ms (10m x 0,10mm x 0,10µm). O gás de arraste utilizado foi hélio (He₂), com um fluxo linear de 35 cm.seg⁻¹ e um fluxo na coluna de 0,45mL.min⁻¹. O controle de temperatura do forno foi realizado com uma faixa de temperatura de 40°C a 320°C, com uma taxa de aquecimento de 21°C.min⁻¹. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram mantidas em 250°C. O modo de injeção foi *Splitless* com uma razão de 20A. A identificação dos metabólitos foi realizada utilizando a biblioteca do equipamento NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*) juntamente com os padrões de alcanos *Sigma parafilm C7 -C10* e *parafilm C10 - C40*.

Na análise dos compostos voláteis, foi empregado um método cromatográfico com os seguintes parâmetros: temperatura do injetor e da interface mantida a 250°C, enquanto a temperatura da fonte de ionização foi fixada em 200°C. O volume de injeção utilizado foi de 2µL. O modo de ionização adotado foi o EI⁺ e a faixa de detecção de massas abrangeu *m/z* 50 a 750 Da.

Os cromatogramas provenientes da análise CG-EM foram convertidos para o formato *Computable Document Format* (CDF) por meio do software *LabSolutions - GCMSsolution* da *Shimadzu* antes do processamento dos dados. Em seguida, o alinhamento e a deconvolução dos picos nos arquivos convertidos em CDF foram executados utilizando o software *Mzmine* versão 2.53. Os resultados alinhados foram

exportados como um arquivo no formato de *Mascot Generic Format* (mgf) [10]. Posteriormente, os arquivos mgf foram carregados na plataforma GNPS ([//gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)), onde uma rede molecular foi gerada. No decorrer do fluxo de trabalho, foram empregados os seguintes parâmetros: a tolerância da massa do íon precursor foi estabelecida em 0.5 Da, o número mínimo de picos correspondentes foi fixado em 6 e o limiar de pontuação foi configurado para 0,05.

3 Discussão:

3.1 PCA

Para o fungo *Pestalotiopsis* sp., os componentes PC1 e PC2 representaram 45,5% e 26,9%, respectivamente, da variabilidade do conjunto de dados, totalizando 72,4% da variabilidade total. Já para o *Talaromyces* sp., esses componentes representaram 46,7% e 26,4%, respectivamente, da variabilidade do conjunto de dados, totalizando 73,1% da variabilidade total.

O gráfico de pontuação bidimensional PC1 vs. PC2 para o fungo *Pestalotiopsis* sp. (Figura 1) revelou que os pontos de dados relacionados ao meio de cultivo de arroz se agrupavam em quadrantes distintos. A composição metabólica do fungo do meio de cultivo branco difere da composição do meio suplementado com cátions metálicos, evidenciando diferenças metabólicas entre eles. Além disso, foi observada uma maior semelhança entre os cultivos com a adição de cátions. Já os pontos relativos ao cultivo em meio líquido Czapeck se agruparam em um mesmo quadrante, indicando que a composição metabólica do fungo não apresentou diferenças significativas, sugerindo um impacto menor dos metais na produção de metabólitos. Ao comparar os pontos relativos ao meio de cultivo de arroz e o meio líquido de Czapeck, com e sem suplementação, observa-se que eles estão localizados em quadrantes distintos. Essa diferença ocorre principalmente devido à presença de compostos carbonílicos mais complexos no meio de arroz indicando uma nutrição mais rica para os fungos, afetando diretamente na produção e a diversidade dos metabólitos secundários.

O gráfico bidimensional de pontuação PC1 vs. PC2 para o fungo *Talaromyces* sp. (Figura 2) revelou agrupamentos distintos dos pontos de dados relacionados aos meios de cultivo de arroz e meio líquido de Czapeck. No caso do cultivo em arroz, os pontos se concentraram principalmente à esquerda do gráfico, mas em diferentes quadrantes, indicando uma diferenciação na composição metabólica entre o meio de

cultivo sem suplementação e suplementado com cátions metálicos. Por outro lado, os pontos referentes ao cultivo em meio líquido de Czapeck se agruparam predominantemente à direita do gráfico, também em diferentes quadrantes, evidenciando uma diferença na composição metabólica entre o meio de cultivo sem suplementação e suplementado com cátions metálicos. Além disso, os meios com a presença dos cátions metálicos, tanto no meio de arroz quanto no meio líquido Czapeck, apresentaram maior semelhança entre si do que com os meios sem suplementação. Assim como observado no *Pestalotiopsis* sp., a presença de compostos carbonílicos mais complexos influencia diretamente na produção e na diversidade dos metabólitos secundários.

Figura 1: Gráfico de PCA do *Pestalotiopsis* sp.

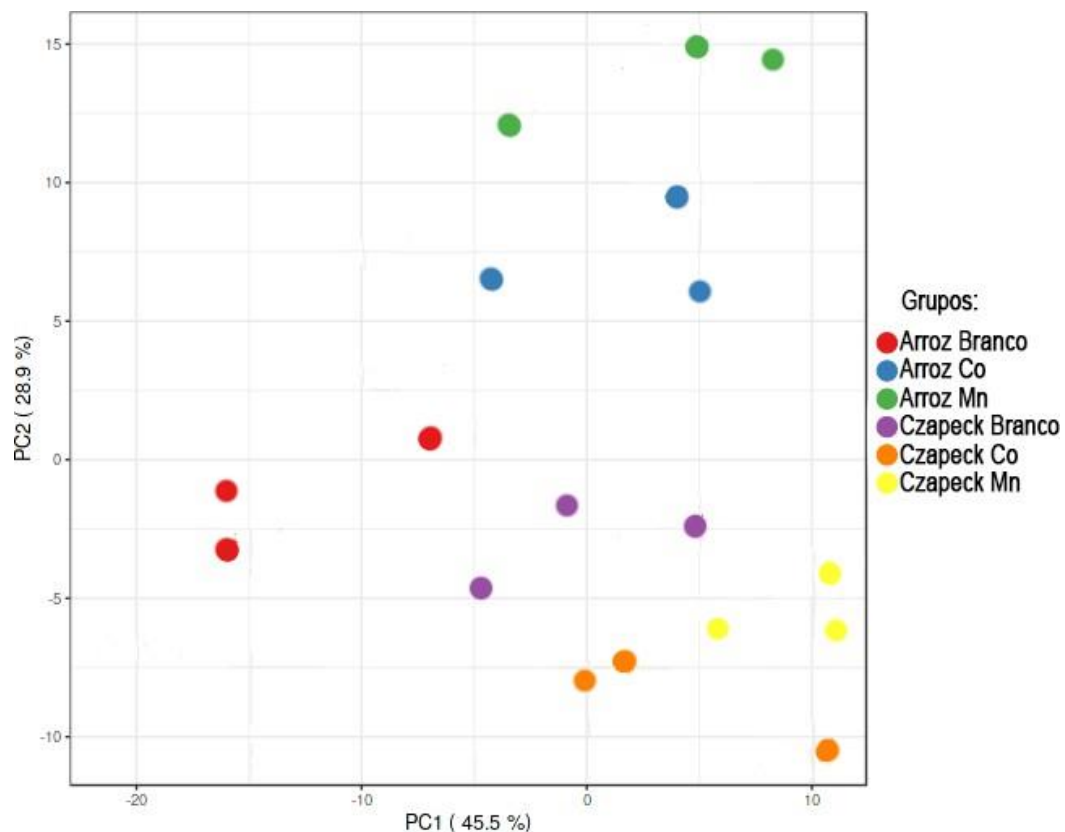
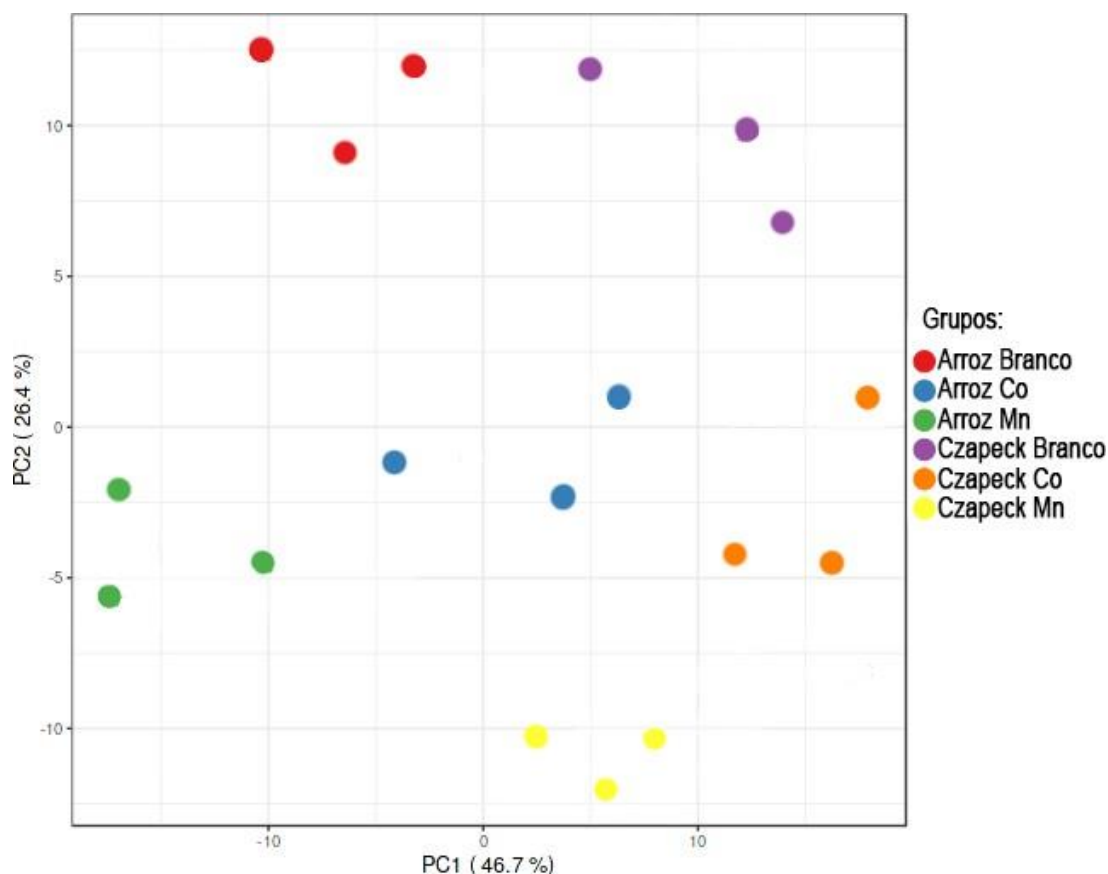


Figura 2: Gráfico de PCA *Talaromyces* sp.



3.2 Caracterização da composição química volátil dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Talaromyces* sp.

COVs obtidos por meio da hidrodestilação dos meios de cultura dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Talaromyces* sp. (Tabelas 1 e 2) apresentaram em sua composição moléculas como β -cariofileno, α -himachaleno, longifoleno, β -bisabonelo, α -bergamoteno e seus derivados oxidados, que são sesquiterpenos frequentemente encontrados em fungos do filo Ascomycota. Além dos sesquiterpenos, observa-se a presença de ácidos e álcoois, como ácido octadecanoico, ácido hexadecanoico, 3-Octanol e 1-Octen-3-ol, que também são frequentemente identificados em fungos ascomicetos [11, 12, 13, 14, 15].

O sesquiterpeno β -cariofileno e seus análogos são constituintes comuns em óleos essenciais de muitas plantas herbáceas, como *Cannabis sativa*.(referencia Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y. *et al.* ***Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryphyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J Gen Plant Pathol* 77, 336–341 (2011)). Entretanto seus derivados também foram**

relatados em uma grande variedade de espécies fúngicas como o *Pestalotiopsis disseminata* (Deyrup et al. [2006](#)), *Penicillium roqueforti* (Larsen e Frisvad [1995](#)) e *Talaromyces wortmannii* FS2

A hidrodestilação dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Talaromyces* sp. utilizando meio sólido de arroz revelou uma maior diversidade de compostos em comparação com a extração realizada no meio líquido de Czapeck (conforme Tabelas 1 e 2 do material suplementar). Essa disparidade pode ser atribuída à complexidade da fonte de carbono presente no arroz, que proporciona condições mais favoráveis para a biossíntese de metabólitos pelos fungos. Esses resultados a significativa a influência do meio de cultivo no metabolismo dos fungos, enfatizando sua importância como uma ferramenta crucial na identificação de metabólitos secundários fúngicos.

3.3 Cultivo dos fungos na presença de metais

Ao observar o crescimento dos micro-organismos expostos aos cátions metálicos durante 20 dias, foram identificadas diferenças significativas no crescimento micelial dos fungos, especialmente no meio líquido de Czapeck. No meio de Czapeck contendo CoCl_2 e MnCl_2 , verificou-se que o cobalto inibiu completamente o crescimento micelial, enquanto o manganês não teve esse efeito. No meio de arroz, foi observada uma alteração na coloração do micélio, atribuída à ação dos metais presentes, que atuam como cofatores de proteínas envolvidas em processos de transferência de elétrons mediante reações redox. Essas proteínas podem doar elétrons- π ou pares de elétrons-n para a quelação dos metais, promovendo a transferência de elétrons (LIU et al., 2014).

Outra mudança notável foi a redução na produção de biomassa micelial em ambos os fungos no meio líquido de Czapeck. Esse fenômeno pode ser resultado ao estresse oxidativo ocasionado pela presença dos cátions metálicos, combinada com a limitada disponibilidade de nutrientes, o que reduz a capacidade dos fungos de sintetizar biomassa de forma eficiente, exacerbando os efeitos do estresse abiótico e resultando em menor crescimento micelial.

Em relação aos COVs, a adição de cátions metálicos aos meios de cultivo teve impactos distintos ao comparar os dois fungos (Tabelas 3-6), indicando variações significativas na resposta a presença desses metais entre as espécies fúngicas. No caso do *Pestalotiopsis* sp., a adição de CoCl_2 e MnCl_2 aumentou a diversidade de

moléculas na composição dos componentes volatéis. Por outro lado, para o *Talaromyces* sp., a adição desses metais resultou em uma diminuição da diversidade de moléculas.

As tabelas apresentadas neste estudo (Tabela 1, 2, 3 e 4) são fundamentais para a análise das moléculas identificadas após a adição do metal. Ao comparar os compostos identificados nos cultivos realizados, observa-se similaridade nas classes químicas, o que sugere padrões consistentes nas respostas bioquímicas dos fungos à presença do metal.

Em ambas as condições de cultivo, o *Pestalotiopsis* sp. produz uma variedade de ácidos carboxílicos. Com CoCl_2 , foram identificados o ácido isobutárico, ácido octanóico, ácido butanóico, ácido 2-metil-hexanóico e ácido 9-octadecenóico. Já com MnCl_2 , os ácidos carboxílicos incluem ácido isobutárico, ácido butanóico, ácido 3-metil-butanóico, ácido 2-metil-butanóico, ácido 2-metil-hexanóico e ácido 9-octadecenóico. Nota-se que alguns ácidos, como o ácido isobutárico, o ácido butanóico e o ácido 9-octadecenóico, são comuns em ambas as condições, sugerindo uma resposta metabólica consistente do fungo à presença de metais.

No caso do *Talaromyces* sp. a adição de metais proporcionou maior variedade de classes metabólicas quando comparamos ao cultivo do *Pestalotiopsis* sp, principalmente na presença do MnCl_2 que indica uma adaptação metabólica do fungo.

Tabela 1 - Moléculas do *Pestalotiopsis* sp. com indução de CoCl_2 .

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Isobutárico	808
Arroz	Ácido carboxílico	Ácido Octanóico	856
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Butanóico	860
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 2-Metil-Hexanóico	864
Arroz	Sesquiterpeno	Cis- β -Elemeno	1323
Arroz	Sesquiterpeno	Aloaromadendreno	1380
Arroz	Sesquiterpeno	Epóxido de cis-cariofileno	1493
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 9-Octadecenóico	1863

Tabela 2 - Moléculas do *Pestalotiopsis* sp. com indução de MnCl₂.

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Isobutárico	818
Czapeck e Arroz	Ácido carboxílico	Ácido Butanóico	850
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 3-Metil-Butanóico	868
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 2-Metil-Butanóico	893
Arroz	Ácido carboxílico	Ácido 2-Metil-Hexanóico	842
Arroz	Sesquiterpeno	Cis- β -Elemeno	1323
Arroz	Sesquiterpeno	4-methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-bicyclo[5.2.0]nonane	1351
Arroz	Sesquiterpeno	Germacreno D	1355
Arroz	Sesquiterpeno	Aloaromadendreno	1380
Arroz	Sesquiterpeno	α -Muuroleno	1413
Arroz	Sesquiterpeno	Δ -Cadineno	1431
Arroz	Sesquiterpeno	Aromadendrene	1435
Arroz	Sesquiterpeno	Epóxido de cis-cariofileno	1493
Arroz	Ácido carboxílico	Ácido 9-Octadecenóico	1863

Tabela 3 - Moléculas do *Talaromyces* sp. com indução de CoCl₂

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Arroz	Aldeído	2-Nonenal	926
Arroz	Álcool	1,6-octadien-3-ol	1070
Arroz	Cetona	2-Propanone	1099
Arroz	Sesquiterpeno	Chamigreneo	1338
Arroz	Sesquiterpeno	Epóxido de cis-Z- α -Bisaboleno	1550
Arroz	Sesquiterpeno	Epóxido de cis-cariofileno	1565
Arroz	Sesquiterpeno	α -trans-Bergamatol	1621

Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 9-Octadecanóico	1861
-----------------	-------------------	-----------------------	------

Tabela 4 – Moléculas do *Talaromyces* sp. com indução de MnCl₂.

Meio de cultura	Classe	Nome	Índice de retenção
Czapeck	Ácido carboxílico	4-Hexen-1-ol	724
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Propanóico	820
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Isobutárico	825
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Butanóico	846
Arroz e Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Heptanóico	856
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 3-Metil-Butanóico	865
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido 2-Metil-Butanóico	892
Arroz	Cetona	3-Heptanone	955
Czapeck	Ácido carboxílico	Ácido Pentanóico	959
Arroz	Aldeído	2-Nonanal	1073
Arroz	Cetona	2-Propanone	1101
Arroz	Hidrocarboneto	Z,Z,Z-4,6,9-Nonadecatriene	1232
Arroz	Sesquiterpeno	Aromadendrene	1337
Arroz	Sesquiterpeno	β -Elemeno	1352
Arroz	Sesquiterpeno	α -Bergamoteno	1355
Arroz	Cetona	2-Nonadecanone	1800

Czapeck	Ácido Carboxílico	Ácido 9-Octadecanóico	1840
---------	-------------------	-----------------------	------

3.3 GNPS

Os espectros de massas no modo EI dos óleos essenciais provenientes dos cultivos dos fungos *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. foram analisados utilizando a plataforma GNPS para criar redes moleculares. Esse método permitiu visualizar a distribuição dos metabólitos e anotar os compostos presentes nesses óleos. O processamento via GNPS revelou clusters específicos de sesquiterpenos, ácidos carboxílicos e álcoois, facilitando a identificação e organização dos diferentes grupos de metabólitos. Essa abordagem proporcionou uma compreensão da composição química dos óleos essenciais fúngicos, destacando a diversidade e complexidade dos metabólitos produzidos sob diferentes condições de cultivo. Além disso, a análise de pequenos clusters permitem descartar as relações moleculares que são mais representativas nas condições experimentais em estudo, principalmente quando o objetivo é compreender as variações metabólicas

3.3.1 Rede molecular *Pestalotiopsis* sp

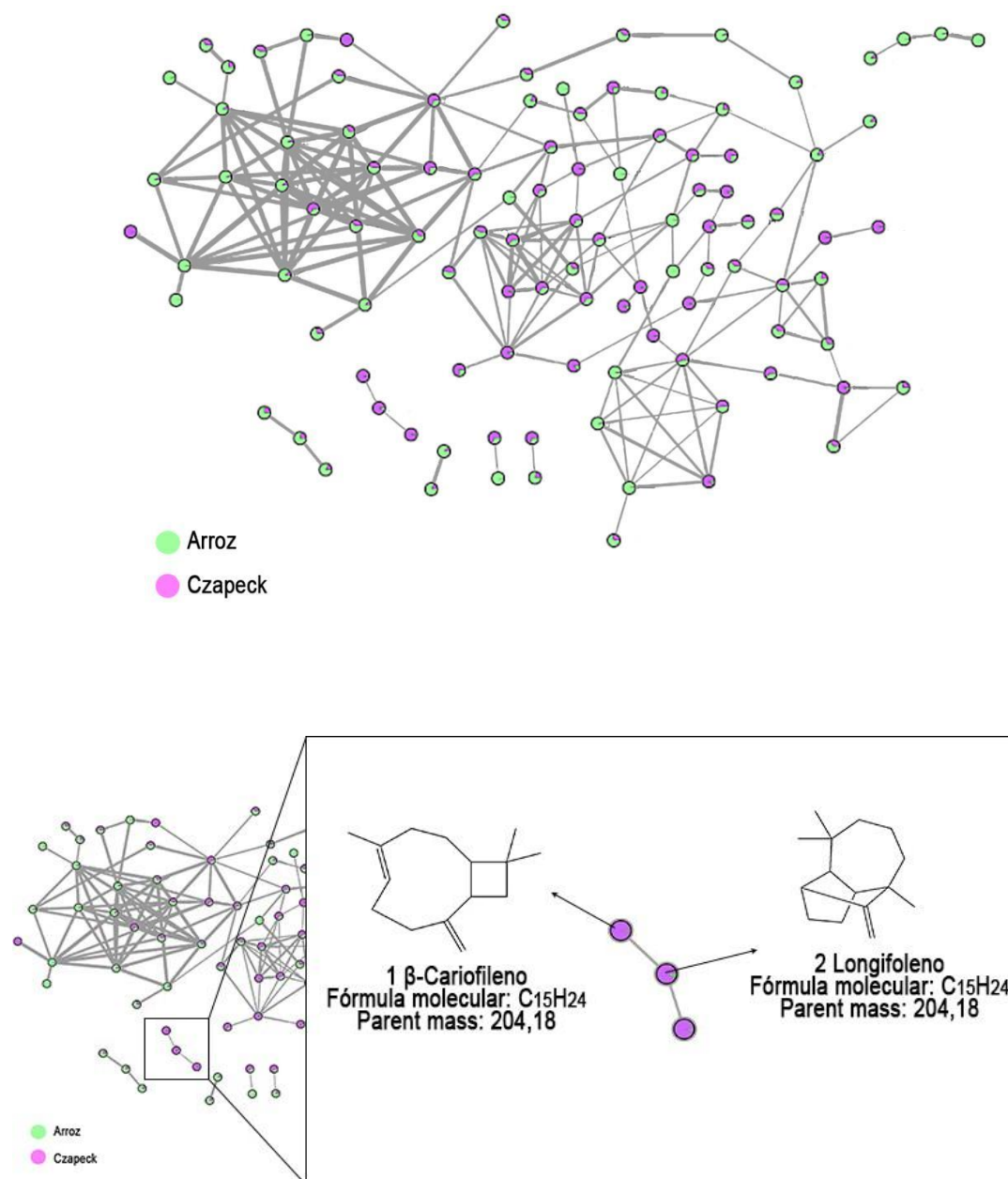
A análise das redes moleculares revelou que o cultivo de arroz e Czapeck sem adição de metais para o fungo *Pestalotiopsis* sp. resultou em 110 nodos (Figura 3a). Comparativamente, a inclusão de cobalto e manganês aumentou significativamente o número de nodos para 150 (Figura 3b) e 469 (Figura 3c), respectivamente, indicando uma resposta ao estresse abiótico imposto pelos metais. Em todas as redes moleculares, foram identificados clusters consistentes de sesquiterpenos, sugerindo que a presença de metais não comprometeu a produção dessa classe metabólica. Os sesquiterpenos foram predominantemente detectados nos cultivos em meio de arroz, onde há uma fonte mais complexa de carbono disponível.

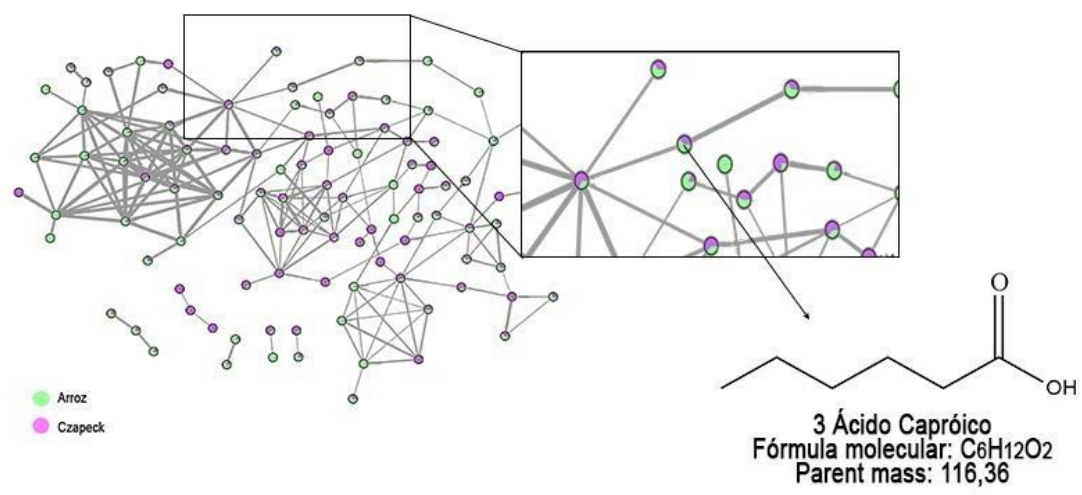
Ao analisar as redes moleculares do fungo *Pestalotiopsis* sp. (Figuras 3a, 3b e 3c), observamos a presença constante de sesquiterpenos e ácidos carboxílicos. A adição de $MnCl_2$ e $CoCl_2$ resultou em um aumento na diversidade de moléculas dessas classes, sugerindo um potencial indutor positivo tanto do manganês quanto do cobalto. Esses resultados indicam que os metais de transição podem modular a produção de compostos secundários de maneira distinta dependendo da espécie

fúngica e das condições do meio. Adicionalmente, foi observada uma redução na diversidade de moléculas no meio Czapeck em comparação ao meio de arroz [16].

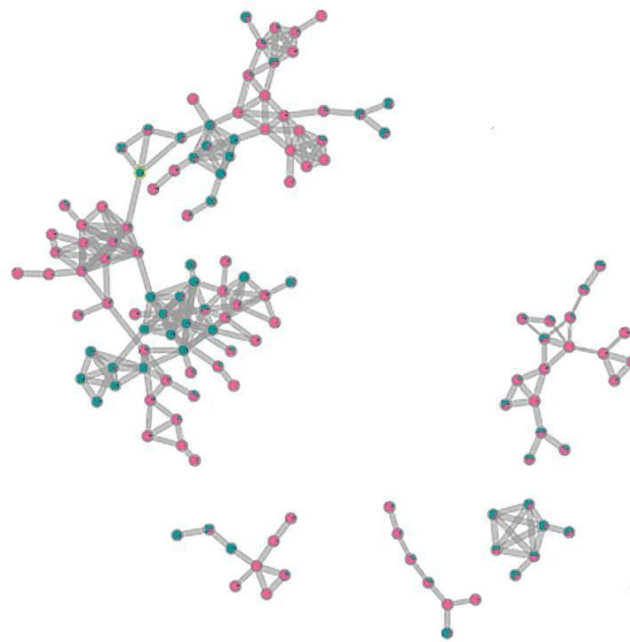
Figura 3 - Cluster do fungo *Pestalotiopsis* sp. sem a adição de metais (3a), com a adição de manganês (3b) e com a adição de cobalto (3c).

3a

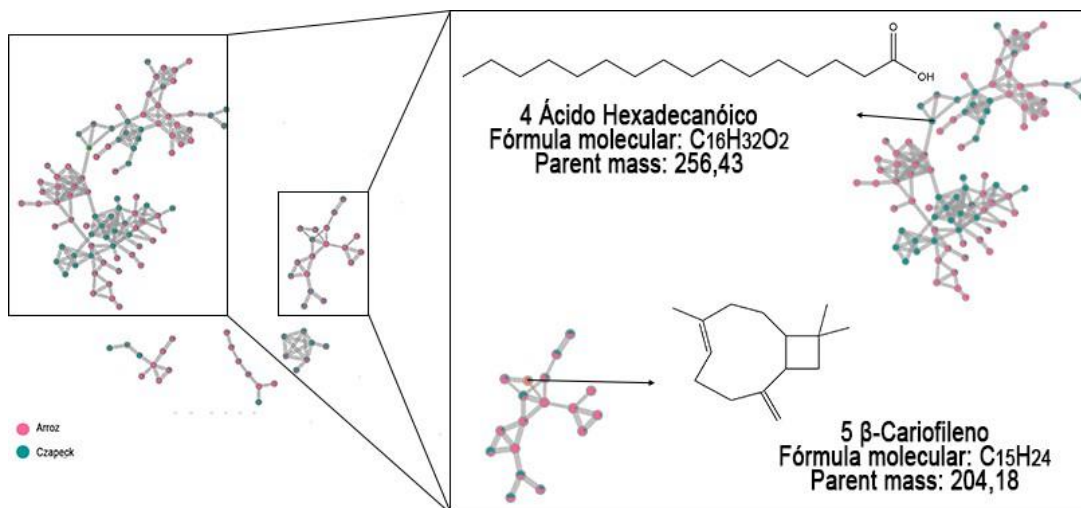




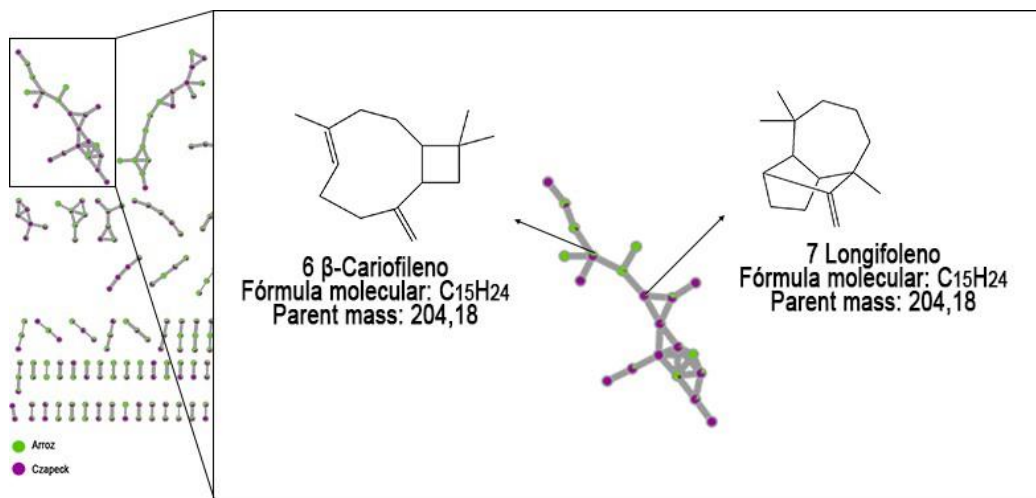
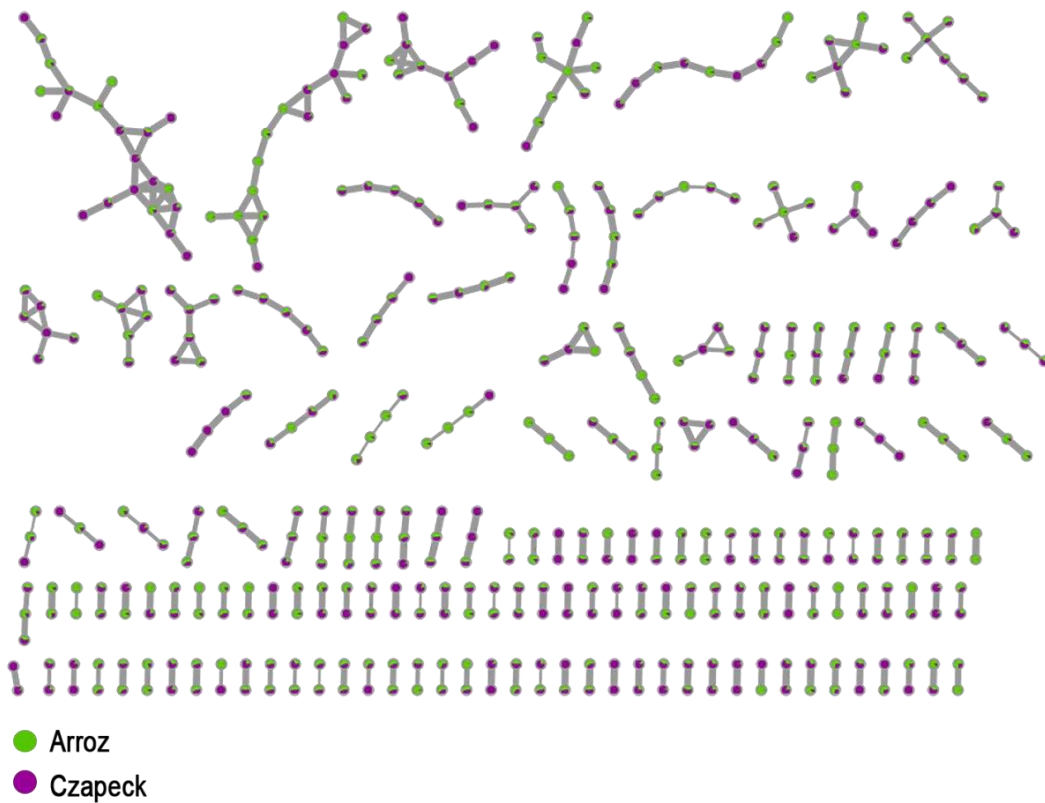
3b

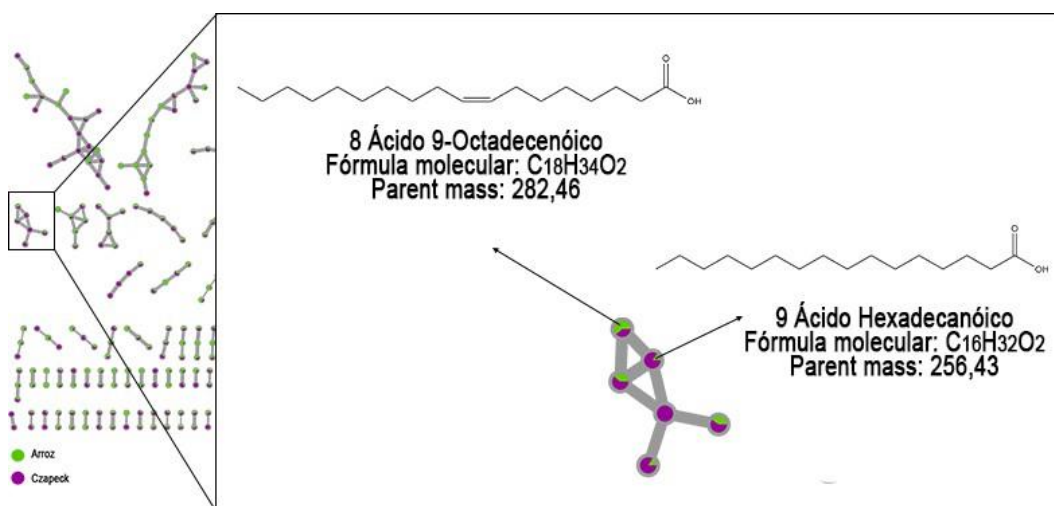


● Arroz
● Czapeck



3c



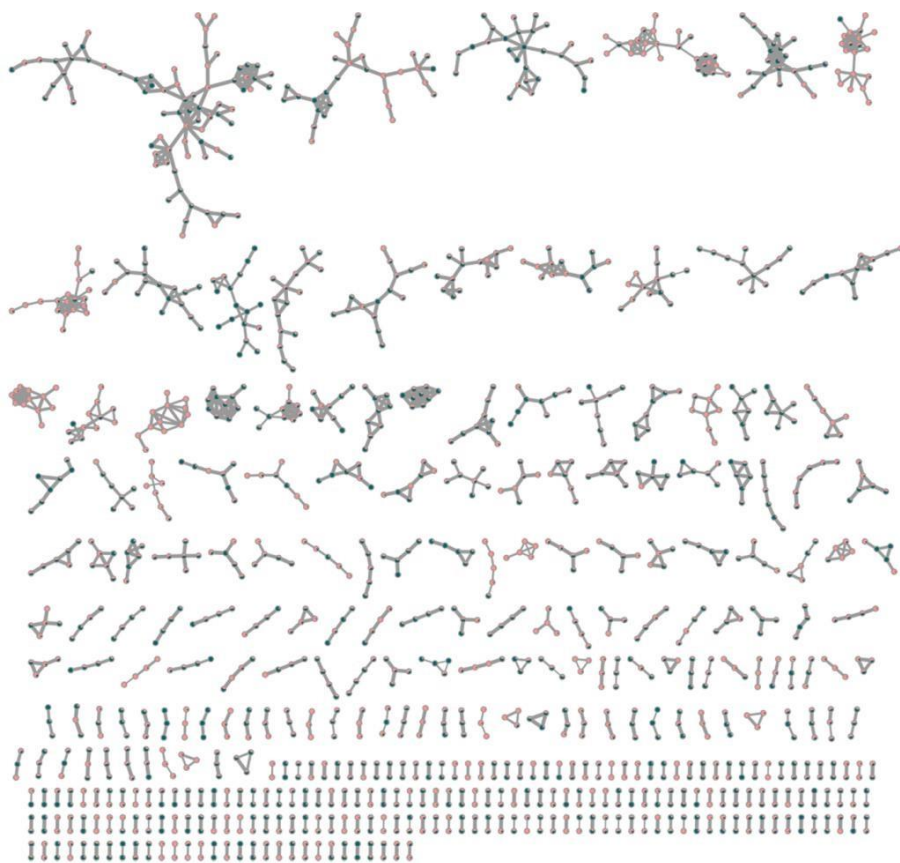


3.3.2 Rede molecular *Talaromyces* sp.

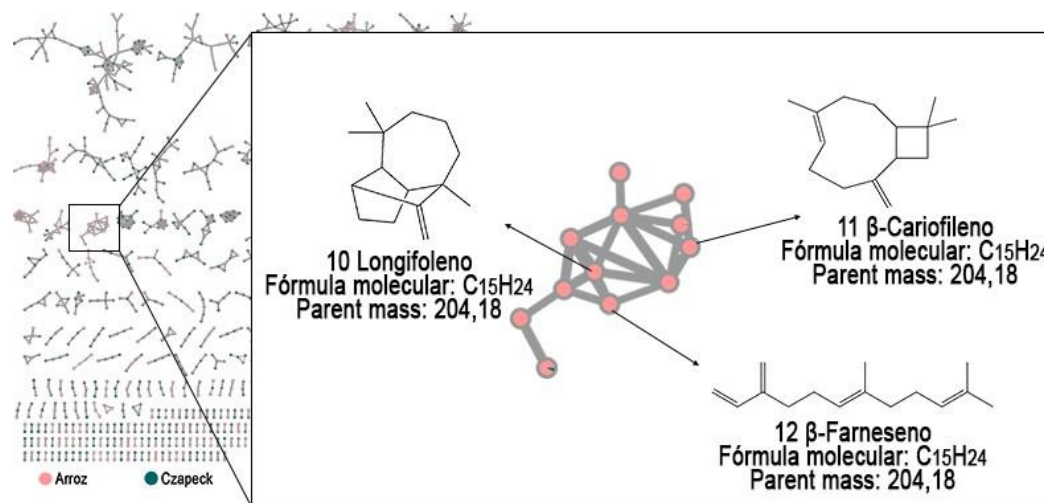
A análise da rede molecular do fungo *Talaromyces* sp., cultivado em meio de arroz e Czapeck sem a presença de metais, resultou em uma rede composta por 1.295 nodos (Figura 4a). Em comparação, os cultivos sob estresse de cobalto e manganês resultaram em redes com 483 nodos (Figura 4b) e 939 nodos (Figura 4c), respectivamente. Essa redução no número de nodos pode ser atribuída ao impacto do estresse abiótico induzido pelos metais. Em todas as redes, foram identificados clusters específicos de sesquiterpenos, sugerindo que a produção desta classe de metabólitos não foi significativamente afetada pela presença dos metais. Notavelmente, os sesquiterpenos foram predominantemente anotados nos cultivos em meio de arroz, o que pode ser explicado pela maior disponibilidade de carbono neste substrato, favorecendo a biossíntese desses compostos.

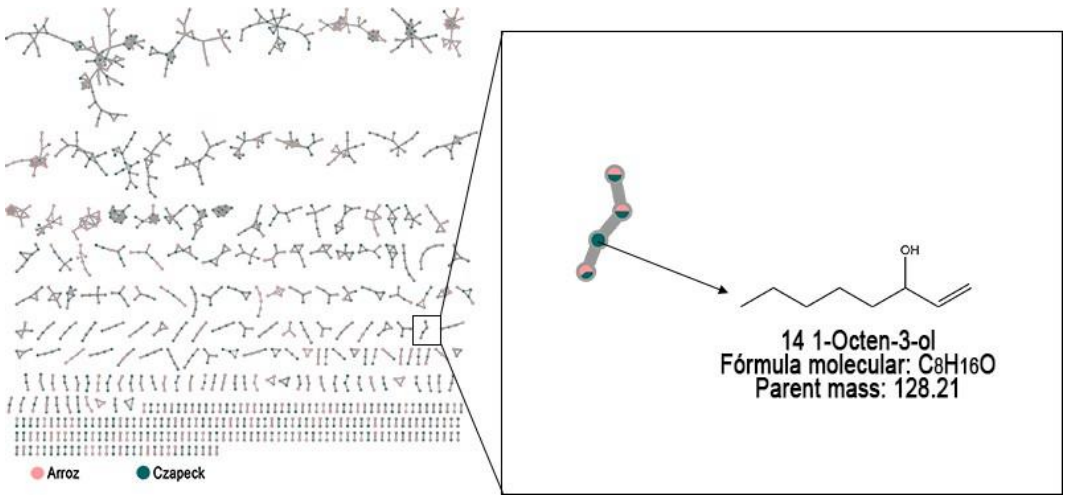
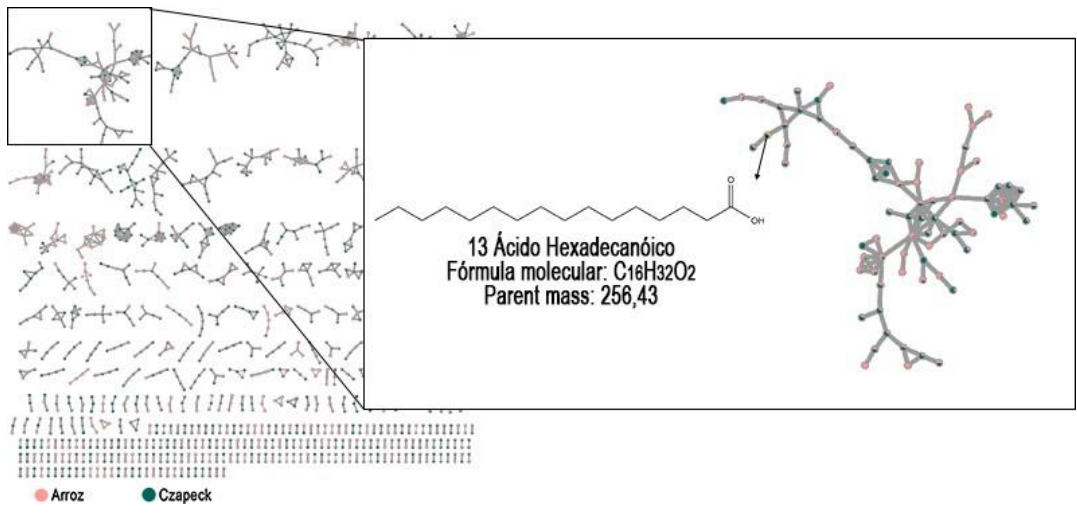
Figura 4 - Cluster do fungo *Talaromyces* sp. sem a adição de metais (4a), com a adição de manganês (4b) e com a adição de cobalto (4c).

4a

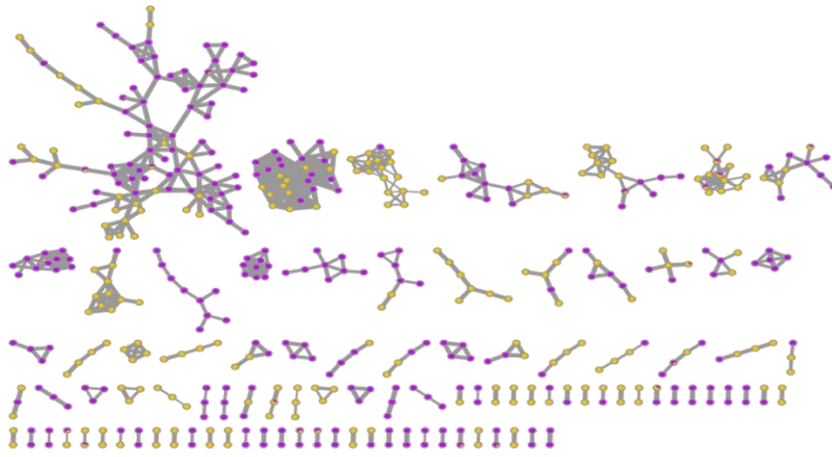


- Arroz
- Czapeck

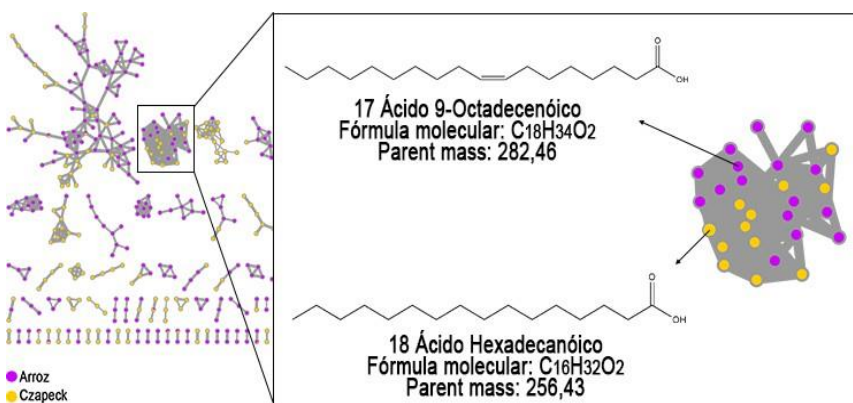
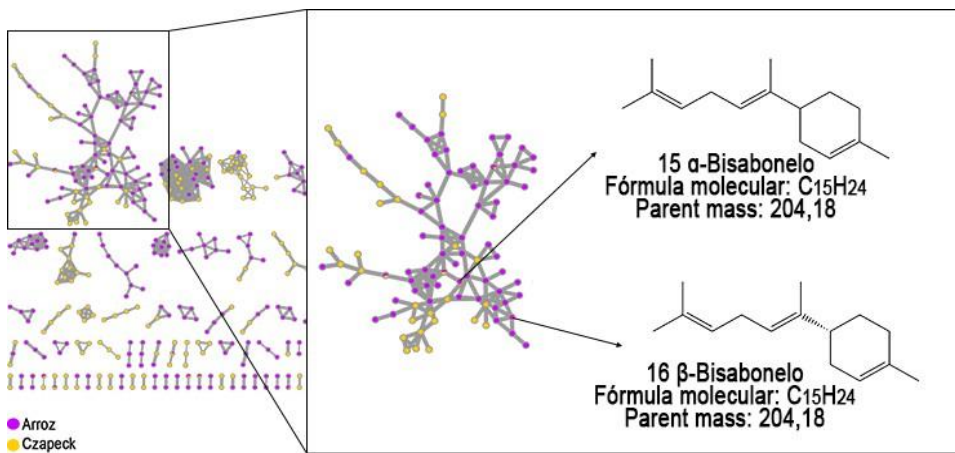




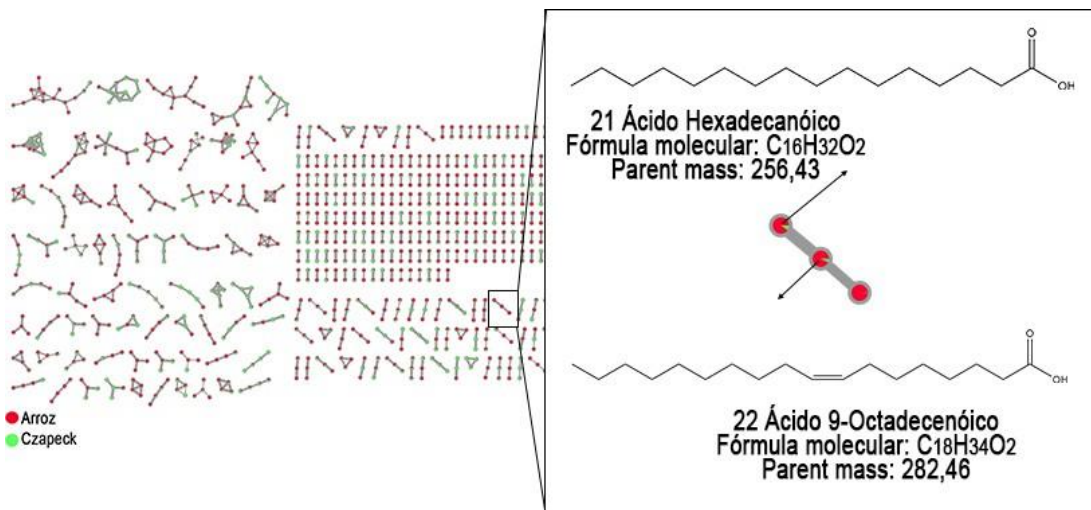
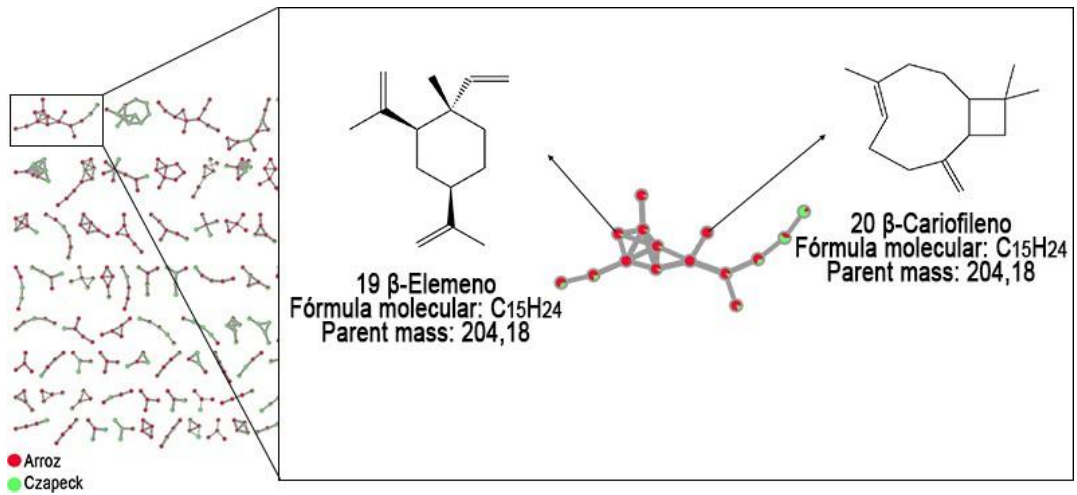
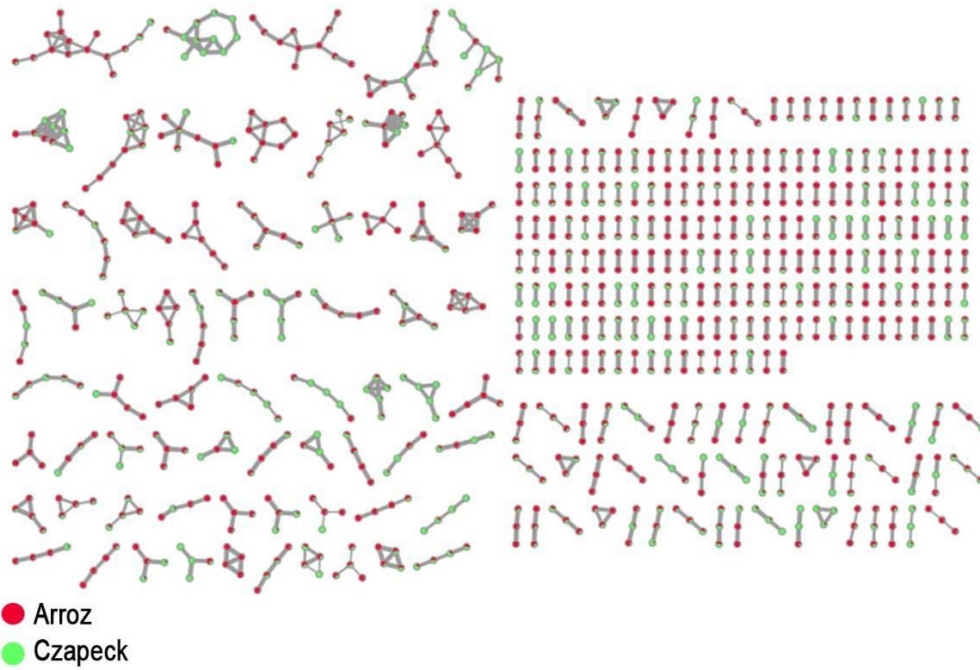
4b



● Arroz
● Czapeck



4c



Conclusão:

Este estudo demonstrou que os fungos *Talaromyces* sp. e *Pestalotiopsis* sp. produzem uma diversidade de COVs quando cultivados sob diferentes condições, incluindo a presença de cátions metálicos. A técnica de hidrodestilação combinada com o CG-EM e plataformas de bioinformática como GNPS e MetaboAnalyst, permitiu a identificação dos COVs, como álcoois, ésteres e sesquiterpenos.

Os resultados destacam que a composição dos COVs é significativamente influenciada pelo tipo de fungo e pelas condições de cultivo, particularmente especialmente pela presença de cátions metálicos. Esta variação na composição química reflete a capacidade adaptativa dos fungos a diferentes estresses ambientais,

sugerindo um papel importante desses compostos na ecologia e na sobrevivência dos fungos.

Agradecimentos:

CNPq (Processo 140872/2021-3; FAPESP e UFSCar.

Referências:

- [1] MEDINA-ROMERO, Y. M.; ROQUE-FLORES, G.; MACÍAS RUBALCAVA, M. L. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017, 101, 8209.
- [2] Morath, S. U. Bennett, R. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biology reviews* 2012, 26, 73
- [3] Banerjee, D.; Strobel, G. A.; Booth, E. Geary, B.; Sears, J.; Spakowicz, D.; Busse, S. An endophytic *Myrothecium inundatum* producing volatile organic compounds. *Mycosphere* 2010, 1, 229.
- [4] GADD, G.M. (1993), Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.
- [5] Fomina, M., & Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3-14.
- [6] Li, X., et al. (2004). Sesquiterpenes from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Azadirachta indica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 293-296
- [7] Polonio, J. C., & Martinez, M. J. (1997). Production of volatile compounds by the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* grown on wheat straw. *Mycological Research*, 101(8), 1011-1015.
- [8] Frisvad, J. C., et al. (2004). *Penicillium* species diversity in Norway, with secondary metabolite profiling of selected species. *Mycological Progress*, 3, 169-180.
- [9] Eadie, W. H. (1957). Helvolic acid, an antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 228(2), 607-611.
- [10] UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHARLOTTE (North Carolina at Charlotte). Du-Lab Team. ADAP: User Manual. *In: ADAP: User Manual*. Charlotte, 15 abr. 2019. Disponível em: mzmine.github.io. Acesso em: 4 mar. 2025.

[11] Li, Donghai, Shihong Yan, Peter Proksch, Zhen Yi Liang, Qiang Li and Jing Xu. "Volatile metabolites profiling of a Chinese mangrove endophytic *Pestalotiopsis* sp. strain." *African Journal of Biotechnology* 12 (2013): n. pag.

[12] Xu J, Kjer J, Sendker J, Wray V, Guan H, Edrada R, Lin W, Wu J, Proksch P. Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *J Nat Prod.* 2009 Apr;72(4):662-5.

[13] Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y. *et al.* *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryphyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J Gen Plant Pathol* 77, 336–341 (2011).

[14] Guido Fischer, Regina Schwalbe, Manfred Möller, Rene Ostrowski, Wolfgang Dott, Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility, *Chemosphere*, Volume 39, Issue 5, 1999, Pages 795-810.

[15] Klaus Fiedler, Edgar Schütz, Stefan Geh, Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Volume 204, Issues 2–3, 2001, Pages 111-121.

[16] FILL, T. P.; PALLINI, H. F.; AMARAL, L. S.; SILVA, J. V.; BIDÓIA, D. L.; PERON, F.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; RODRIGUES FILHO, E. "Copper and Manganese Cations Alter Secondary Metabolism in the Fungus *Penicillium brasilianum*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(8), 2016.