

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

**EFEITO DE INDUTORES ABIÓTICOS NO VOLATILOMA DE**  
***Penicillium citrinum* COLETADO EM SOLO DE MANGUEZAL**

**Mateus Rodrigues de Oliveira\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\*bolsista CAPES**

**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 Dissertação de Mestrado do candidato Mateus Rodrigues de Oliveira, realizada em 18/07/2025.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio José Cantanhede Filho (IFMA)

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

*Dedico esta dissertação à minha adorada  
mãe, Izaira Oliveira, e à minha amada irmã  
caçula, Glória Pompílio. Amo vocês.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos.

Agradeço a minha mãe por todos os esforços para cuidar de mim e dos meus irmãos.

Agradeço minha irmã Glória por iluminar minha vida.

Agradeço minha tia Maryane por todo apoio.

Agradeço imensamente aos meus amigos Davi e Fernando pela parceria e companherismos em todos os momentos.

Agradeço especialmente a minha família de SP tios Benedita e Francisco e primos Sabrina, Sarah e Junior.

Agradeço aos meus grandes amigos: Felipe, Tiago, Gabriel, Daniel e Michel, Rufino, Mike e William que Deus os abençoe sempre.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de bioquímica micromolecular de microrganismos (Labiommi).

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos durante o período que estive no mestrado.

Ao programa de Pós - graduação em Química da UFSCar.

A FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

A CAPES pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## Abreviaturas

4EG	4-etilguaiacol
4VG	4-vinilguaiacol
AF	Ácido ferúlico
BDA	Batata Dextrose Agar
benA	beta-tubulina
CAD	Cinamato descarboxilase
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COVs	Compostos Orgânicos Volateis
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
GPx	Glutathiona Peroxidase
HCA	Análise de Agrupamento Hierárquico
m/z	massa/carga
O-MT	O-metiltransferase
OSMAC	Uma cepa varios compostos
PAD	Ácido ferulíco descarboxilase
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTR-MS	Espectrometria De Massa Por Reação De Transferência De Prótons
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SOD	Superóxido Dismutase
SPME	Microextração em fase sólida
VGR	Vinil guaiacol redutase
VPR	Vinil fenol redutase
VSCs	Compostos Voláteis de Enxofre

## Lista de Tabelas

TABELA 3.1 - Valores de doses de irradiação no qual foi submetido os cultivos .....	26
TABELA 3.2- Composição dos meios de cultivos em g/L utilizados no experimento de tolerância .....	27
TABELA 4.1 – Anotações obtidas nos cultivos sob escuridão/Luz UV .....	36
TABELA 4.2 – Anotações obtidas nos cultivos em meio líquido no experimento com adição de cátions.....	48
TABELA 4.3 – anotações das moléculas encontradas em meio sólido.....	53

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1- Principais características das áreas de manguezal que impactam comunidades microbianas. ....	2
FIGURA 1. 2 - Visão geral de <i>P. citrinum</i> e espécies anamórficas relacionadas em vários meios de ágar. ....	6
FIGURA 1.3 - Funções dos compostos orgânicos voláteis microbianos. ....	8
FIGURA 1.4 - Volatiloma microbiano e correlações multiômicas ....	9
FIGURA 1.5 - Representação da técnica de hidrodestilação.....	12
FIGURA 1. 6 - Técnica de Headspace-SPME.....	13
FIGURA 1.7 - Cromatógrafo Shimadzu, em fase gasosa, acoplado ao espectrômetro de massas (QP2010-Plus).....	14
FIGURA 3.1 - Localização do ponto de coleta do Fungo <i>P. citrinum</i> ....	23
FIGURA 3.2 - Identificação micromorfológica de fungo filamentosos adaptada da técnica de microcultivo ....	24
FIGURA 4.10 - Macromorfologia do fungo <i>P. Citrinum</i> isolado de solo de mangueza.....	31
FIGURA 4.11- Micromorfologia do fungo <i>P. Citrinum</i> isolado de solo de manguezal.....	32
FIGURA 4.12 – Análise de distância genética com base na região <i>benA</i> , mostrando a relação entre a linhagem <i>Penicillium</i> (CPQBA 3990-25 DRM 03) e outras linhagens relacionadas do GenBank. ....	33
FIGURA 4.20 – Rede molecular obtida dos cultivos controle (no escuro) e irradiados com luz UV-A. A parte em preto nos nós indica moléculas mais abundantes no grupo controle (escuridão total), a cor azul representa aquelas predominantes sob fotoperíodo ....	35
FIGURA 4.21 - PCA scores obtidos nos cultivos sobre escuridão (controle) e sob irradiação UV-A com variações de foto período e luz contínua.....	37
FIGURA 4.22 - Dendrograma obtido com os cultivos sobre escuridão (controle) e sob irradiação UV-A com variações de foto período e luz contínua ....	38

FIGURA 4.23- Gráfico de análise de variância univariada.....	39
FIGURA 4.24 – Gráficos de box plot das moléculas com produção impactada com cultivo sob irradiação .....	40
FIGURA 4.25 - Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do fenilacetaldéido .....	42
FIGURA 4.26 - Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do esqualeno.....	43
FIGURA 4.30 - Teste de tolerância relacionando a media das massas miceliais secas e as concentrações dos cátions avaliadas. a) teste com $Mn^{2+}$ . b) teste com $Co^{2+}$ .....	45
FIGURA 4.31 – Rede molecular dos cultivos em meio líquido com adição de cátions metálicos. A cor azul nos nós indica abundancia relativa das moléculas nos grupos controle (Czapek sem modificações), a vermelha no experimento com adição de $Mn^{2+}$ e a verde com adição de $Co^{2+}$ .....	46
FIGURA 4.32 - Cromatogramas de íons totais, demonstrando sinais de compostos encontrados nos cultivos adicionados com cátions metálicos e o controle. ....	47
FIGURA 4.33 – Gráfico de análise de componentes principais (scores) em meio líquido.....	49
FIGURA 4.34 – Gráfico de análise de componentes principais (biplot) em meio líquido.....	50
FIGURA 4.35 - Dendrograma de clusterização hierárquica representando os grupos cultivados em meio líquido.....	51
FIGURA 4.36 - Mapa de calor representando as intensidades dos COVs entres os grupos avaliados em meio sólido.....	52
FIGURA 4.37 - Cluster evidenciando a classe de metabolitos advindas do caminho do acetato e derivados.. ..	54

FIGURA 4.38- Cromatogramas obtidos nos diferentes cultivos em meio sólido evidenciando a diferença entre ácido 9,12 octadecanóico e 1-octen-3-ol. ....	55
FIGURA 4.39 - Cluster de terpenoides obtido em meio sólido.....	56
FIGURA 4.40 – Cluster obtido em meio sólido contendo moléculas aromáticas .....	57
FIGURA 4.41- Gráfico de análises de componentes principais em meio sólido (scores). ....	58
FIGURA 4.42- Gráfico de análises de componentes principais em meio sólido (biplot).....	59
FIGURA 4.43- Gráfico de dendrograma dos cultivos em meio sólido .....	60
FIGURA 4.44 - Mapa de calor representando as intensidades dos COVs entre os grupos avaliados em meio sólido.....	61
FIGURA 4.45- Proposta de biossíntese de alquil pirazinas obtidas nos cultivos em meio líquido.....	63
FIGURA 4.46- Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do 1-octen-3-ol.....	64
FIGURA 4.47- Proposta de rota biossintética para o 1-octen-3-ol.....	66
FIGURA 4.48 - Biossíntese de terpenóides fungicos induzidos pela adição de $Mn^{2+}$ .....	68
FIGURA 4.49 - Estrutura, espectro de massas e proposta de fragmentação do germacreno D .....	69
FIGURA 4.50 - Representação das rotas enzimáticas de 4VG e seus derivados	70
FIGURA 4.51 - Mecanismo proposto para produção de 4-etilfenol e 4-etilanol em <i>P.citrinum</i> .....	71
FIGURA 4.52 – Via do catabolismo de fenilalanina. ....	72
FIGURA 4.53 – Estrutura, espectro de massas e proposta de fragmentação de 4-(3-Metil-2-butenil)-1H-indol.....	73
FIGURA 4.54 – Biossíntese proposta para a formação de indóis prenilados simples C4 em fungos.....	74

## Resumo

EFEITO DE INDUTORES ABIÓTICOS NO VOLATILOMA DE *Penicillium citrinum* COLETADO EM SOLO DE MANGUEZAL. Microrganismos desempenham um papel essencial na dinâmica dos ecossistemas, inclusive por meio da emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs), moléculas de baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor, muitas vezes associadas a odores distintos. Esses compostos funcionam como mediadores químicos entre os microrganismos e o ambiente. Entre os principais produtores de COVs estão os fungos filamentosos, como os do gênero *Penicillium*, encontrados em diversos habitats, como solos, matéria orgânica em decomposição e ambientes úmidos. Os COVs sintetizados por esses organismos compreendem um amplo espectro de moléculas, pertencentes a diferentes classes químicas, tais como álcoois, ácidos graxos, aldeídos, terpenos e compostos aromáticos. A produção desses metabólitos pode ser modulada por alterações nas condições ambientais ou no meio de cultivo. Entre os fatores abióticos que afetam diretamente o metabolismo microbiano destacam-se os íons metálicos e a intensidade luminosa. Metais com função redox, como Fe, Mn e Co, atuam como cofatores em enzimas de vias biossintéticas. Já a luz, em especial a radiação UV-A, influencia processos como germinação, crescimento e esporulação fúngica, desencadeando alterações metabólicas significativas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), ferramentas de redes moleculares e análises estatísticas, as alterações no volatiloma do fungo *Penicillium citrinum* isolado do solo de manguezal no Maranhão, sob estresse induzido por altas concentrações dos íons  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$ , bem como por diferentes intensidades de radiação UV-A. Os cultivos foram realizados em balões de fundo redondo de 2 L, utilizando meio líquido composto por glicose, extrato de levedura, sais minerais e  $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ . Para o meio sólido, empregou-se arroz parboilizado hidratado. A esterilização foi feita por autoclavagem (15 min a  $120^\circ C$  e 1 atm). A indução por metais consistiu na substituição do  $Fe^{2+}$  por 19,8 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  e 2,38 g/L de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  no meio líquido, e pela adição de 7,13 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  e 0,86 g/L de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  no meio sólido. O experimento com UV-A foi realizado apenas em meio líquido, com dois regimes: fotoperíodo 12/12 h e exposição contínua. Todos os cultivos tiveram duração de 14 dias. A extração dos COVs foi realizada por hidrodestilação com éter dietílico, utilizando aparelho de Clevenger modificado sob refluxo por 2 horas. Após a extração, o hidrolato foi descartado, e a fração orgânica contendo os compostos voláteis foi coletada para análise. Os resultados mostraram que os estresses abióticos induziram alterações significativas nas vias metabólicas da cepa de *P. citrinum*, com destaque para enzimas como lipoxigenases, sesquiterpeno sintases e O-metiltransferases. Houve mudanças significativas na produção de diversos metabólitos voláteis.

## Abstract

EFFECT OF ABIOTIC INDUCERS ON THE VOLATILOME OF *Penicillium citrinum* COLLECTED FROM MANGROVE SOIL Microorganisms play an essential role in the dynamics of ecosystems, including through the emission of volatile organic compounds (VOCs) molecules of low molecular weight, low water solubility, and high vapor pressure, often associated with distinct odors. These compounds function as chemical mediators between microorganisms and the environment. Among the main producers of VOCs are filamentous fungi, such as those of the *Penicillium* genus, found in diverse habitats like soils, decomposing organic matter, and humid environments. The VOCs synthesized by these organisms comprise a broad spectrum of molecules belonging to different chemical classes, such as alcohols, fatty acids, aldehydes, terpenes, and aromatic compounds. The production of these metabolites can be modulated by changes in environmental conditions or culture medium. Among the abiotic factors that directly affect microbial metabolism, metal ions and light intensity are prominent. Redox-active metals, such as Fe, Mn, and Co, act as cofactors in enzymes of biosynthetic pathways. Light, especially UV-A radiation, influences processes such as germination, growth, and fungal sporulation, triggering significant metabolic alterations. In this context, the present study aimed to investigate, through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), molecular networking tools, and statistical analyses, the alterations in the volatilome of the fungus *Penicillium citrinum*, isolated from mangrove soil in Maranhão, under stress induced by high concentrations of  $Mn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  ions, as well as by different intensities of UV-A radiation. The cultures were grown in 2 L round-bottom flasks using a liquid medium composed of glucose, yeast extract, mineral salts, and  $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ . For the solid medium, hydrated parboiled rice was used. Sterilization was performed by autoclaving (15 min at  $120^\circ C$  and 1 atm). Metal induction consisted of replacing  $Fe^{2+}$  with 19.8 g/L of  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  and 2.38 g/L of  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  in the liquid medium, and by adding 7.13 g/L of  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  and 0.86 g/L of  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  to the solid medium. The UV-A experiment was conducted only in liquid medium under two regimes: a 12/12 h photoperiod and continuous exposure. All cultures had a duration of 14 days. The extraction of VOCs was performed by hydrodistillation with diethyl ether, using a modified Clevenger apparatus under reflux for 2 hours. After extraction, the hydrosol was discarded, and the organic fraction containing the volatile compounds was collected for analysis. The results showed that the abiotic stresses induced significant alterations in the metabolic pathways of the *P. citrinum* strain, with emphasis on enzymes such as lipoxygenases, sesquiterpene synthases, and O-methyltransferases. There were significant changes in the production of several volatile metabolites.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Manguezal e sua importância.....	2
1.2 Fungos de manguezais .....	3
1.3 <i>Penicillium citrinum</i> e seu potencial como microrganismo.....	5
1.4 Volatilômica de microrganismos.....	7
1.5 Indutores abióticos .....	9
1.6 Coleta e detecção de COVs microbianos.....	11
1.7 Detecção de compostos orgânicos .....	14
1.8 Redes Moleculares e análises estatísticas .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivos gerais .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materiais .....	20
3.1.1 Materiais utilizados para o repique do fungo e análise morfológica .....	20
3.1.2 Materiais utilizados para o preparo do meio líquido Czapek enriquecido com extrato de levedura .....	20
3.1.3 Materiais utilizados para o cultivo em meio sólido.....	21
3.1.4 Materiais utilizados para Hidrodestilação.....	21
3.1.5 Sais adicionados sobre os meios de cultivo.....	21
3.2 Equipamentos .....	21
3.2.1 Equipamentos utilizados para o cultivo do fungo preparo do meio de cultivo e Análise morfológica .....	21
3.2.2 Cromatografo gasoso acoplado a espectrometro de massas.....	22
3.2.3 Processamento de dados, análise estatística e formação de redes moleculares .....	22
3.3 Metodologia .....	22
3.3.1 Isolamento .....	22
3.3.2 Análise morfológica do fungo.....	223
3.3.3 Identificação molecular.....	24
3.3.4 Cultivo dos Controles.....	25
3.3.5 Cultivo irradiado sob Luz UV-A.....	26
3.3.6 Avaliação das concentrações tóxicas dos cátions metálicos para o crescimento de fungos .	26
3.3.7 Cultivo sob estresse com cátions metálicos .....	27
3.3.8 Hidrodestilação.....	28
3.3.9 Análise por CG-EM .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>29</b>
4.1 Indetificação morfológica e molecular .....	31
4.1.1 Identificação macromorfológica .....	31
4.1.2 Identificação micromorfológica .....	32

<b>4.1.3 Identificação molecular.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com luz UV-A no volatiloma de <i>P. citrinum</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1 Análises estatísticas do volatiloma sob luz UV-A .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com os cátions <math>Mn^{2+}</math> e <math>Co^{2+}</math> de <i>P. citrinum</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.1 Tolerância do fungo a diferentes concentrações de cátions metálicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.2 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com cátions <math>Mn^{2+}</math> e <math>Co^{2+}</math> no volatiloma de <i>P. citrinum</i> em meio líquido.....</b>	<b>46</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Manguezal e sua importância

O manguezal é caracterizado por um agrupamento de árvores e arbustos tropicais e subtropicais, situados nas zonas de transição entre os ambientes terrestre e marinho (Abdel-Azeem *et al.*, 2016). Eles são reconhecidos como um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, em grande parte devido à sua rica diversidade de plantas, animais e microrganismos.

Além disso, esse ecossistema é essencial na preservação da diversidade de plantas e microrganismos, incluindo fungos, protozoários, bactérias e algas. Ele também oferece um ambiente propício para a vida aquática, abrigando peixes, crustáceos e répteis, assim como para animais terrestres, como mamíferos e aves (Abdel-Azeem *et al.*, 2016; Rajpar; Zakaria, 2014). A Figura 1.0 destaca características importantes sobre o manguezal.

FIGURA 1.1- Principais características das áreas de manguezal que impactam comunidades microbianas.



Fonte: Adaptado de Braga *et.al* (2024)

Adicionalmente, esses ecossistemas enfrentam inundações recorrentes e variações no nível das marés, fatores que contribuem para uma intensa produção de biomassa e para a manutenção de comunidades microbianas únicas (Bai *et al.*, 2013; Bingham; Kathiresan, 2001). Os fungos que habitam os manguezais têm a capacidade de produzir uma ampla diversidade de metabólitos secundários bioativos, caracterizados por estruturas únicas, como alcaloides,

benzopirranonas, quinonas, ácidos fenólicos, esteroides, terpenoides, tetralonas, xantonas, entre outros, que apresentam distintas atividades farmacológicas (Imhoff, 2016).

Infelizmente, os manguezais vêm sendo constantemente ameaçados por ações humanas, especialmente pela pesca e, de forma ainda mais impactante, pela criação de camarões, que têm contribuído para o desmatamento dessas áreas. Pesquisas apontam que, nas últimas duas décadas e meia, cerca de 4% da área total de manguezais no Brasil foi perdida, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que apresentam os maiores índices de degradação, resultando em sérias perdas de biodiversidade (Ferreira; Lacerda, 2016).

Apesar da reconhecida importância ecológica dos manguezais, o conhecimento sobre os microrganismos que habitam esses ambientes, especialmente os fungos, ainda é bastante limitado. O papel que essas comunidades microbianas desempenham no funcionamento do ecossistema permanece pouco explorado.

## **1.2 Fungos de manguezais**

As propriedades físico-químicas singulares do ecossistema de manguezal, como alta salinidade, variações térmicas e baixa oxigenação, induzem adaptações fisiológicas específicas nos microrganismos que o habitam, como a halofilia e a termoestabilidade. Tais características são particularmente evidentes nas enzimas produzidas por fungos marinhos, que se diferenciam funcionalmente de suas contrapartes terrestres.

Devido à sua notável diversidade genética e bioquímica, esses microrganismos são considerados fontes promissoras de enzimas, com aplicações potenciais em diversos processos biotecnológicos (Bonugli-Santos *et al.*, 2015). Nesse contexto, compreender a diversidade biológica e funcional dos fungos nos manguezais é essencial, especialmente considerando seu papel importante na

degradação de compostos orgânicos e poluentes ambientais. Essa compreensão amplia o conhecimento sobre os organismos que habitam esse ecossistema e contribui para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de biorremediação. Embora muitos estudos se concentrem majoritariamente em comunidades bacterianas, a investigação do potencial fúngico ainda é incipiente, evidenciando uma lacuna científica relevante (Harms *et al.*, 2011; Treseder, 2005).

Os fungos presentes em diferentes nichos do manguezal podem ser classificados como terrestres, quando colonizam as partes aéreas das plantas, ou marinhos, quando se estabelecem em áreas submersas ou periodicamente alagadas pelas marés. Na zona de interface entre esses ambientes, observa-se uma combinação desses grupos, embora em menor abundância devido às condições de baixa oxigenação (Fasanella, 2012).

Dias *et al.* (2017) realizaram o isolamento de microrganismos presentes no solo da região do Mangue Seco, no município de Raposa, Maranhão. No estudo, foram identificadas 16 espécies bacterianas e cinco fúngicas, com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, ambos reconhecidos por sua versatilidade metabólica e potencial biotecnológico.

Em estudo semelhante, Rodrigues *et al.* (2020) analisaram a diversidade fúngica no solo do Parque Estadual da Lagoa Jansen, em São Luís, uma área impactada por atividades antrópicas. Os autores registraram a ocorrência de diversos gêneros, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Entre as espécies identificadas, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamaritii* se destacaram por sua alta frequência, evidenciando a adaptação dessas espécies a ambientes urbanos e sujeitos à ação humana.

Complementando essas investigações, Teles *et al.* (2020) destacaram a relevância biotecnológica do fungo *Penicillium purpurogenum*, também isolado dos sedimentos da Lagoa Jansen, localizada no Maranhão. A partir de extratos obtidos com acetato de etila, a análise química revelou uma ampla variedade de

compostos bioativos, incluindo fenóis, alcaloides, triterpenos, catequinas e esteroides.

Essas substâncias despertam grande interesse científico devido ao seu potencial farmacológico, apresentando propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias. A presença desses metabólitos em fungos de manguezal reforça o valor desse ecossistema como uma fonte promissora para a prospecção de compostos com aplicações na biotecnologia e na indústria farmacêutica.

### **1.3 *Penicillium citrinum* e seu potencial como microrganismo**

Entre as diversas espécies de fungos, os do gênero *Penicillium* se destacam devido à sua capacidade de se desenvolver rapidamente em meios de cultura. Além disso, esses fungos são conhecidos pela habilidade de sintetizar uma ampla variedade de metabólitos secundários, como alcaloides, meroterpenos, policetídeos, terpenoides, esteroides e aminoácidos, entre outras substâncias. É importante ressaltar que muitos desses compostos exibem uma diversidade de atividades biológicas, com destaque para as atividades antimicrobiana e citotóxica (Marinho, 2006).

*P. citrinum* é um fungo filamentosamente distribuído em todo o mundo, sendo considerado uma das formas eucarióticas mais prevalentes no planeta (Pitt, 1979). Essa espécie já foi isolada de uma variedade de substratos, incluindo solo, grãos tropicais, especiarias e até mesmo ambientes internos, como residências e edificações (Samson *et al.*, 2004). A Figura 1.2 apresenta as taxas de crescimento em diferentes meios de cultura para diferenciação entre *P. citrinum* e espécies relacionadas.

*P. citrinum* desempenha um papel relevante na promoção do crescimento vegetal, auxiliando na absorção de nutrientes pelas plantas e produzindo compostos bioativos como auxinas e giberelinas, conforme observado

por Khan *et al.* (2008). Além de seu potencial benéfico, esse fungo é conhecido pela produção da micotoxina citrinina, bem como por enzimas como endoglucanase e xilulose, que atuam na degradação de componentes celulósicos.

Adicionalmente, Kuramata *et al.* (2007) identificaram a capacidade da espécie de sintetizar novos reguladores do crescimento de plantas, como as citrinolactonas A, B e C, além da esclerotinina C. Esses achados evidenciam a versatilidade metabólica de *P. citrinum* e seu potencial uso em aplicações agrícolas e biotecnológicas.

Em uma investigação sobre a quiomiossistemática de compostos orgânicos voláteis (COVs) em 47 táxons do gênero *Penicillium*, observou-se que a espécie *P. citrinum* não produziu nenhum metabólito detectável durante o estudo (Larsen; Frisvad, 1995). Esse resultado destaca a variação no perfil metabólico entre diferentes espécies do gênero, levantando questões sobre os fatores que podem influenciar a produção de COVs em *P. citrinum*.

FIGURA 1.2 - Visão geral de *P. citrinum* e espécies anamórficas relacionadas em vários meios de ágar.



Fonte Houbraken *et.al* (2010)

## 1.4 Volatilômica de microrganismos

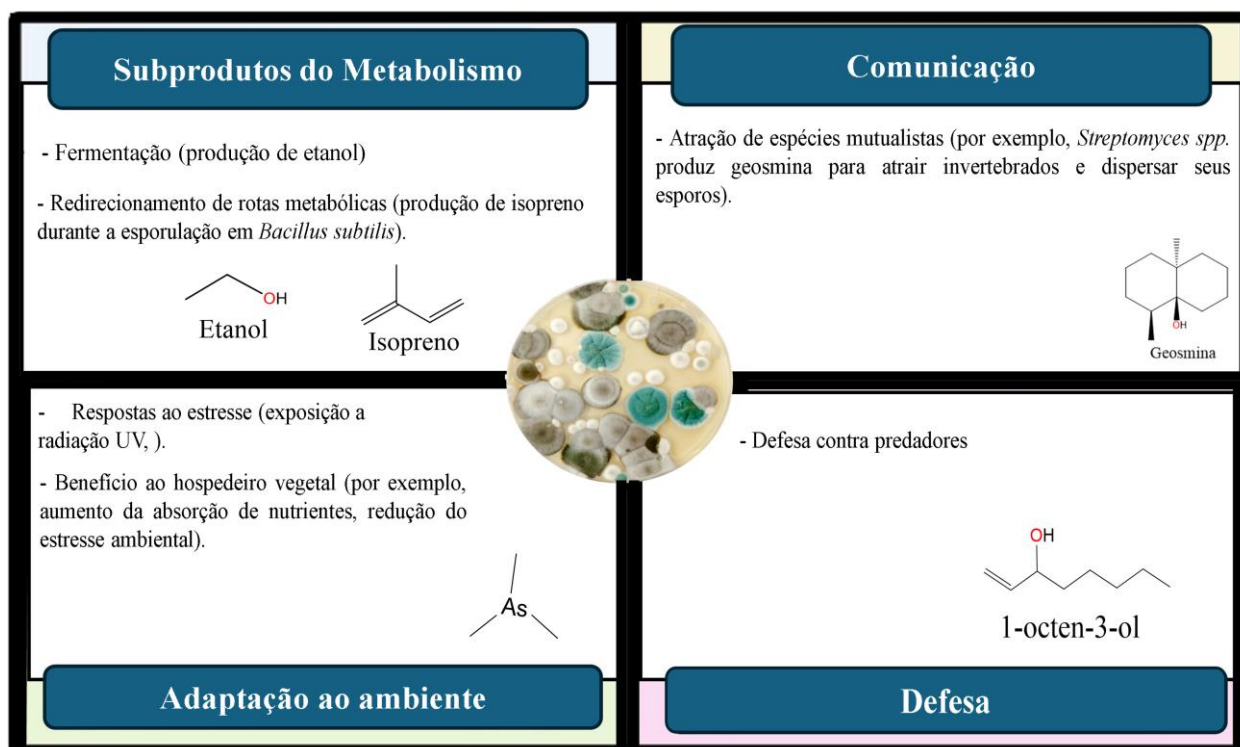
Os microrganismos desempenham um papel essencial na modelagem do ambiente em que vivem. Um fator importante, porém muitas vezes negligenciado, é a sua capacidade de emitir diversos compostos voláteis. Essas substâncias, produzidas pelos microrganismos, apresentam uma composição extremamente variada, refletindo a ampla diversidade metabólica desses organismos (Schmidt et al., 2015).

Devido à sua natureza volátil, muitos desses compostos atuam como mediadores de comunicação entre os microrganismos (Kai; Piechulla; Wenke, 2010; Garbeva; Sánchez; Bohm, 2017). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelos microrganismos são definidos por seu baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor ( $\geq 0,01$  kPa a 20 °C), sendo que muitos deles apresentam aromas característicos (Herrmann, 2011).

Alguns COVs, como o etanol, podem ser simples subprodutos de processos fermentativos ou vias metabólicas usadas para eliminar excessos metabólicos (Shirk *et al.*, 2002). No entanto, muitos desses compostos assumem funções mais complexas, sendo essenciais em interações competitivas ou cooperativas entre microrganismos, já que conseguem se dispersar facilmente tanto em meios líquidos quanto gasosos (Weisskopf *et al.*, 2021).

Diversos estudos já evidenciaram que os COVs microbianos podem ter efeitos promotores ou inibidores sobre o crescimento de diferentes organismos, como plantas, fungos, bactérias e protozoários. Além disso, esses compostos influenciam processos importantes como a sinalização por quorum sensing, a formação de biofilmes e até a resistência bacteriana a antibióticos (Bohm *et al.*, 2017; Chernin *et al.*, 2011). Há também indícios de que microrganismos utilizam esses compostos para atrair animais mutualista (Becher *et al.*, 2020) ou como uma forma de proteção contra predadores (Nguyen *et al.*, 2022).

FIGURA 1.3 - Funções dos compostos orgânicos voláteis microbianos.



Fonte: Adaptado de García *et.al* (2025)

Atualmente, a maioria das pesquisas em metabolômica microbiana está voltada para a análise de metabólitos orgânicos não voláteis, enquanto os compostos voláteis ainda permanecem pouco investigados e representam uma parte negligenciada do metabolismo microbiano (Honeker *et al.*, 2021).

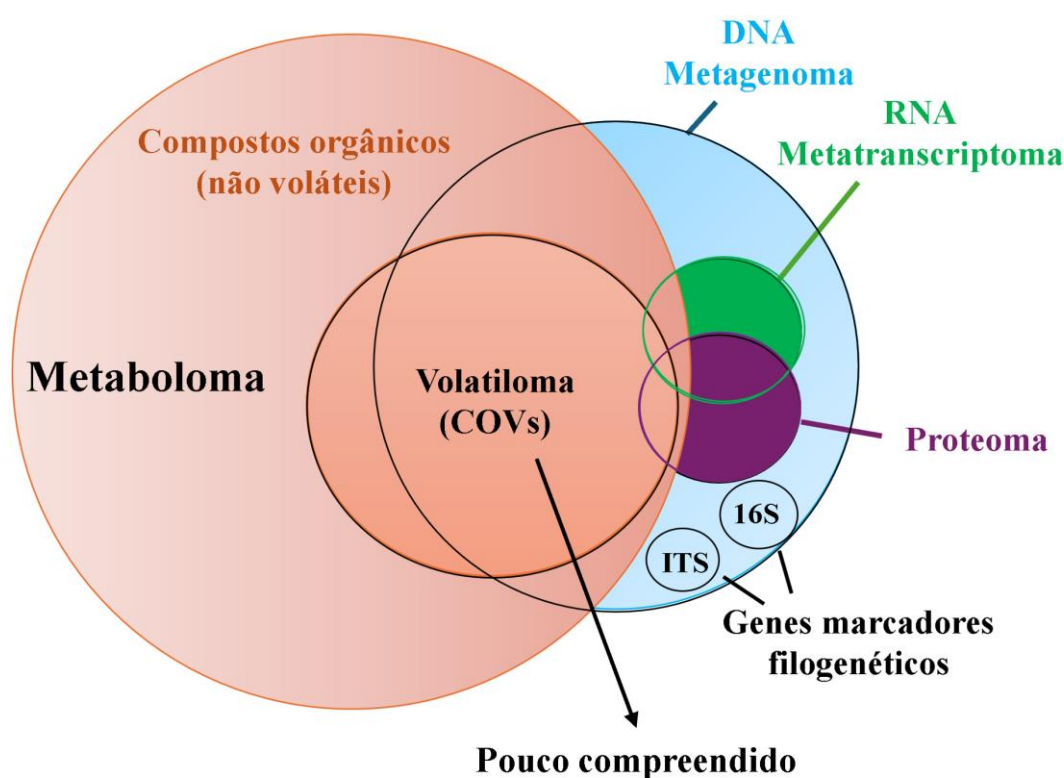
Nas últimas décadas, a volatilômica surgiu como uma fronteira entre biologia, química e bioquímica, com foco nos perfis de emissão de compostos voláteis em diversos sistemas biológicos. A FIGURA 1.4 apresenta a correlação multiômica existente entre o volatiloma e outras ciências ômicas.

A volatilômica apresenta um vasto campo de aplicações em diversas áreas científicas e tecnológicas. Ela tem sido utilizada para investigar interações microbianas e medir a biodiversidade em comunidades ecológicas (Steinke *et al.*, 2018; Usai *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016). Também se destaca na detecção da exposição a contaminantes ambientais (Bouhleb *et al.*, 2017; Hidalgo *et al.*, 2019). Outros usos relevantes incluem o monitoramento de processos como fermentação e compostagem (Aboudi *et al.*, 2021), a garantia da qualidade de alimentos

(Starowicz, 2021) e a avaliação de impactos relacionados às mudanças climáticas (Yuan *et al.*, 2009).

Além dessas aplicações, destaca-se o potencial dos compostos voláteis microbianos como marcadores biológicos no contexto da astrobiologia. Isso se deve à sua detecção mesmo em concentrações extremamente baixas, à sua diversidade estrutural e às assinaturas químicas distintamente associadas a processos biológicos (Seager *et al.*, 2012).

FIGURA 1.4 - Volatiloma microbiano e correlações multiômicas



Fonte: Adaptada de Meredith *et. al* (2025)

### 1.5 Indutores abióticos

O modo convencional de cultivar uma única espécie pode limitar a funcionalidade das vias metabólicas dos microrganismos, levando à possível ausência de síntese de diversos metabólitos (Wei *et al.*, 2010). A abordagem OSMAC (One Strain Many Compounds) tem se destacado como uma estratégia

eficaz para ampliar a diversidade de metabólitos secundários produzidos por microrganismos.

Esse método explora o potencial biossintético de uma única linhagem microbiana ao submetê-la a diferentes condições de cultivo. As alterações podem ser provocadas por influências de fatores abióticos, como pH, temperatura, presença de cátions metálicos, intensidade luminosa, entre outros (Bode *et al.*, 2002).

No entanto, do ponto de vista probabilístico, a abordagem de alteração de parâmetros se torna desafiadora, pois há inúmeras possibilidades de modificação de parâmetros de cultivo (Romano *et al.*, 2018). Dessa maneira, na literatura, é relatado que a aplicação dessas estratégias pode regular o grau e o padrão de expressão dos genes na produção de metabólitos secundários (Pan *et al.*, 2019).

A utilização de cátions metálicos pode influenciar e provocar mudanças na estrutura fisiológica, bem como na função dos microrganismos (Dedyukhina; Eroshin, 1991). Vários metais com funções redox, como Fe, Mn, Zn, Co, Ni, Mo e Mg, são fatores-chave para muitas enzimas microbianas envolvidas nas vias de biossíntese (Dubey *et al.*, 2019).

Algumas teorias foram propostas para explicar como certos microrganismos conseguem se adaptar à presença de metais de transição. Uma dessas explicações envolve a formação de metaloproteínas e metaloenzimas. Devido à presença de orbitais d disponíveis, esses metais podem se ligar a grupos doadores de elétrons, participando de reações de oxirredução ao interagir com proteínas, além de atuarem como cofatores em processos enzimáticos (Culotta; Daly, 2013).

Além disso, os metais podem induzir modificações estruturais nas enzimas ao se complexarem com resíduos de aminoácidos, o que pode facilitar a ligação de novos substratos. Esse processo pode levar à formação de produtos

metabólicos inéditos, contribuindo para a diversidade química observada nesses organismos (Foster *et al.*, 2014).

Fatores como a intensidade luminosa exercem influência crítica na germinação, crescimento e esporulação de fungos, com estudos demonstrando que diferentes condições de luz desencadeiam respostas bioquímicas distintas no metabolismo fúngico (Yu; Fischer, 2019).

A exposição à radiação ultravioleta é prejudicial aos fungos. A mesma é capaz de desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Nesse caso, espera-se que o fungo produza moléculas antioxidantes, que agem inativando as EROS, absorvendo e neutralizando a radiação, além de ativar mecanismos de reparo do DNA (Braga *et al.*, 2015).

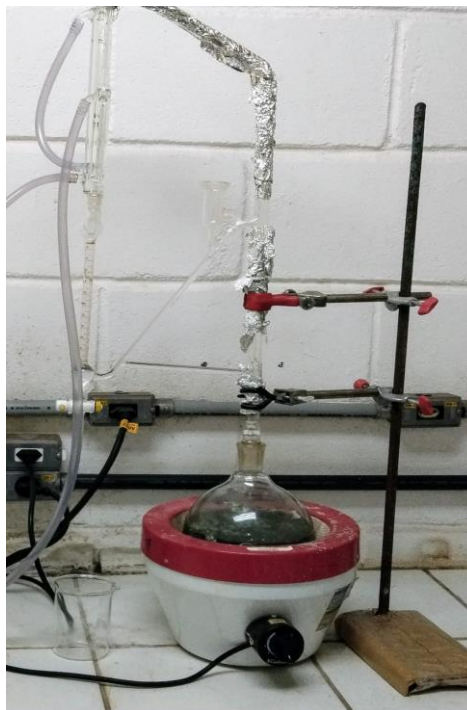
Apesar do que foi dito, os impactos da exposição a cátions metálicos e à radiação UV-A na produção de COVs microbianos permanecem pouco explorados.

## **1.6 Coleta e detecção de COVs microbianos**

A hidrodestilação é uma técnica amplamente utilizada na extração de compostos bioativos, especialmente óleos essenciais, sendo valorizada por sua simplicidade e viabilidade econômica. O processo pode ser realizado por destilação a vapor simples ou com o uso de um aparelho Clevenger, no qual a amostra hidratada é aquecida até que os compostos voláteis evaporem (FIGURA 1.5).

Em ambas as abordagens, os compostos extraídos formam uma mistura com duas fases: uma aquosa e outra oleosa, permitindo a separação dos COVs presentes na fase apolar com o auxílio de um funil separador. A hidrodestilação envolve principalmente três etapas físico-químicas: hidrodifusão, hidrólise e decomposição térmica (Oreopoulou, A.; Oreopoulou, V.; Tsimogiannis, 2019).

FIGURA 1.5 - Representação da técnica de hidrodestilação



Fonte: Autoria própria (2025)

Matysik *et al.* (2009) demonstraram que filtros de carvão ativado são eficazes na adsorção de uma ampla variedade de compostos, incluindo hidrocarbonetos, ésteres, éteres, álcoois, cetonas, éteres de glicol e hidrocarbonetos halogenados. No entanto, a recuperação de compostos menos voláteis ou mais reativos, como aminas, fenóis, aldeídos e hidrocarbonetos insaturados, mostrou-se limitada. Isso se deve à forte interação desses compostos com o carvão ativado, dificultando sua posterior liberação.

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica que utiliza uma fibra recoberta por sílica fundida e uma camada polimérica, composta comumente por materiais como polidimetilsiloxano, carbowax, poliacrilato ou ainda por substâncias com propriedades adsorventes, como o carvão ativado em partículas micrométricas. A escolha do revestimento da fibra influencia diretamente sua eficiência na captura de compostos voláteis, variando conforme

a massa molar, a temperatura de exposição e o método analítico utilizado (Valente; Augusto, 2000).

O procedimento representado na FIGURA 1.6 envolve a inserção direta da fibra em frascos herméticos contendo a amostra, onde ocorre o equilíbrio entre os analitos voláteis presentes no espaço acima da amostra (headspace) e a fase estacionária da fibra. Esse equilíbrio é tanto termodinâmico quanto cinético. Após o tempo de extração, que depende das condições específicas do experimento, os compostos que possuem afinidade com o material da fibra são retidos e, em seguida, liberados no injetor do equipamento para análise (Nascimento et al., 2018).

FIGURA 1.6 - Técnica de Headspace-SPME



Fonte: Adaptado de Lancioni *et.al* (2022)

## 1.7 Detecção de compostos orgânicos

O estudo dos COVs pode ser conduzido através de diversas técnicas de separação e caracterização, tais como cromatografia, eletroforese capilar, espectrometria de massas, entre outras (Prata; Mogollón; Augusto, 2016). Atualmente, as técnicas combinadas de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) FIGURA 1.7, são extensivamente empregadas nas anotações desses compostos, contando com diversas bibliotecas de espectros de massas permitindo a comparação espectral, juntamente com os índices de retenção linear que podem ser auxiliares nessa etapa melhorando a confiança da anotação.

FIGURA 1.7 - Cromatógrafo em fase gasosa, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu (QP2010-Plus).



Fonte: Autoria própria (2025)

Na técnica CG-EM, a fonte de ionização mais comum é o impacto eletrônico. Nessa abordagem, a amostra é vaporizada pelo CG, chegando à câmara de ionização é submetida a um feixe de elétrons de alta energia, podendo formar moléculas ionizadas ou não, os fragmentos ionizados são direcionados até o analisador, onde são separados com base na sua relação  $m/z$  (Bustillos, 2020).

A espectrometria de massa por reação de transferência de prótons (PTR-MS) é uma técnica que vem ganhando espaço nos estudos de COVs, ela permite a ionização de moléculas orgânicas presentes na fase gasosa por meio de sua interação com íons  $\text{H}_3\text{O}^+$ , gerando predominantemente íons do tipo  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , os quais são posteriormente detectados por um analisador de massa, geralmente do tipo quadrupolo acoplado a um multiplicador de elétrons (Lindinger; Jordan, 1998). A PTR-MS destaca-se por sua alta sensibilidade e resposta rápida, sendo bastante eficiente para a quantificação de COVs produzidos por fungos (Ezra *et al.*, 2004).

Entre suas principais vantagens estão a capacidade de realizar análises em tempo real e com níveis de sensibilidade comparáveis aos da técnica de CG-EM. Essa metodologia, por exemplo, já foi aplicada com sucesso na quantificação dos COVs emitidos por *Muscodor albus* (Ezra *et al.*, 2004).

O chamado "nariz eletrônico" representa uma inovação promissora no monitoramento de compostos voláteis produzidos por fungos. Esses dispositivos consistem em conjuntos de sensores químicos eletrônicos associados a sistemas de reconhecimento de padrões, capazes de identificar odores, sejam eles simples ou complexos (Bartlett; Gardner, 1992; Baietto; Wilson, 2009). De forma geral, um sistema de nariz eletrônico é composto por múltiplos sensores, uma unidade de processamento de dados, um software específico para análise de padrões e uma base de dados de referência (Baietto; Wilson, 2009).

Essa tecnologia detecta alterações nas propriedades físicas do material sensor, como massa, características ópticas ou elétricas, após a exposição aos compostos voláteis, permitindo uma análise qualitativa sem a necessidade de separação dos componentes da mistura. Os resultados gerados funcionam como "impressões digitais eletrônicas" únicas.

Devido à sua versatilidade, o nariz eletrônico tem sido aplicado em diversas áreas, incluindo medicina, indústria farmacêutica, defesa e regulamentação. No contexto da micologia clínica, ele permite, por exemplo, a

identificação de fungos de importância médica de forma não invasiva (Magan; Sahgal, 2008; Sahgal *et al.*, 2006), além de possibilitar o monitoramento da eficácia de tratamentos antifúngicos e da resistência adquirida pelos patógenos (Naraghi *et al.*, 2010; Pont *et al.*, 2012).

## 1.8 Redes Moleculares e análises estatísticas

A Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) é uma plataforma online gratuita contendo um universo de dados de espectrometria de massas para identificação de compostos e formação de redes moleculares. Nesta plataforma, os dados inseridos são analisados e os espectros de massas semelhantes são conectados, formando redes moleculares (Liu *et al.*, 2025).

Ferramentas estatísticas multivariadas como PCA (Análise de Componentes Principais), HCA (Análise de Agrupamento Hierárquico) e mapa de calor são amplamente utilizadas na análise de compostos orgânicos voláteis microbianos, pois permitem interpretar grandes volumes de dados de forma clara e comparativa (Oliveira *et al.*, 2017). A PCA revela padrões e agrupando entre amostras com perfis metabólicos semelhantes ou distintos, a HCA complementa essa análise ao mostrar a proximidade entre grupos amostrais ou compostos em forma de clados no dendrograma, enquanto os mapas de calor oferecem uma visualização gráfica das intensidades dos compostos voláteis entre as amostras, facilitando a identificação de tendências, variações e marcadores químicos. Juntas, essas abordagens tornam-se fundamentais para compreender o impacto de diferentes condições de cultivo sobre a produção de COVs .

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar o impacto ocasionado pelas adições dos cátions  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  e da irradiação com luz UV-A no volátiloma do fungo *P. citrinum* isolado de solo de manguezal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter os constituintes voláteis (controles/estressados com fatores abióticos).
- Realizar análises dos constituintes voláteis via CG-EM.
- Pré-processar os espectros de massas utilizando software Mzmine.
- Obter redes moleculares e análises estatísticas.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Materiais utilizados para o repique do fungo e análise morfológica

- Batata, dextrose, Ágar (BDA) - ACUMÉDIA®;
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Placa Petri.
- Alça de platina;
- Bico de Bunsen;
- Lâmina de Bisturi;
- Lâminas
- Lamínulas
- Pinça estéril

##### 3.1.2 Materiais utilizados para o preparo do meio líquido Czapek enriquecido com extrato de levedura

- Balões de fundo redondo de 2L
- Água destilada;
- Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) (98%)- Synth;
- Cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ) (98 – 101%) - Synth;
- Cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) (98%) - Synth;
- Cloreto de potássio (KCl) (99 – 100,5%) - Synth;
- Extrato de levedura - Neogen;

- Fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) (98%)- Synth;
- Glicose - Synth;
- Nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ) (97%) - Synth;
- Sulfato de ferro ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (99%) - Reagen;
- Sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (99%)- Synth.

### **3.1.3 Materiais utilizados para o cultivo em meio sólido**

- Balões de fundo redondo de 2L
- Arroz parboilizado
- Água destilada

### **3.1.4 Materiais utilizados para Hidrodestilação**

- Éter dietílico grau (HPLC) êxodu científica®
- $Na_2SO_4$  da marca êxodu científica®
- Manta aquecedora
- Padrões de Alcanos
- Padrões de Alcanos Sigma Aldrich (C8-C40)

### **3.1.5 Sais adicionados sobre os meios de cultivo**

- Cloreto de cobalto ( $CoCl_2$ ) (98%)- Synth;
- Cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ) (98 %) - Synth;

## **3.2 Equipamentos**

### **3.2.1 Equipamentos utilizados para o cultivo do fungo preparo do meio de cultivo e Analise morfológica**

- Autoclave vertical - Phoenix A V 75 e Soc. FABBE 103;
- Balança analítica – Shimadzu®;
- Balança semi-analítica – Tecnal®;
- Capela de fluxo laminar – VECO VLFS-12M;
- Microscópio óptico

### **3.2.2 Cromatografo gasoso acoplado a espectrometro de massas**

- As análises foram realizadas em um Cromatógrafo gasoso GC-MS shimadzu QP2010 Plus.

### **3.2.3 Processamento de dados, análise estatística e formação de redes moleculares**

- Os espectros de massa obtidos pós análise via GC/MS foram submetidos a diversas etapas computacionais que incluem a construção de cromatogramas de íons extraídos, detecção de picos cromatográficos, desconvolução espectral e alinhamento, utilizando o MZmine 4.5.3.
- Os arquivos gerados no pré-processamento foram submetidos as plataformas a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).
- O software Cytoscape versão 3.10.3 foi utilizado para facilitar as observações geradas nas redes moleculares.
- As análises estatísticas foram obtidas na plataforma Metaboanalyst 6.0 .

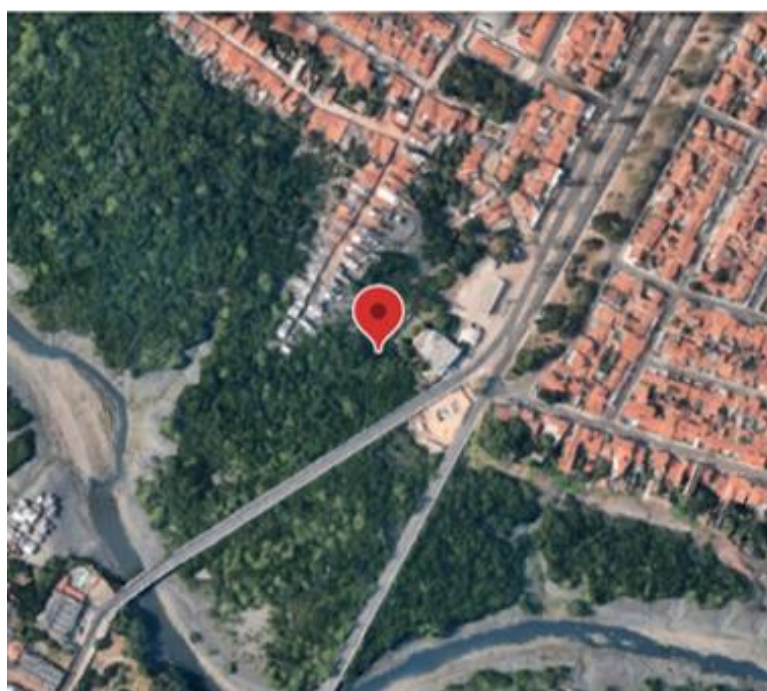
## **3.3 Metodologia**

### **3.3.1 Isolamento**

O fungo foi cedido em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Bioprospecção e Biotecnologia (LPBiotec). A cepa foi coletada do solo de manguezal localizado no bairro Ipase de Baixo, em São Luís do Maranhão,

Brasil (Localização global: 2°32'06"S 44°15'43"W) (FIGURA 3.1). A coleta foi realizada às 08:27 do dia 25/04/2022. Com o auxílio de um amostrador cilíndrico de PVC de 25 mm de diâmetro, a cepa foi coletada a uma profundidade de 0-10 cm do solo, sendo transferida para frascos estéreis. O isolamento dos fungos foi feito a partir de diluições seriadas até a diluição  $10^{-3}$ . Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi plaqueada em placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a 28°C por um período de 15 dias. As colônias em crescimento foram recultivadas em novas placas. Após o isolamento, os fungos foram preservados em água esterilizada.

FIGURA 3.1 - Localização do ponto de coleta do Fungo *P. citrinum*



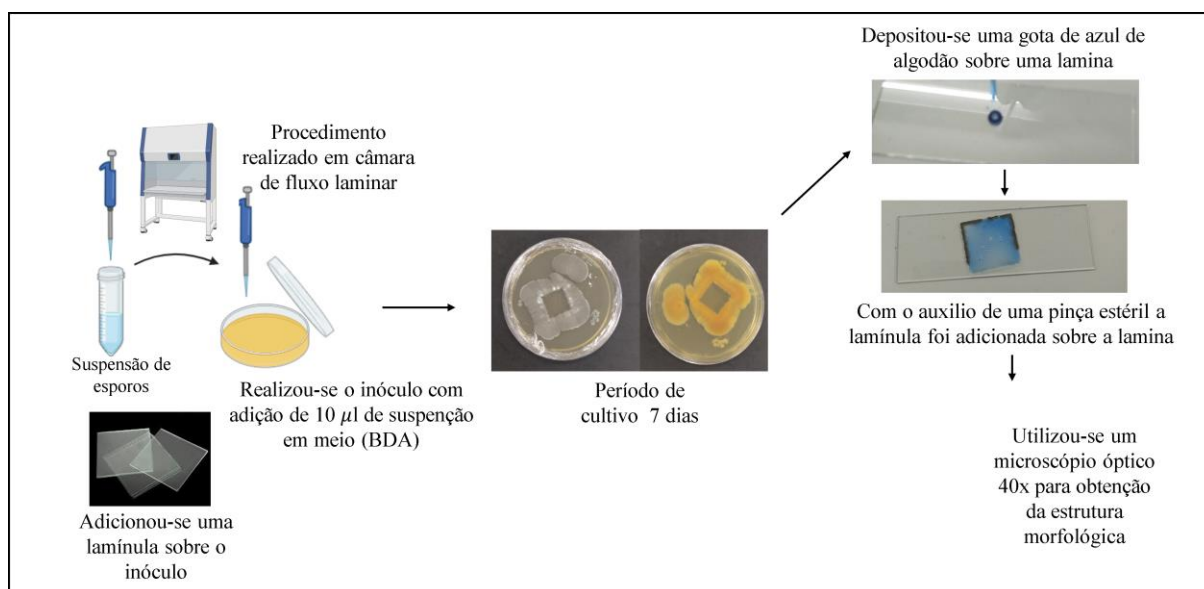
Fonte: Autoria própria (2025).

### 3.3.2 Análise morfológica do fungo

A micromorfologia da cepa foi obtida a partir da adaptação da técnica de microcultivo (Ridell, 1950). Primeiramente um volume de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos foi transferido para o meio de cultura contendo meio BDA. Após a inoculação, uma lamínula foi cuidadosamente colocada sobre a superfície do meio. O cultivo foi realizado em um período de 7 dias. Após o período de incubação, a

lâminula foi cuidadosamente retirada do meio de cultura e adicionada a uma lamina contendo azul de algodão e examinadas em um microscópio óptico de campo claro (FIGURA 3.2).

FIGURA 3.2 - Identificação micromorfológica de fungo filamentososo adaptada da técnica de microcultivo



Fonte: Adaptado de Riddell (1950).

### 3.3.3 Identificação molecular

A identificação molecular da linhagem foi realizada utilizando sequenciamento e análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene da beta-tubulina (*benA*). O DNA genômico das culturas foi purificado utilizando protocolo baseado na extração de DNA com fenol (Aamir *et al.*, 2015).

A amplificação das regiões *benA* das amostras foi realizada pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído. Os primers (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram Bt2a/Bt2b, complementares à região *benA*. O produto da amplificação foi purificado em coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador

automático ABI 3500XL Series (Applied Biosystems). Os primers utilizados para o sequenciamento foram Bt2a/Bt2b

As sequências obtidas com os diferentes primers foram montadas em uma sequência de consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank. Foram então selecionadas sequências de microrganismos relacionados ao microrganismo analisado para construção do dendrograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) inserido no software BioEdit 7.2.6 (Hall, 1999) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 11.0 (Tamura *et al.*, 2013).

A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendrograma a partir das distâncias genéticas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou; Nei, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 11.0.

### **3.3.4 Cultivo dos Controles**

Os cultivos foram realizados em triplicatas a partir da adição de 10 µL da solução de esporos de concentração  $10^{-5}$  conídios / mL, por um período de 14 dias em balões de fundo redondo de 2L. O meio líquido foi constituído de: glicose (30,0 g/L), extrato de levedura (20,0 g/L), NaNO<sub>3</sub> (3,0 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), KCl (0,5g/L) FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,01 g/L). O meio sólido foi constituído de 360 g de arroz parboilizado, o mesmo foi hidratado com 360 mL de água milli-Q. Todos os cultivos foram autoclavados durante 15 min a 120°C e 1atm.

### 3.3.5 Cultivos irradiados sob Luz UV-A

Os cultivos foram realizados somente em meio líquido, onde o controle foi obtido em total escuridão. Em câmaras contendo lâmpadas UV-A com a distância de 30 cm entre os cultivos e as lâmpadas, os meios foram submetidos em um período de 14 dias, diferentes doses de irradiação, fotoperíodo 12 horas na luz e 12 horas no escuro e sob exposição ininterrupta a luz Tabela 1.0.

TABELA 3.1 - Valores de doses de irradiação no qual foi submetido os cultivos

Distância luz/experimento	Dose (J/cm <sup>2</sup> ) fotoperíodo	Dose (J/cm <sup>2</sup> ) Contínua
30 cm	5271	10463,04

Fonte: Autoria própria (2025).

### 3.3.6 Avaliação das concentrações tóxicas dos cátions metálicos para o crescimento de fungos

Para a realização do estudo de triagem voltado à determinação das concentrações tóxicas dos cátions metálicos Mn<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup>, foram estabelecidas diferentes condições de cultivo, com base na modificação do meio padrão. O meio base utilizado foi o meio líquido Czapek, enriquecido com extrato de levedura, denominado M0, que foi utilizado como controle.

A partir do meio M0, foram preparados meios modificados contendo concentrações crescentes dos sais inorgânicos cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>) e cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>). As modificações resultaram nos meios designados como M1, M2, M3 e M4, conforme a Tabela 2.0. Todos os meios líquidos, foram preparados em 100 mL e distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em triplicata. A partir disso, todas as triplicatas foram esterilizadas em autoclave por 121°C e 1 atm, durante 15 minutos, o cultivo durou 14 dias, no fim desse período

foi feita uma filtração obtendo assim a massa micelial de cada cultivo onde foram posteriormente foram pesadas em balança analítica.

TABELA 3.2- Composição dos meios de cultivos em g/L utilizados no experimento de tolerância

Composição	M0	M1	M2	M3	M4
Glicose	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Extrato de levedura	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
NaNO <sub>3</sub>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,036mM)	0,01	-	-	-	-
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	4,95 (25,01mM)	9,9 (50,28mM)	19,8 (100,05mM)	24,74 (125,00mM)
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	1,19 (5,00mM)	2,38 (10,00mM)	3,57 (15,00mM)	-

Fonte: Autoria própria (2025).

### 3.3.7 Cultivo sob estresse com cátions metálicos

Em meio líquido, os cultivos ocorreram com a mesma concentração descrita em M<sub>0</sub> presente na tabela 2.0, porém com a substituição de Para os cultivos em meio líquido, a indução por metais consistiu na substituição do FeSO<sub>4</sub> por 19,8 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O e 2,38 g/L de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Já para os cultivos em meio sólido, a indução foi realizada pela adição de 7,13 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O e 0,86 g/L de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.

### 3.3.8 Hidrodestilação

A extração foi realizada com 3 mL de éter etílico no aparelho de Clevenger, durante um período de 2 horas. Ao final desse tempo, o hidrolato foi descartado e os compostos orgânicos voláteis foram coletados, sendo filtrados em um frasco contendo 1 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para remoção de resquícios de água. Por fim os compostos extraídos em éter foram transferidos para um vial e imediatamente analisados.

### 3.3.9 Análise por CG-EM

O perfil cromatográfico das amostras contendo os compostos voláteis obtidos foi realizado em um Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP2010 Plus (Toquio, Japão), empregando-se uma coluna Rtx-5 (10m, 0.1mm I.D.  $d_f=0.1\mu\text{m}$ ). A programação de aquecimento do forno será programada de  $40^\circ\text{C}$  (15 min)  $\rightarrow 21,4^\circ\text{C}/\text{minuto}$  até  $320^\circ\text{C}$  temperatura do injetor será de  $250^\circ\text{C}$  vazão volumétrica da fase móvel de 16.9 mL /min e a temperatura do detector será de  $250^\circ\text{C}$ , foi injetado  $2\mu\text{L}$  em cada análise. Os parâmetros de MS foram são descritos a seguir: temperatura da interface,  $250^\circ\text{C}$ ; temperatura da fonte de íons,  $200^\circ\text{C}$ ; modo EI, 70 eV; e intervalo de varredura, 50–650 amu. O tempo total de execução foi de cerca de 15 min.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **4.1 Identificação morfológica e molecular**

## 4.1 Identificação morfológica e molecular

### 4.1.1 Identificação macromorfológica

A análise macromorfológica demonstrou-se condizente com o que é visto sobre o gênero *Penicillium* (FIGURA 4.10). De acordo com Sciortino (2017) e Visagie *et al.* (2014) as colônias exibem crescimento acelerado, formando um revestimento contínuo sobre o meio de cultura, com morfologia semelhante a um tapete. Sua coloração predominante varia entre tonalidades de verde, azul-esverdeado, cinza-esverdeado e branco. A região inferior das colônias pode apresentar pigmentação amarelada, marrom-clara ou avermelhada. Quanto à textura, observam-se características distintas, podendo ser secas ou exibir superfície macia e aveludada.

FIGURA 4.10- Macromorfologia do fungo *P. citrinum* isolado de solo de mangueza

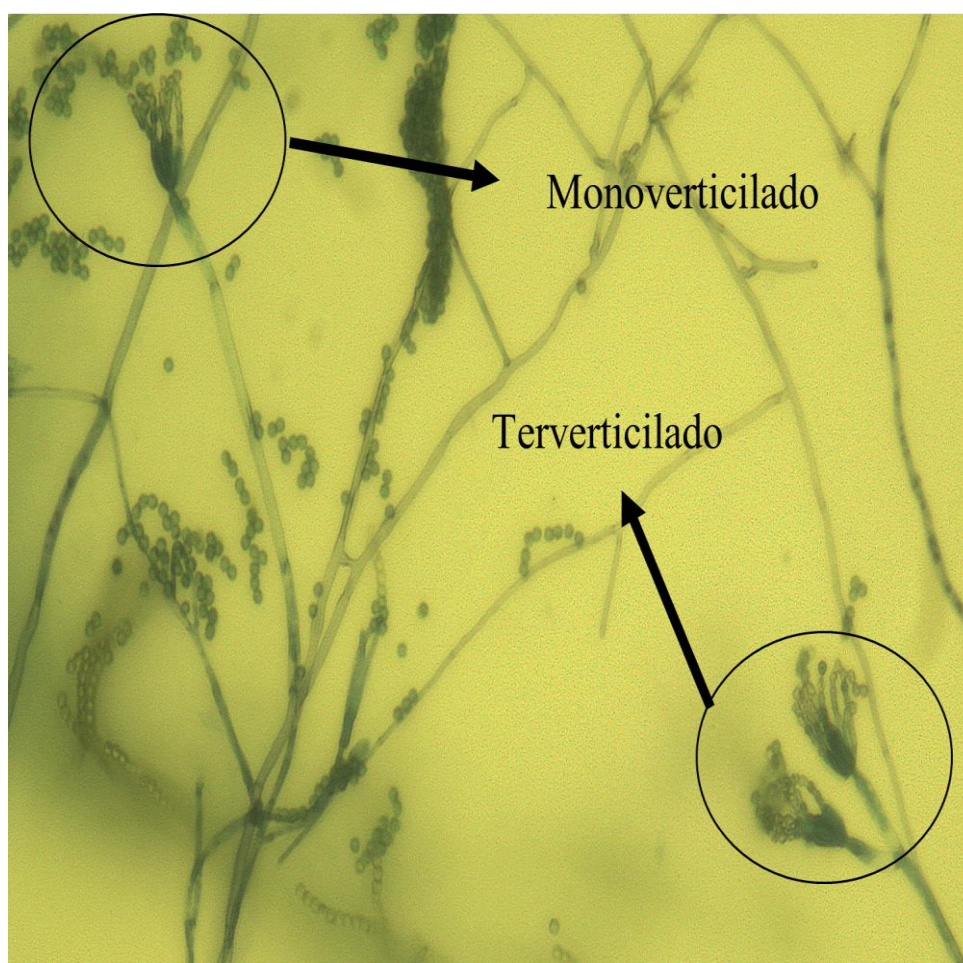


Fonte: Autoria própria (2025)

### 4.1.2 Identificação micromorfológica

A análise micromorfológica também apresentou duas estruturas muito comuns observadas em padrões de ramificação em fungos do gênero *Penicillium* descrita por Visagie *et al.* (2014) (FIGURA 4.11). Na estrutura monoverticilada os fiálides (as células que produzem os conídios, ou esporos) estão diretamente inseridos no conidióforo, sem ramificações intermediárias, já para a estrutura terverticilada, possuem outro nível de ramificação entre o estipe e as métulas, frequentemente apenas uma continuação do eixo do estipe e um ramo lateral.

FIGURA 4.11- Micromorfologia do fungo *P. citrinum* isolado de solo de manguezal

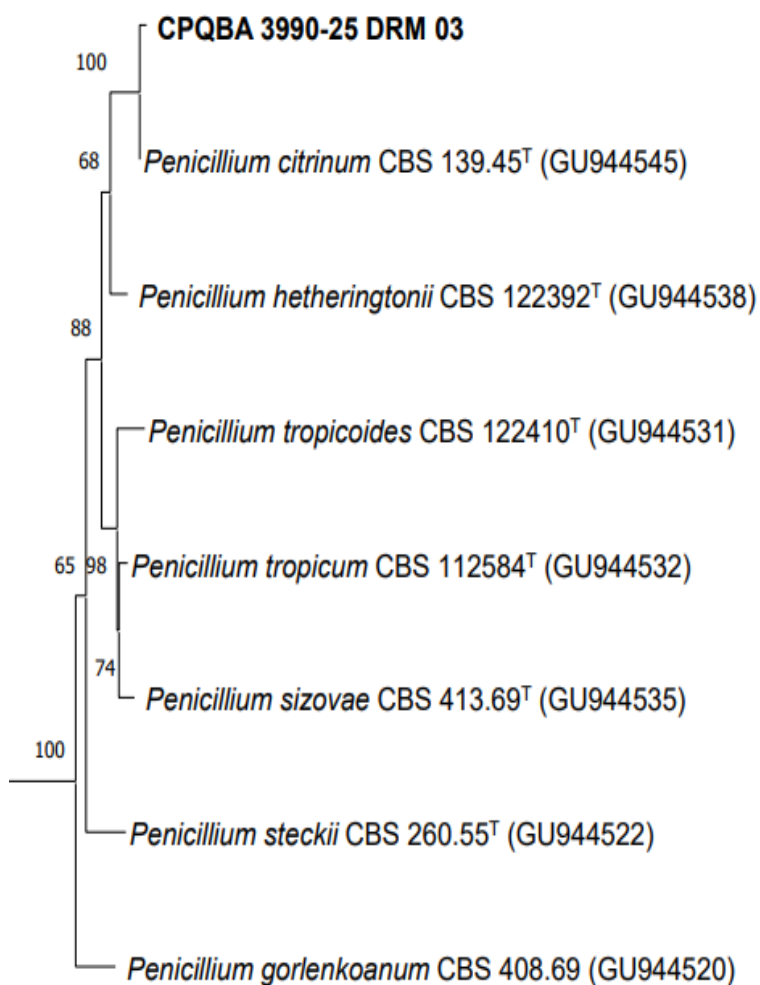


Fonte: Aatoria própria (2025)

### 4.1.3 Identificação molecular

Os fragmentos de *benA* foram amplificados e sequenciados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras. O dendrograma de distância genética construído a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank nomeada como CPQBA 3990-25 DRM 03 apresentou um agrupamento coeso e bem suportado (100%) com a linhagem *P. citrinum* CBS 139.45 (FIGURA 4.12). Assim, os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final da linhagem avaliada em nosso estudo como *Penicillium citrinum* Thom 1910.

FIGURA 4.12 – Análise de distância genética com base na região *benA*, mostrando a relação entre a linhagem *Penicillium* (CPQBA 3990-25 DRM 03) e outras linhagens relacionadas do GenBank.



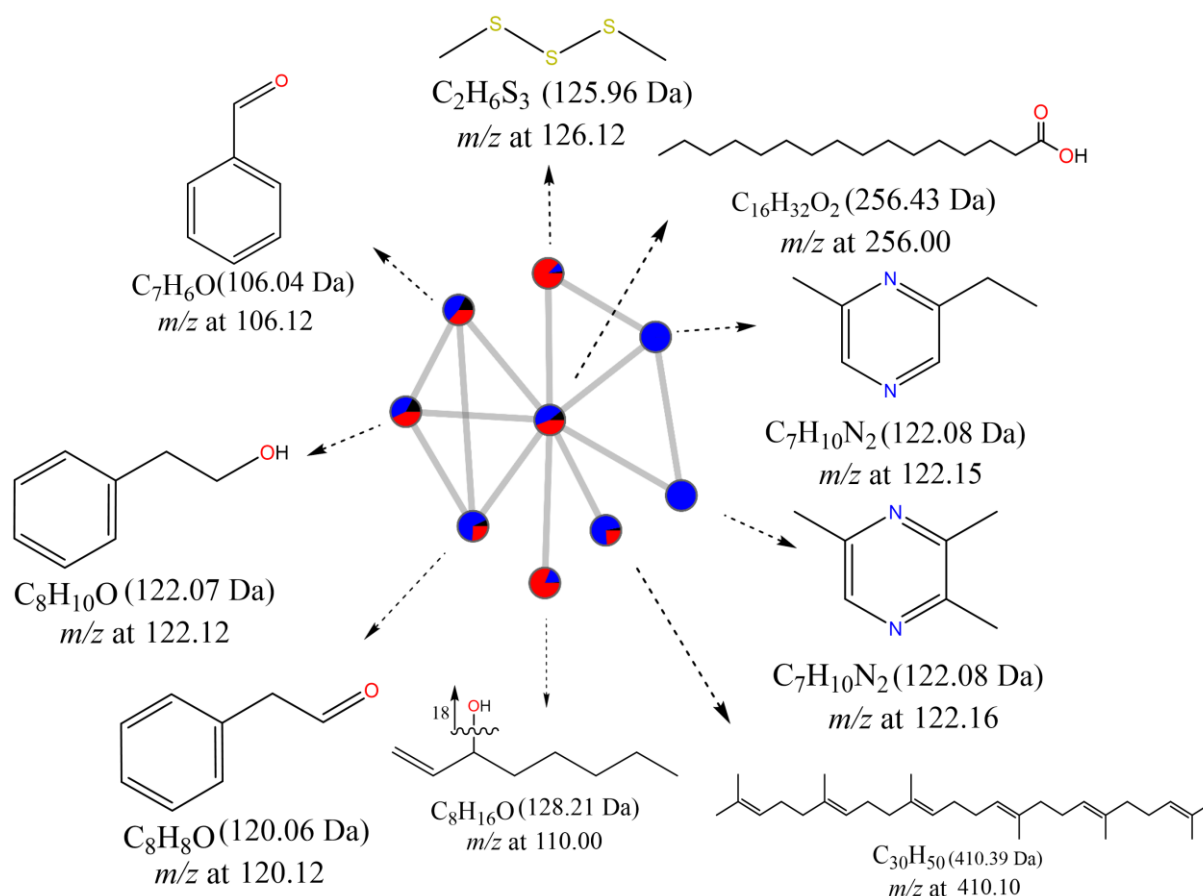
Fonte Autoria própria (2025)

## **4.2 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com luz UV-A no volatiloma de *P. citrinum***

## 4.2 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com luz UV-A no volatiloma de *P. citrinum*

A produção de COVs fúngicos está associada às reações metabólicas e oxidativas de microrganismos. Entre os metabolitos mais abundantes, foram identificados aldeídos, cetonas, ácidos e compostos contendo nitrogênio e enxofre. A rede molecular representada na (figura 4.20) demonstra uma serie de metabólitos advindo de diversas vias metabólicas.

FIGURA 4.20 – Rede molecular obtida dos cultivos controle (no escuro) e irradiados com luz UV-A.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando GNPS e Cytoscape

Na TABELA 4.1 podemos observar as anotações dos compostos com as bibliotecas internas e índice de retenção linear.

TABELA 4.1 – Anotações obtidas nos cultivos sob escuridão/Luz UV

Compostos identificados via NIST/WILEY	Tempo de retenção	Índice de retenção calculado	Índice de retenção tabelado
benzaldeído	2,923	945	945
trissulfeto de dimetila	2,985	953	953
1-octen-3-ol	3,10	970	970
2-etil-6-metilpirazina	3,233	989	986
2,3,5-trimetilpirazina	3,270	995	999
fenilacetaldeído	3,583	1020	1020
2-feniletanol	4,120	1118	1118
ácido hexadecanóico	8,957	1950	1951
esqualeno	12,26	2828	2835

Fonte: Autoria própria (2025)

#### 4.2.1 Análises estatísticas do volatiloma sob luz UV-A

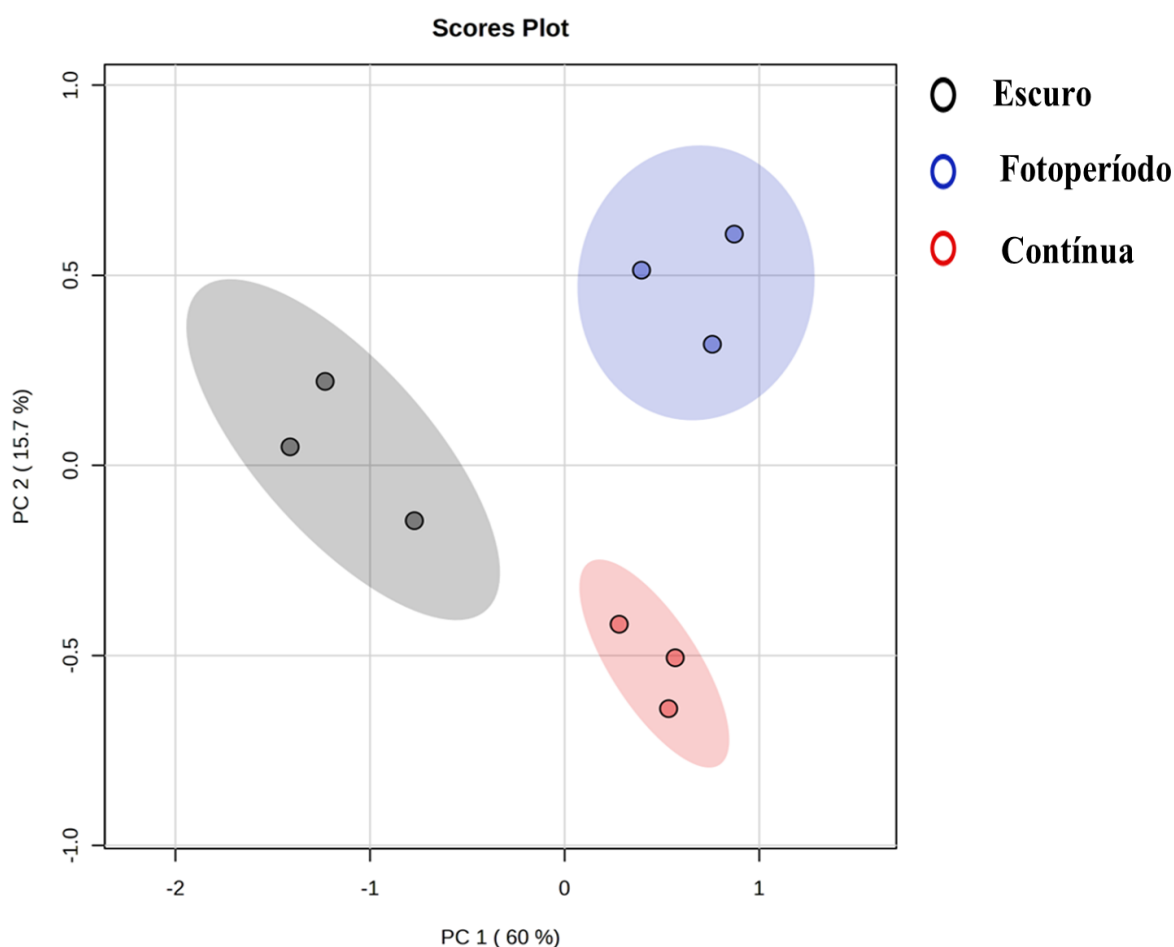
As análises multivariadas apresentaram uma boa distinção entre os grupos. No gráfico de análise de componentes principais (PCA) (FIGURA 4.21), as duas componentes principais (PC1 e PC2) foram capazes de explicar 75,1% das variâncias encontradas entre os grupos, além de apresentarem um distanciamento entre os mesmos, evidenciando efetivamente as diferentes interações que as doses de irradiação proporcionaram no cultivo do fungo.

A análise de agrupamento hierárquico (FIGURA 4.22), baseada nos perfis de compostos orgânicos voláteis, revelou diferenças marcantes entre as condições de iluminação testadas: escuro, luz UV-A em fotoperíodo e contínua. O dendrograma gerado demonstra que as amostras cultivadas no escuro formaram um grupo bem definido e isolado, sugerindo que a ausência de luz induz um perfil metabólico volátil significativamente distinto das condições com exposição à radiação UV-A.

As amostras sob luz UV-A contínua apresentaram alta similaridade entre si, formando um subgrupo coeso, indicando que a exposição constante à radiação UV-A promove uma resposta metabólica consistente. De forma

semelhante, as amostras cultivadas sob fotoperíodo UV-A também se agruparam entre si, embora com uma distância moderada em relação ao grupo de luz contínua. Isso indica que, apesar de ambas as condições envolverem a presença de UV-A, o regime de exposição (contínua vs intermitente) impacta de forma distinta na produção dos COVs de *P. citrinum*.

FIGURA 4.21 - PCA scores obtidos nos cultivos sobre escuridão (controle) e sob irradiação UV-A com variações de foto período e luz contínua

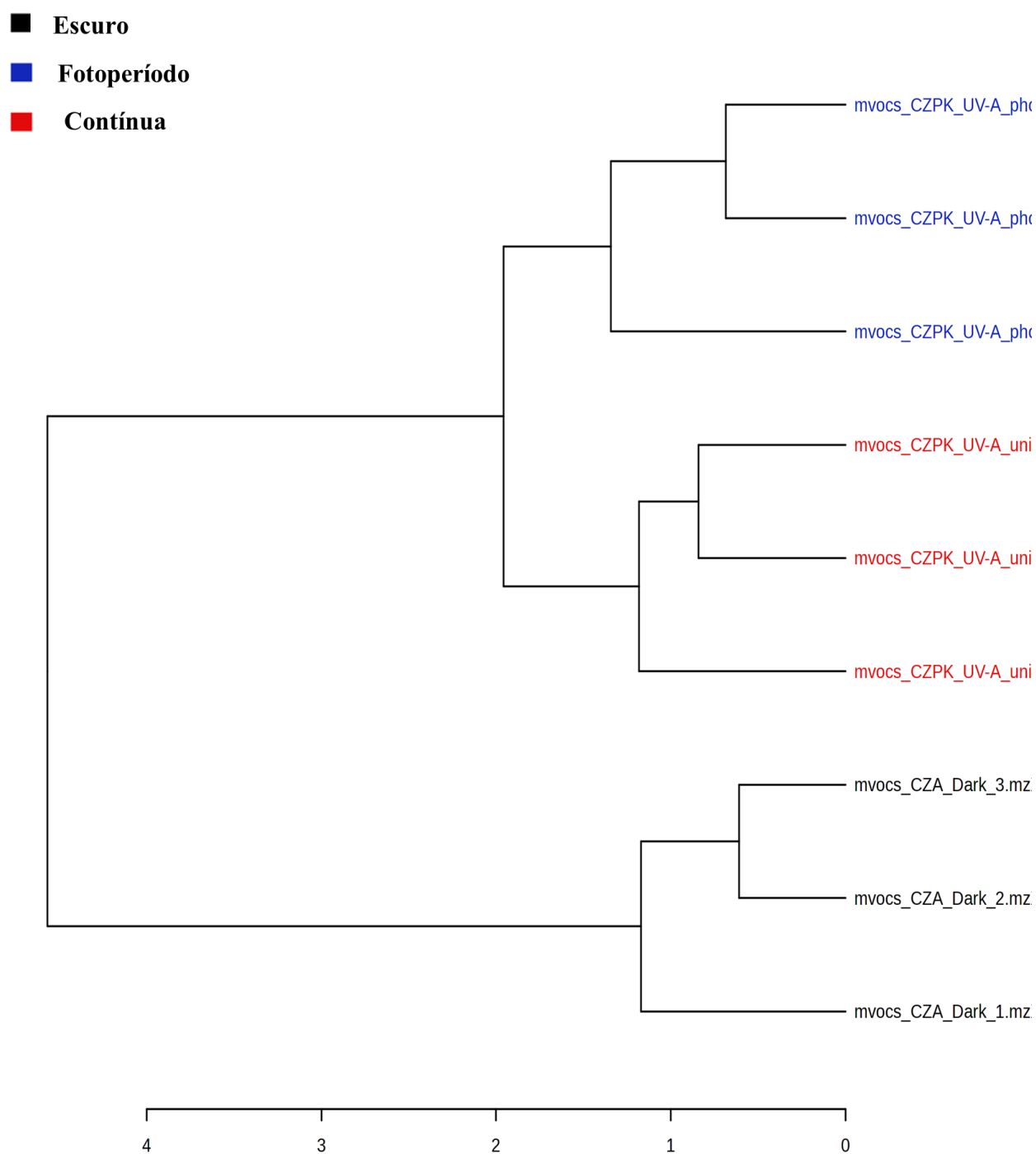


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

De forma geral, observa-se que tanto a luz contínua quanto o fotoperíodo alteram o metabolismo volátil em relação ao escuro, com maior proximidade entre si do que em relação ao grupo controle (escuro). Esses resultados podem ser melhor avaliados do ponto de vista das análises univariadas,

nas quais podemos observar as claras modificações entre os compostos que foram previamente avaliados na rede molecular.

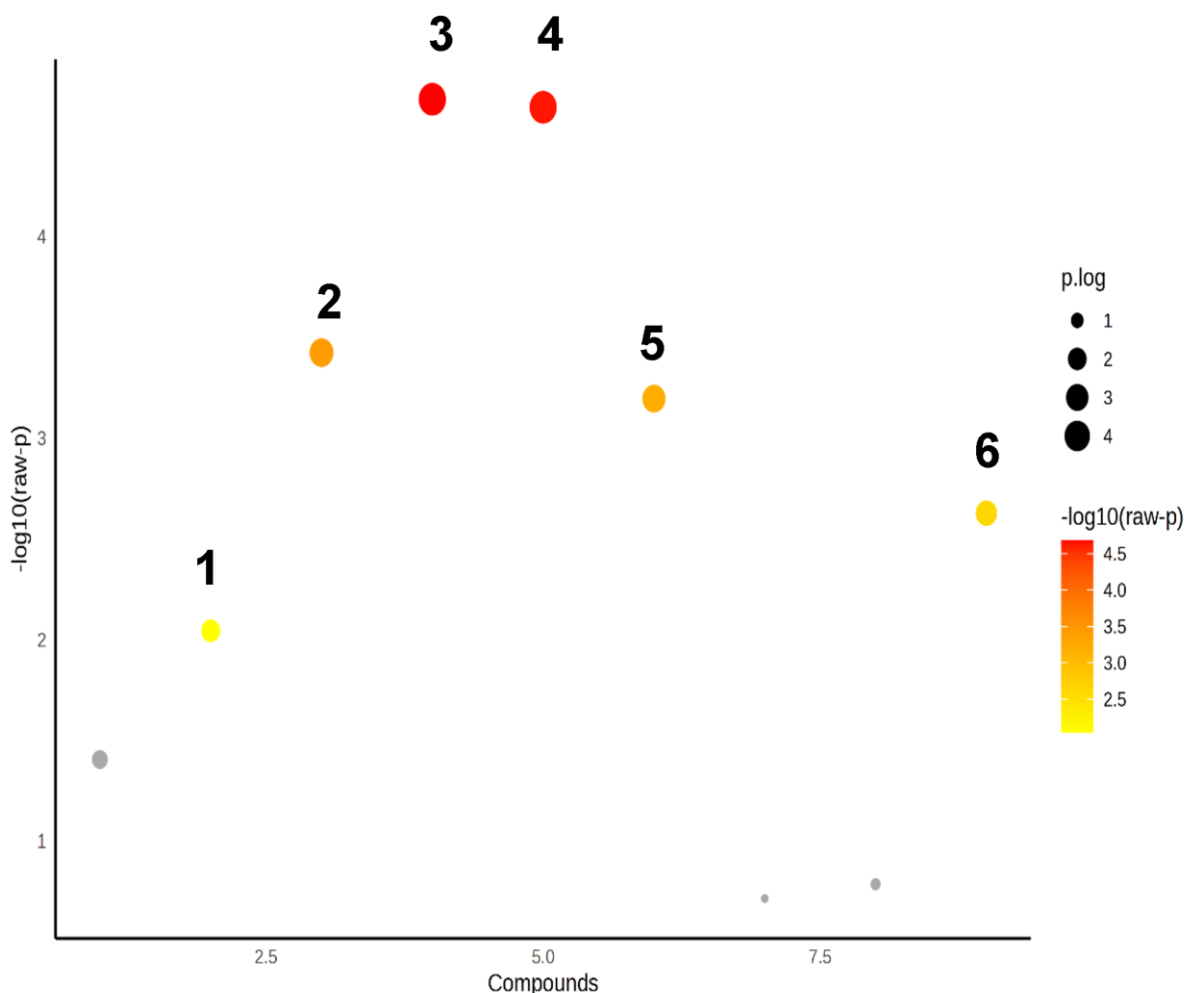
FIGURA 4.22 - Dendrograma obtido com os cultivos sobre escuridão (controle) e sob irradiação UV-A com variações de foto período e luz contínua



Fonte : Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

A análise univariada de variância (ANOVA) permitiu identificar seis metabólitos com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos cultivados sob luz UV-A ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 4.23).

FIGURA 4.23- Gráfico de análise de variância univariada



Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

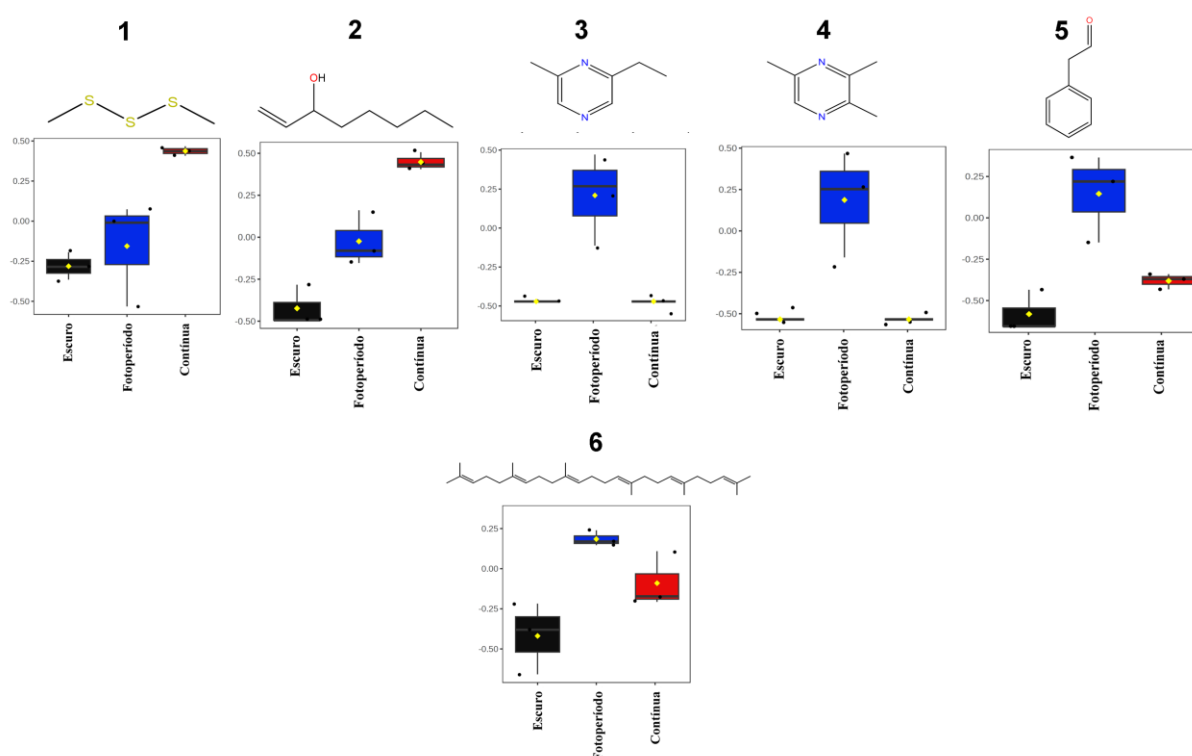
Dentre os compostos voláteis analisados, destacam-se o 1-octen-3-ol e o trissulfeto de dimetila, que apresentaram níveis significativamente elevados nas amostras cultivadas sob luz UV-A contínua. Isso sugere que essa condição estimula vias metabólicas específicas associadas à produção desses voláteis, possivelmente relacionadas a respostas oxidativas ou ao metabolismo de ácidos graxos e compostos sulfurosos.

Por outro lado, o esqualeno, o fenilacetaldeído e duas alquilpirazinas mostraram-se mais expressivos nos cultivos submetidos ao fotoperíodo UV-A

(alternância de luz e escuro). Esses resultados indicam que essa variação luminosa favorece rotas biossintéticas distintas, possivelmente associadas ao metabolismo secundário regulado por estresse moderado induzido pela variação de luz.

Esses resultados, representados na FIGURA 4.24, reforçam a importância da condição luminosa como fator regulador da produção de metabólitos voláteis e evidenciam o papel da luz como modulador ambiental na expressão de perfis químicos fúngicos.

FIGURA 4.24 – Gráficos de box plot das moléculas com produções impactadas pela irradiação



Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

O repertório completo de moléculas utilizadas por microrganismos para perceber e se adaptar aos seus ambientes bióticos e abióticos ainda não é totalmente conhecido. De acordo com Pohl e Kock (2014), entre as diversas classes de compostos sinalizadores, destacam-se as oxilipinas, lipídios bioativos derivados da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Essas moléculas desempenham papéis cruciais na sinalização celular, mediando

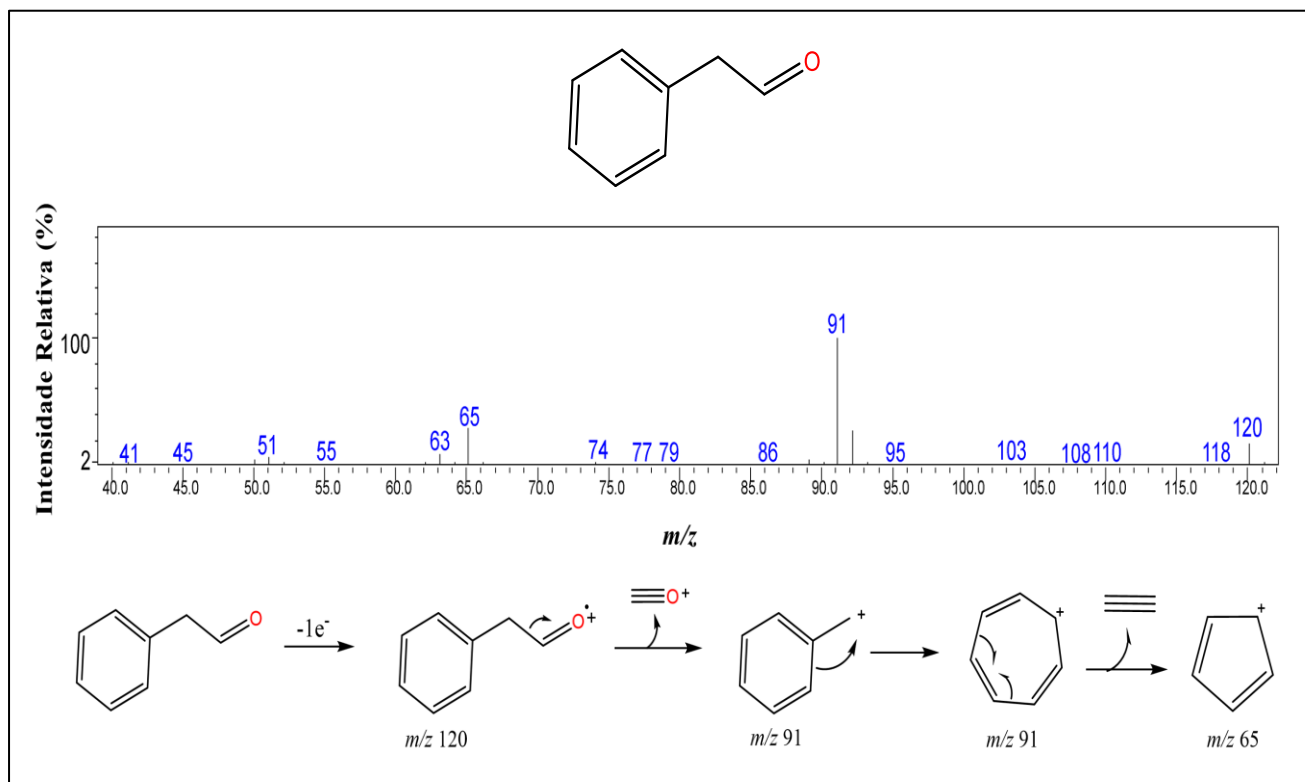
respostas a estresses ambientais e regulando processos fisiológicos essenciais, como defesa, desenvolvimento e reprodução.

Segundo Speckbacher *et al.* (2020), a enzima lipoxigenase desempenha um papel fundamental na resposta do fungo *Trichoderma atroviride* à luz, além de estar envolvida na conidiação e na biossíntese de metabólitos secundários, incluindo a oxilipina volátil 1-octen-3-ol. Em nosso experimento, observamos que o cultivo sob luz UV-A ininterrupta foi capaz de induzir uma maior produção do metabólito 1-octen-3-ol. A justificativa para tal resultado baseia-se na maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Niki *et al.*, 2005).

Outro metabólito que apresentou uma maior abundância com o cultivo em luz contínua foi o dissulfeto de trimetila. Compostos voláteis de enxofre (VSCs) são originados do metabolismo secundário de diversos microrganismos a partir do catabolismo da metionina, como descrito por Landau, Helinck e Bonnarme (2008). Sá *et al.* (2021) relataram que a exposição ao trissulfeto de dimetila agiu na diminuição do estresse oxidativo em *Rhizobium leguminosarum*, diminuindo a concentração de EROS. O mesmo estudo também relatou um aumento na produção de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx).

As moléculas 2-feniletanol, fenilacetaldeído e benzaldeído estão diretamente associadas à degradação do aminoácido fenilalanina, sendo formadas pelas vias do cinamato e de Ehrlich (Etschmann *et al.*, 2002). Dentre essas, apenas o fenilacetaldeído, representado na FIGURA 4.24, apresentou diferença estatisticamente significativa, com produção mais acentuada no grupo cultivado sob fotoperíodo. O fenilacetaldeído foi atribuído como um metabólito importante na atividade antioxidante sinérgica junto ao benzoato de benzila, salicilaldeído, benzoína e cinamato de benzila em fungos *Diaporthe sp.* (Tanapichatsakul *et al.*, 2017).

FIGURA 4.25- Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do fenilacetaldéido

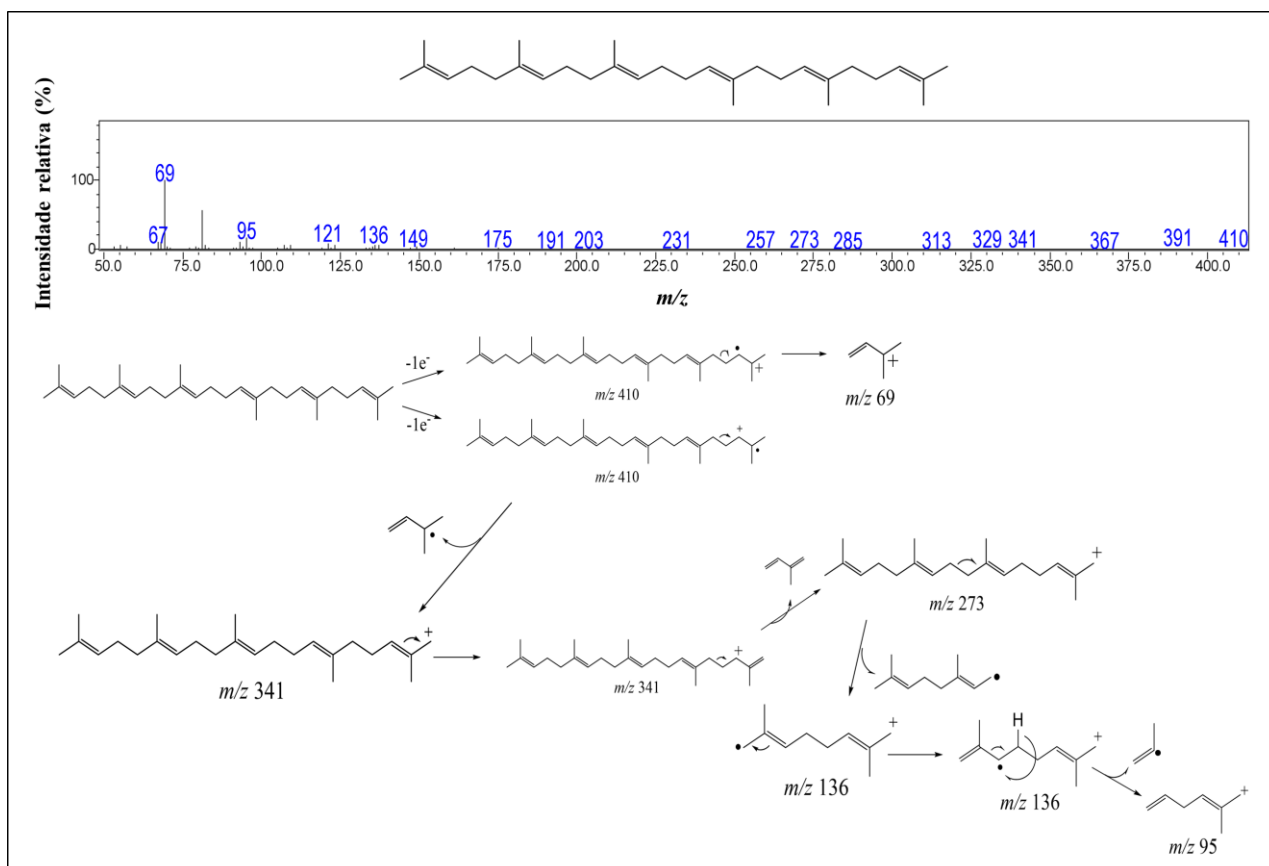


Fonte: Autoria própria (2025).

O esqualeno (FIGURA 4.25), que também foi um metabólito com valor de  $p$  significativo para os cultivos em fotoperíodo, possui várias aplicações biotecnológicas e alimentícias, como hidratante, antioxidante natural, suplemento alimentar, possui atividades antibacterianas e antivirulência, sendo utilizado também como adjuvante em vacinas contra gripe sazonal e COVID-19.

Foi possível observar também o surgimento de duas moléculas derivadas de pirazinas. Tais compostos são comumente relacionados a bactérias como *Bacillus subtilis*, tendo como precursor a L-treonina (Kłosowski *et al.*, 2021). Compostos pirazínicos possuem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antibacterianas, antiparasitárias e antioxidantes. Essa última característica pode ser um fator crucial para o surgimento dessa classe de compostos no meio de cultivo, como resposta do microrganismo ao estresse oxidativo.

FIGURA 4.26- Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do esqualeno



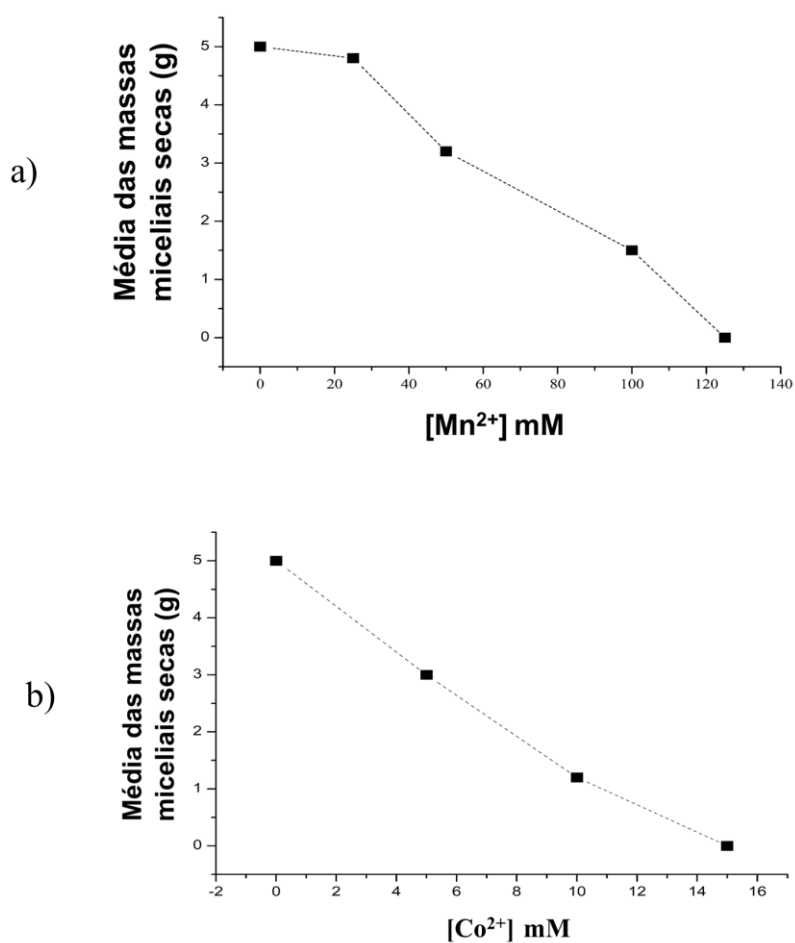
Fonte: A autoria própria (2025).

**4.3 Avaliação do impacto gerado pela indução abiótica com os cátions  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$   
de *P. citrinum***

### 4.3.1 Tolerância do fungo a diferentes concentrações de cátions metálicos

Com o objetivo de avaliar o impacto das concentrações máximas de  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  sobre o perfil volátil da cepa de *P. citrinum*, foram realizados ensaios iniciais em triplicatas utilizando diferentes concentrações dos íons em meio líquido. Optou-se por realizar tais experimentos nessas condições pela facilidade de quantificação das massas miceliais fúngicas (FIGURA 4.30 a e b). As concentrações máximas obtidas com algum crescimento micelial foram de 100 mmol/L para  $Mn^{2+}$  e 10 mmol/L para  $Co^{2+}$ , tais concentrações máximas foram padronizadas para os experimentos em meio sólido.

FIGURA 4.30- Teste de tolerância relacionando a media das massas miceliais secas e as concentrações dos cátions avaliadas. a) teste com  $Mn^{2+}$ . b) teste com  $Co^{2+}$ .

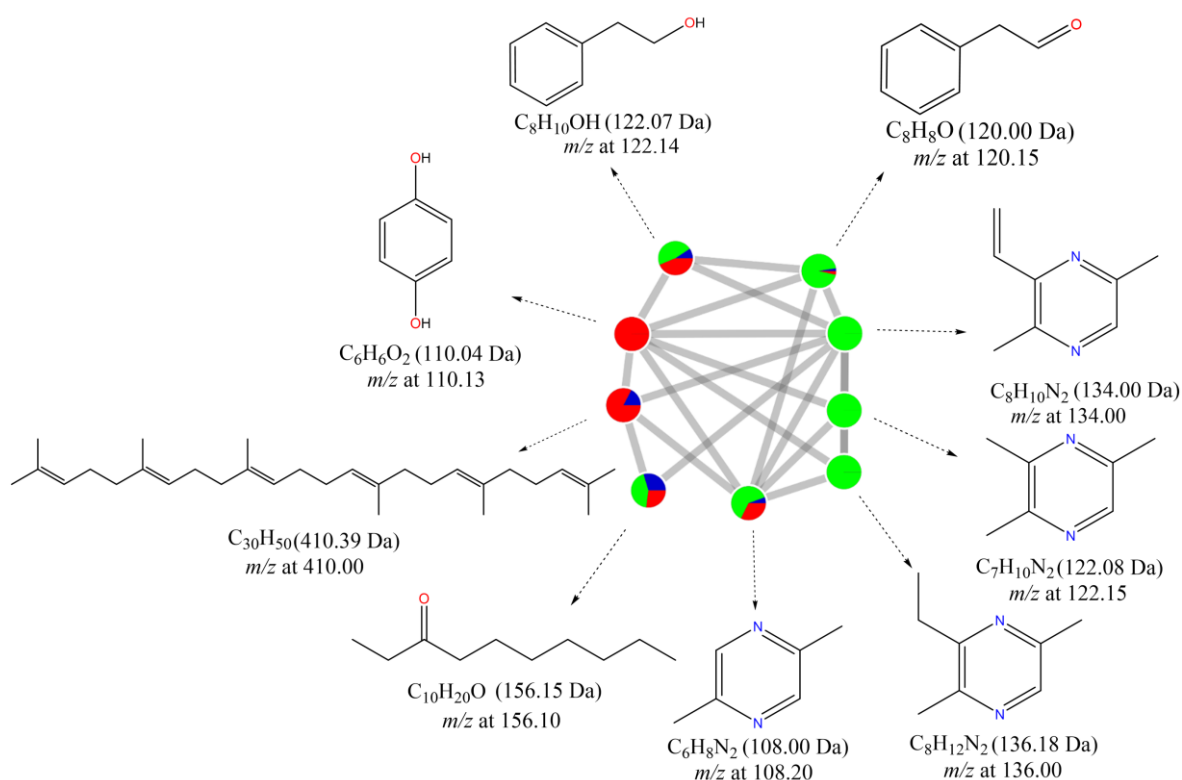


Fonte: Autoria própria (2025).

### 4.3.2 Avaliação do impacto gerado no volatilioma pela indução abiótica com cátions $Mn^{2+}$ e $Co^{2+}$ no volatilioma de *P. citrinum* em meio líquido

A rede molecular apresentada na Figura 4.31 mostra os resultados em meio líquido. A rede apresentou 9 nós, sendo todos agrupados em um único cluster. O gráfico de pizza demonstrou uma clara influência do íon  $Co^{2+}$  sobre os constituintes do volatilioma, principalmente pelo grupo de compostos alquilpirazínicos. Com exceção da 2,5-dimetilpirazina, todos os metabólitos dessa classe foram encontrados somente no grupo contendo tal íon. O íon  $Mn^{2+}$  elevou a concentração de esqualeno e também foi o único a apresentar o metabólito 1,4-di-hidroxibenzeno.

FIGURA 4.31 – Rede molecular dos cultivos em meio líquido com adição de cátions metálicos. A cor azul nos nós indica abundância relativa das moléculas nos grupos controle (Czapek sem modificações), a vermelha no experimento com adição de  $Mn^{2+}$  e a verde com adição de  $Co^{2+}$

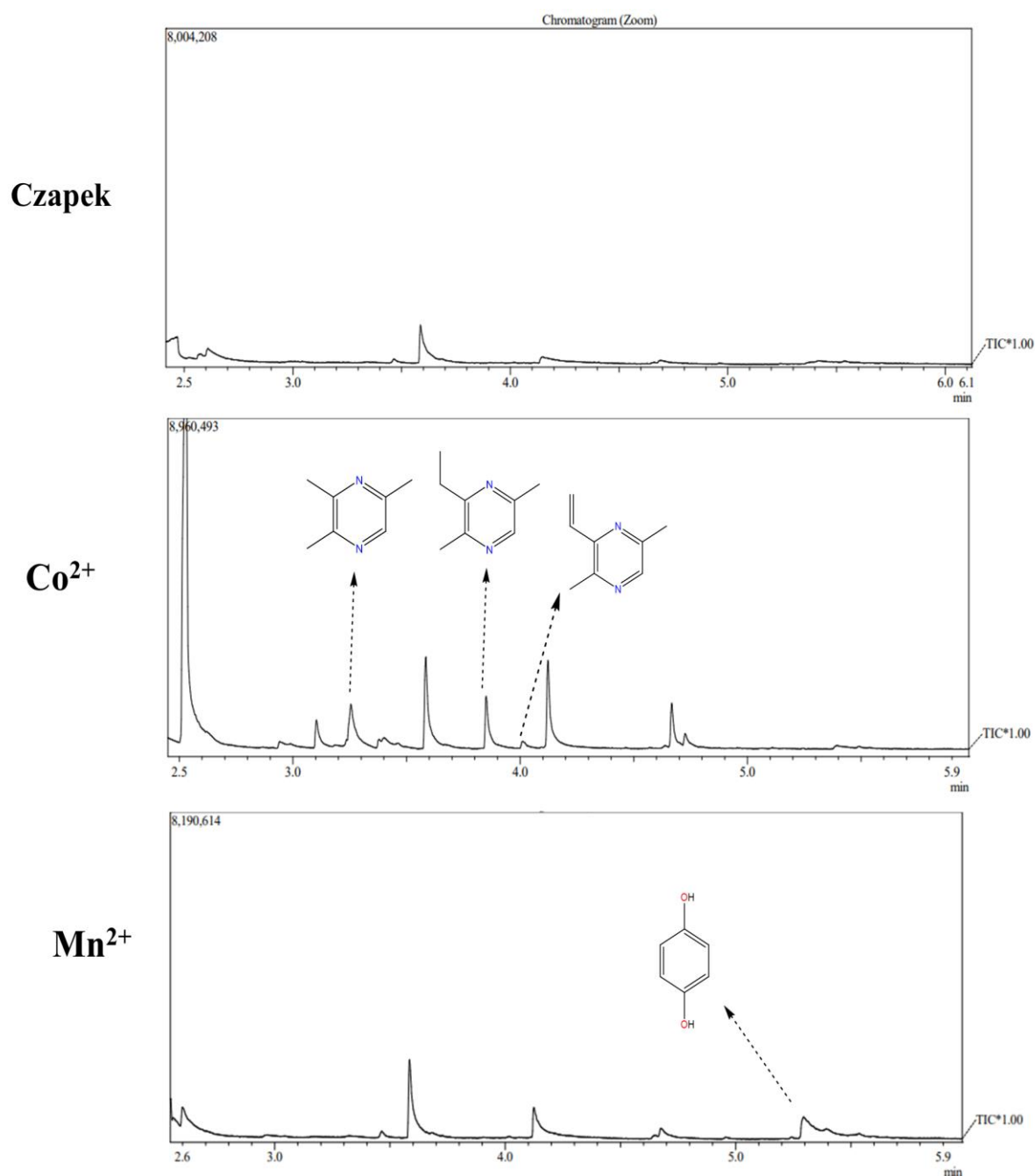


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando GNPS e Cytoscape

As observações foram corroboradas pela análise dos cromatogramas

obtidos nas análises, nos quais foi possível identificar variações nas intensidades dos picos e o surgimento de novos, indicando alterações qualitativas e quantitativas nos constituintes analisados.

FIGURA 4.32 - Cromatogramas de íons totais, demonstrando sinais de compostos encontrados nos cultivos adicionados com cátions metálicos e o controle.



Fonte: Autoria própria (2025).

Abaixo podemos observar na tabela 4.0 as identificações dos compostos com as bibliotecas internas e índice de retenção linear.

TABELA 4.2 – Anotações obtidas nos cultivos em meio líquido no experimento com adição de cátions

Compostos identificados via NIST/WILEY	Tempo de retenção	Índice de retenção calculado	Índice de retenção tabelado
2,5-dimetilpirazina	2,54	881	881
2,3,5-trimetilpirazina	3,27	995	999
fenilacetaldéido	3,58	1020	1020
3-etil-2,5-dimetilpirazina	3,85	1050	1060
3-etenil-2,5-dimetilpirazina	4,00	1070	1078
2-feniletanol	4,12	1118	1118
3- decanona	4,62	1190	1195
1,4-benzenodiol	5,10	1330	1327
esqualeno	12,26	2828	2835

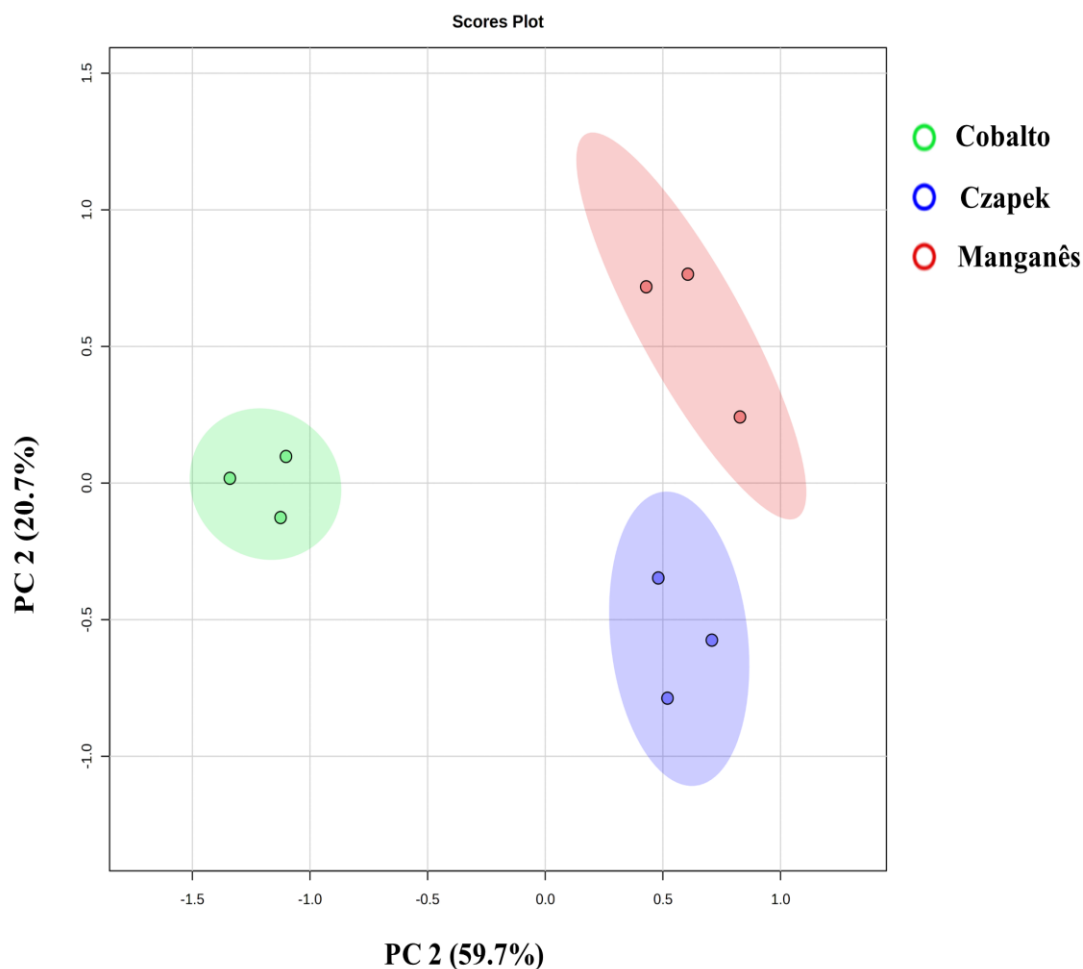
Fonte: Autoria própria (2025).

A análise de componentes principais (PCA) realizada para o experimento em meio líquido revelou que o PC1 explicou 59,7% da variabilidade, enquanto o PC2 contribuiu com 20,7%, conforme ilustrado no gráfico de scores (FIGURA 4.33). Nele, é possível observar uma clara separação entre os grupos analisados.

O biplot (FIGURA 4.34) revelou que os compostos voláteis associados ao tratamento com Cobalto apresentaram forte projeção negativa em PC1, destacando-se as pirazinas 2,5-dimetilpirazina, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 3-vinil-2,5-dimetilpirazina e 2,3,5-trimetilpirazina. Com exceção da 2,5-dimetilpirazina, os demais metabólitos da classe foram encontrados

exclusivamente nas amostras tratadas com Cobalto, indicando uma resposta metabólica característica à presença desse metal.

FIGURA 4.33 – Gráfico de análise de componentes principais (scores).



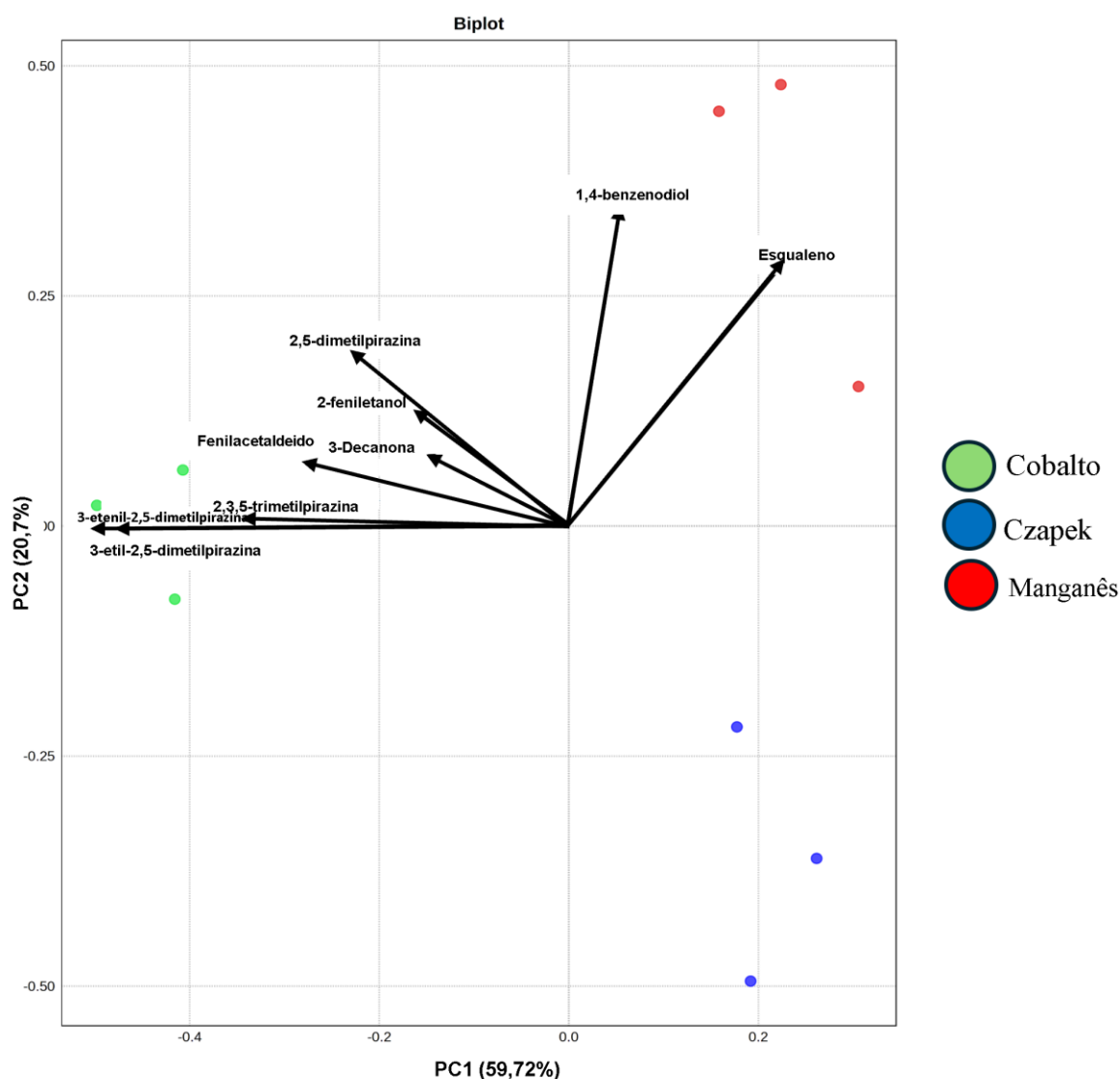
Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

Por outro lado, as amostras tratadas com Manganês foram fortemente associadas aos compostos esqualeno e 1,4-benzenodiol, que apresentaram projeção positiva em PC1 e PC2. Esses compostos, de natureza antioxidante, sugerem o envolvimento de mecanismos de resposta ao estresse, possivelmente relacionados à proteção contra espécies reativas de oxigênio. Compostos como 2-feniletanol e 3-decanona apresentaram distribuição intermediária entre os grupos, estando mais associados ao grupo com Cobalto.

A análise de agrupamento hierárquico, representada pelo

dendrograma (FIGURA 4.35), revelou uma clara separação entre os perfis de COVs emitidos pelo fungo nas diferentes condições avaliadas, de maneira semelhante ao que já foi observado nos gráficos de PCA. Essa diferenciação reflete uma alteração no metabolismo secundário do microrganismo em resposta à presença dos íons metálicos.

FIGURA 4.34 – Gráfico de análise de componentes principais (biplot)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

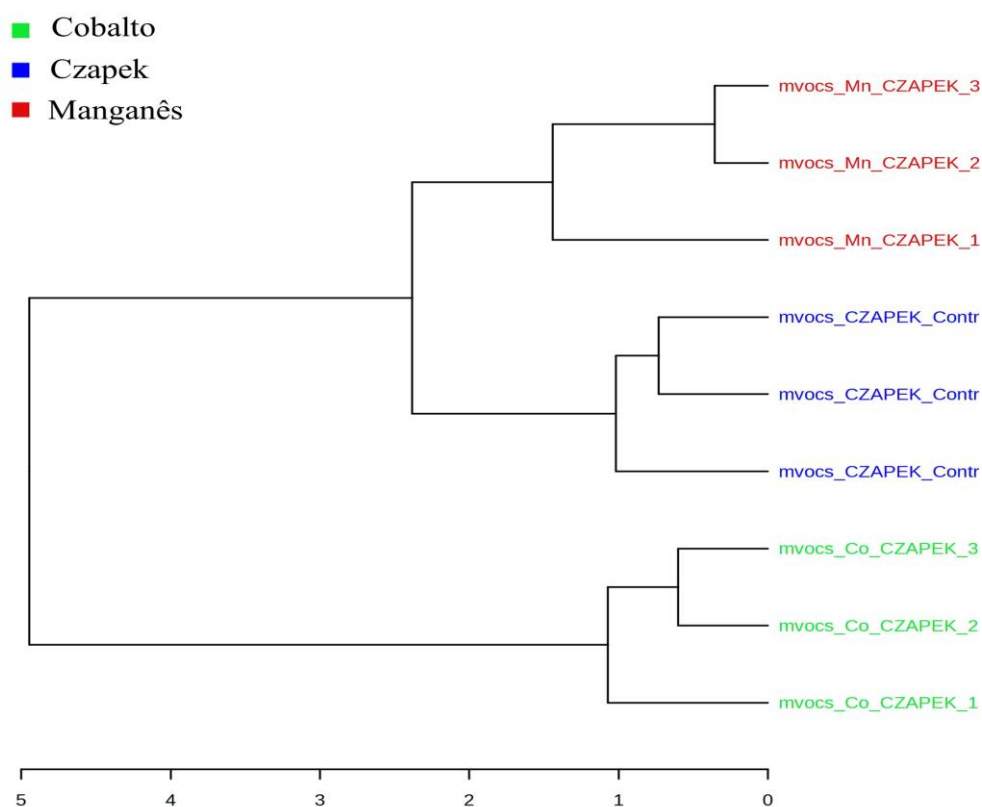
Observou-se que as amostras cultivadas no meio suplementado com manganês formaram um cluster bem definido, com todas as réplicas agrupadas de forma coesa, o que indica uma alta similaridade entre os perfis voláteis sob essa

condição. Isso sugere que o manganês induziu um conjunto específico de vias metabólicas, promovendo a produção de um perfil volátil distinto e reprodutível.

Da mesma forma, as amostras do tratamento com cobalto também se agruparam entre si, formando um segundo grupo claramente separado. Isso evidencia que o cobalto também alterou significativamente a composição dos COVs, porém de forma diferente do manganês. Por outro lado, o grupo controle (Czapek) constituiu um terceiro cluster separado, indicando que o fungo mantém um perfil volátil característico.

A separação entre os clusters demonstrou que o tipo de metal presente no meio exerceu uma influência determinante sobre o metabolismo volátil do fungo. Além disso, a baixa distância entre as réplicas dentro de cada grupo reforça a reprodutibilidade experimental e a robustez dos dados obtidos.

FIGURA 4.35 - Dendrograma de clusterização hierárquica representando os grupos cultivados em meio líquido

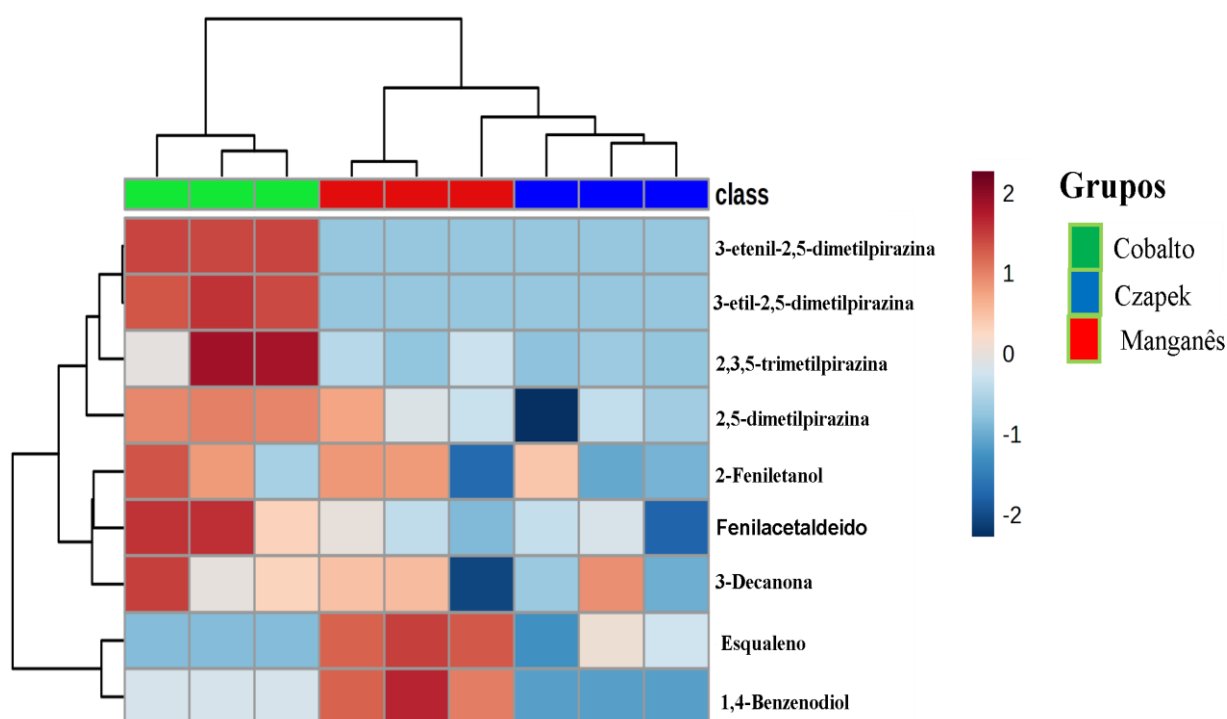


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

O heatmap gerado (FIGURA 4.36), com base na normalização dos dados (z-score), evidencia variações significativas nos perfis químicos associados à exposição aos metais. Compostos como 2,3,5-trimetilpirazina, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina e 2-fenilacetaldeído apresentaram maior expressão no grupo cobalto, indicando um aumento na produção desses metabólitos voláteis em resposta à exposição a esse metal. Por outro lado, substâncias como esqualeno e 1,4-benzenodiol mostraram maior abundância no cultivo com manganês, com redução notável nos grupos expostos ao cobalto e, principalmente, ao manganês.

Esses resultados reforçam as observações feitas nas redes moleculares e no gráfico de PCA biplot, sugerindo que a exposição a altas concentrações de diferentes cátions metálicos pode afetar de maneira significativa o perfil volátil dos organismos avaliados, refletindo possíveis mecanismos distintos de toxicidade e resposta adaptativa.

FIGURA 4.36 - Mapa de calor representando as intensidades dos COVs entre os grupos avaliados em meio líquido.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

TABELA 4.3 – Anotações das moléculas encontradas nos experimentos em meio sólido

Compostos identificados via NIST/WILEY	Tempo de retenção	Índice de retenção calculado	Índice de retenção tabelado
1-octen-3-ol	3,10	973	973
fenilacetaldeído	3,62	1023	1022
4-etilanol	4,11	1100	1110
2-feniletanol	4,14	1118	1118
4-etilfenol	4,50	1135	1136
acetato de fenetila	5,10	1231	1229
4-etilguaiaicol	5,30	1246	1250
4- vinilguaiaicol	5,49	1271	1272
4-etil-1,2-dimetoxibenzeno	5,54	1310	1319
4-etenil-1,2-dimetoxibenzeno	5,81	1366	1367
$\beta$ -cariofileno	6,38	1434	1435
germacreno D	6,67	1460	1460
nerolidol	6,95	1494	1501
4-(3-metil-2-butenil)-1H-indol	7,23	1609	-
2-pentadecanona	7,67	1673	1679
farnesol	7,97	1682	1690
ácido tetradecanóico	8,10	1794	1784
ácido hexadecanóico	9,045	1994	1995
ácido 9,12 octadecadienóico	9,80	2100	2104
esqualeno	12,26	2828	2835

Fonte: Autoria própria (2025)

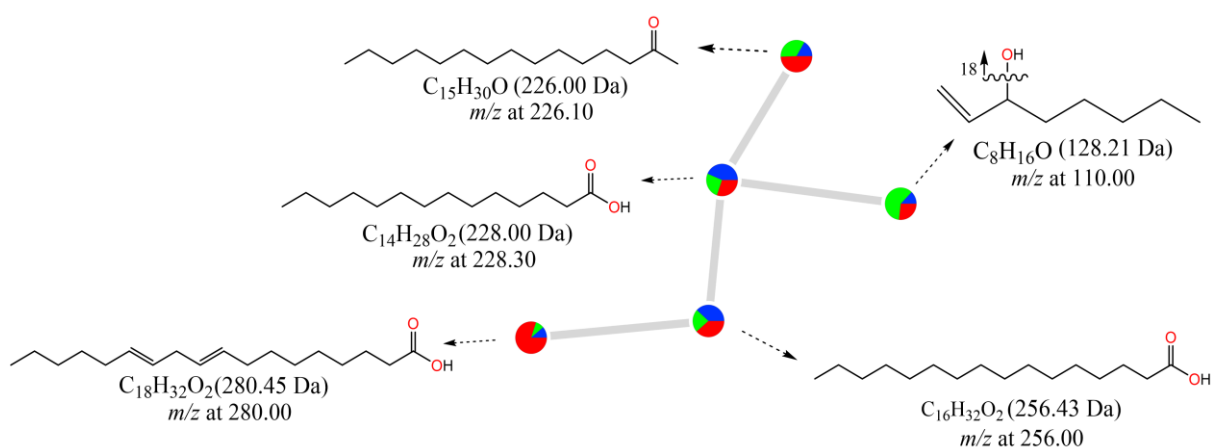
O volatiloma obtido a partir do cultivo em meio sólido também foi fortemente influenciado pela presença de cátions. A rede molecular formada contou com 20 nós. Devido à ampla diversidade metabólica presente nessa rede, ela foi subdividida em três subclusters para melhor compreensão. O primeiro subcluster é exibido na FIGURA 4.37, onde são identificadas algumas classes

metabólicas (álcoois, ácidos graxos e cetonas). Os compostos identificados em meio sólido podem ser vistos na TABELA 4.3.

Um aspecto relevante observado foi a interação entre os diferentes íons utilizados nos experimentos e a formação da oxilipina 1-octen-3-ol. Nesse agrupamento, foi notado que o ácido 9,12-octadecadienóico, precursor da oxilipina, teve sua produção aumentada nos cultivos com  $Mn^{2+}$ , o que levou à inibição da formação de 1-octen-3-ol.

Em contrapartida, nos cultivos suplementados com  $Co^{2+}$ , observou-se um comportamento metabólico inverso ao identificado em outras condições: a produção do composto volátil 1-octen-3-ol foi significativamente intensificada. A elevação na produção de 1-octen-3-ol reforça a hipótese de que o  $Co^{2+}$  atua como um modulador seletivo do metabolismo secundário microbiano, potencialmente ativando genes relacionados à síntese de oxilipinas.

FIGURA 4.37- Cluster evidenciando a classe de metabolitos advindas do caminho do acetato e derivados.



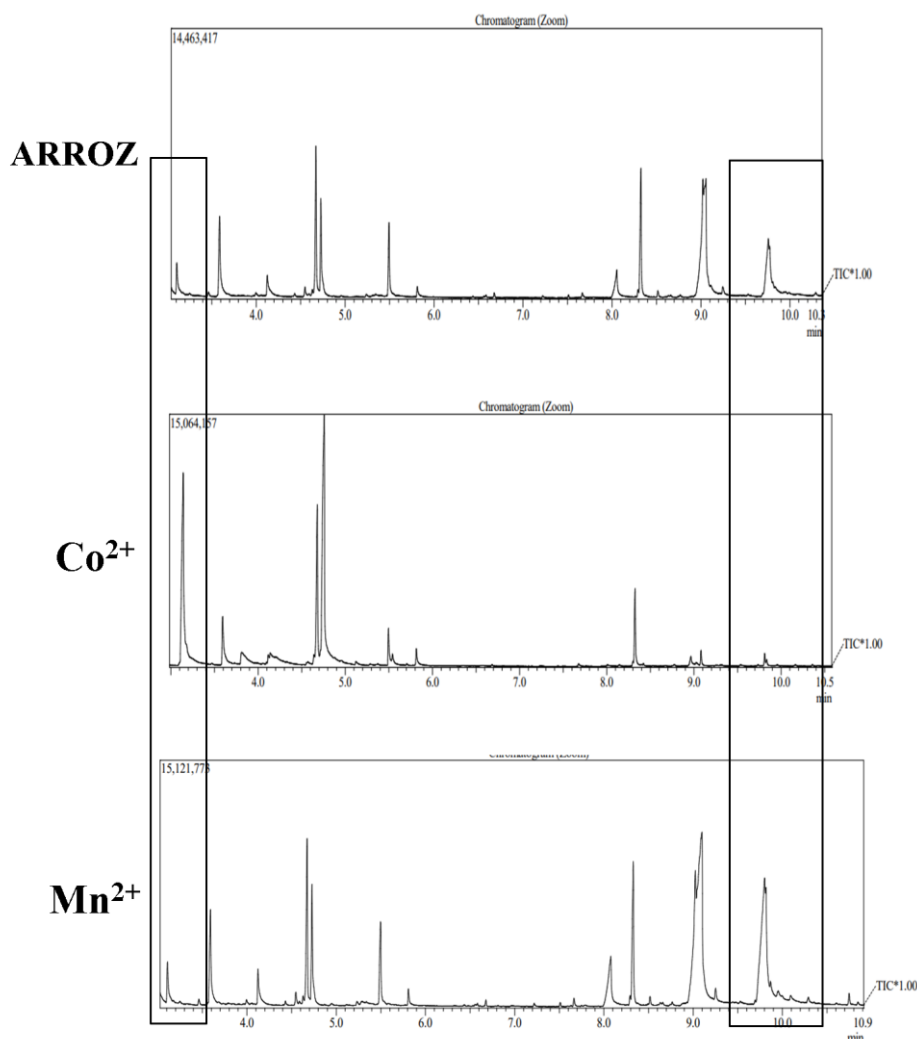
Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando GNPS e Cytoscape

Essa observação é corroborada pelos cromatogramas apresentados na FIGURA 4.38, os cromatogramas evidenciam (áreas) significativamente mais intensas de 1-octen-3-ol nos cultivos tratados com  $Co^{2+}$ , indicando um aumento na produção desse composto volátil em resposta à presença do cátion. Paralelamente, nota-se uma redução visível nos sinais correspondentes ao

precursor metabólico do 1-octen-3-ol, sugerindo que sua conversão é favorecida nessas condições.

Em contraste, nos cultivos suplementados com  $Mn^{2+}$ , observa-se o comportamento inverso: os sinais do precursor são mais pronunciados, enquanto os picos de 1-octen-3-ol são menos intensos, o que sugere uma inibição parcial ou redirecionamento da via metabólica envolvida. Esses padrões reforçam a influência específica dos cátions metálicos sobre o perfil metabólico da linhagem analisada.

FIGURA 4.38- Cromatogramas obtidos nos diferentes cultivos em meio sólido evidenciando a diferença entre ácido 9,12 octadecanóico e 1-octen-3-ol.

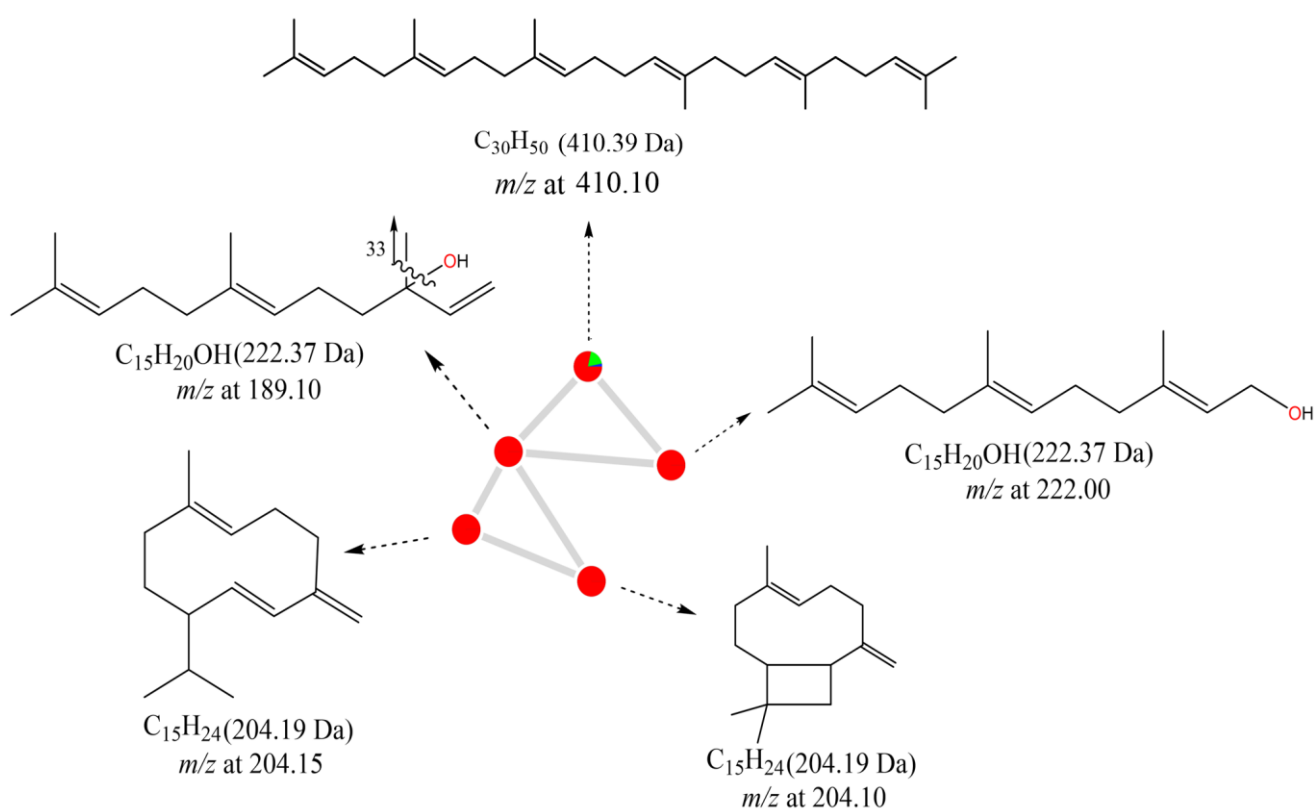


Fonte: Autoria própria (2025)

O cluster representado na (FIGURA 4.39), apresenta uma elevada expressão da via dos terpenoides, dentre esses, os sesquiterpenos foram os principais constituintes. As sesquiterpeno sintases normalmente requerem um íon metálico divalente como cofator, sendo  $Mg^{2+}$  o mais utilizado.

Em nosso estudo observamos que o íon  $Mn^{2+}$  também foi capaz de agir como um cofator eficiente auxiliando nessa via metabólica. O íon  $Co^{2+}$  acabou impactando bem menos agindo somente na produção de esqualeno.

FIGURA 4.39 - Cluster de terpenóides obtido em meio sólido.

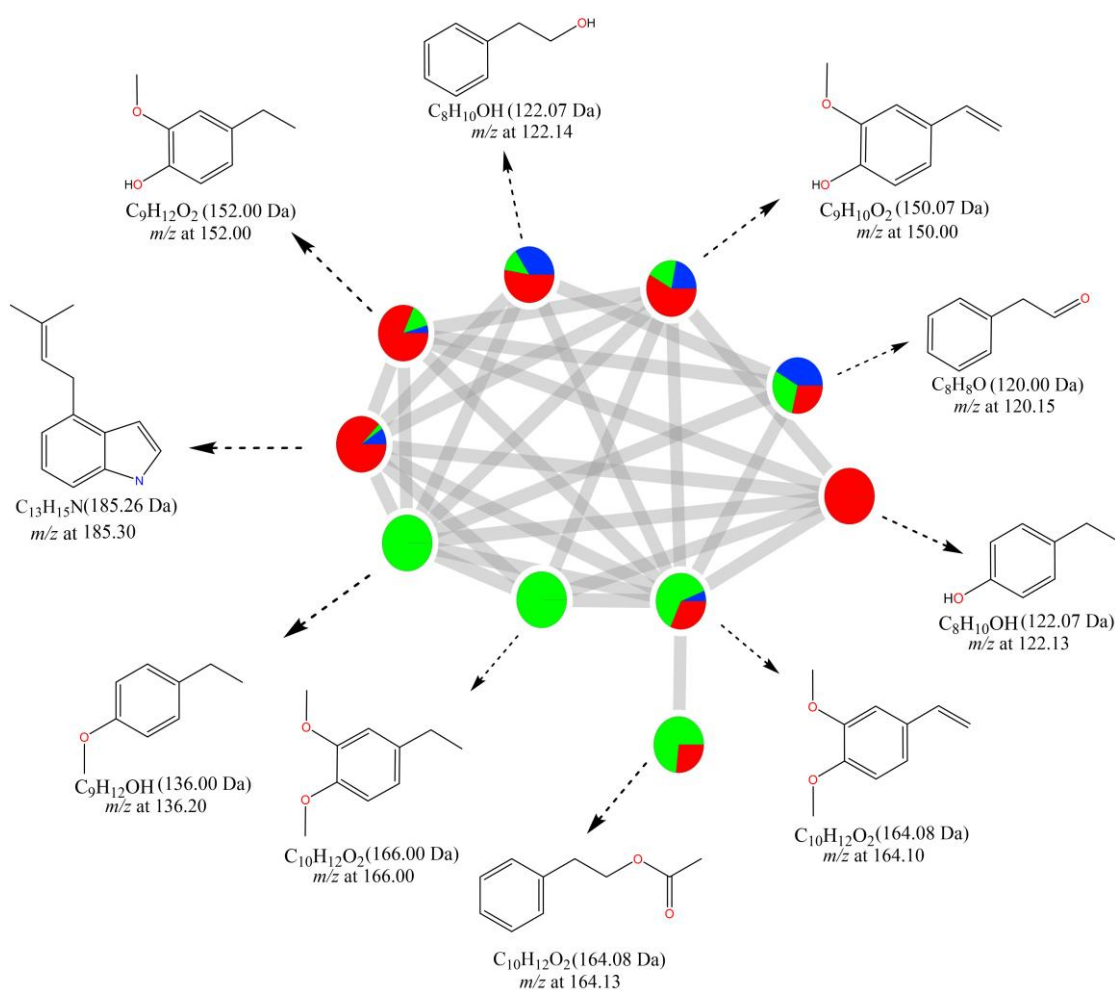


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando GNPS e Cytoscape

Por fim, o terceiro e último subcluster referente ao cultivo em meio sólido é ilustrado na FIGURA 4.40 e se caracteriza principalmente pela presença de metabólitos com estruturas aromáticas. Nesse agrupamento, destacou-se uma significativa influência dos íons metálicos sobre compostos fenólicos e seus derivados o-metilados, evidenciando uma complexa regulação das vias metabólicas envolvidas na modificação estrutural desses compostos.

Entre os compostos identificados, destacam-se o 4-vinilguaiacol, o 4-etilguaiacol e o 4-etilfenol, cuja produção foi mais intensamente promovida pela presença do íon  $Mn^{2+}$ . Esse cátion demonstrou maior eficiência na mediação da bioconversão direta desses fenóis aromáticos. Por outro lado, o íon  $Co^{2+}$  apresentou um impacto mais expressivo nas vias metabólicas que conduzem à formação de variações o-metiladas desses compostos, sugerindo uma atuação específica sobre enzimas envolvidas em reações de metilação.

FIGURA 4.40 – Cluster obtido em meio sólido contendo moléculas aromáticas

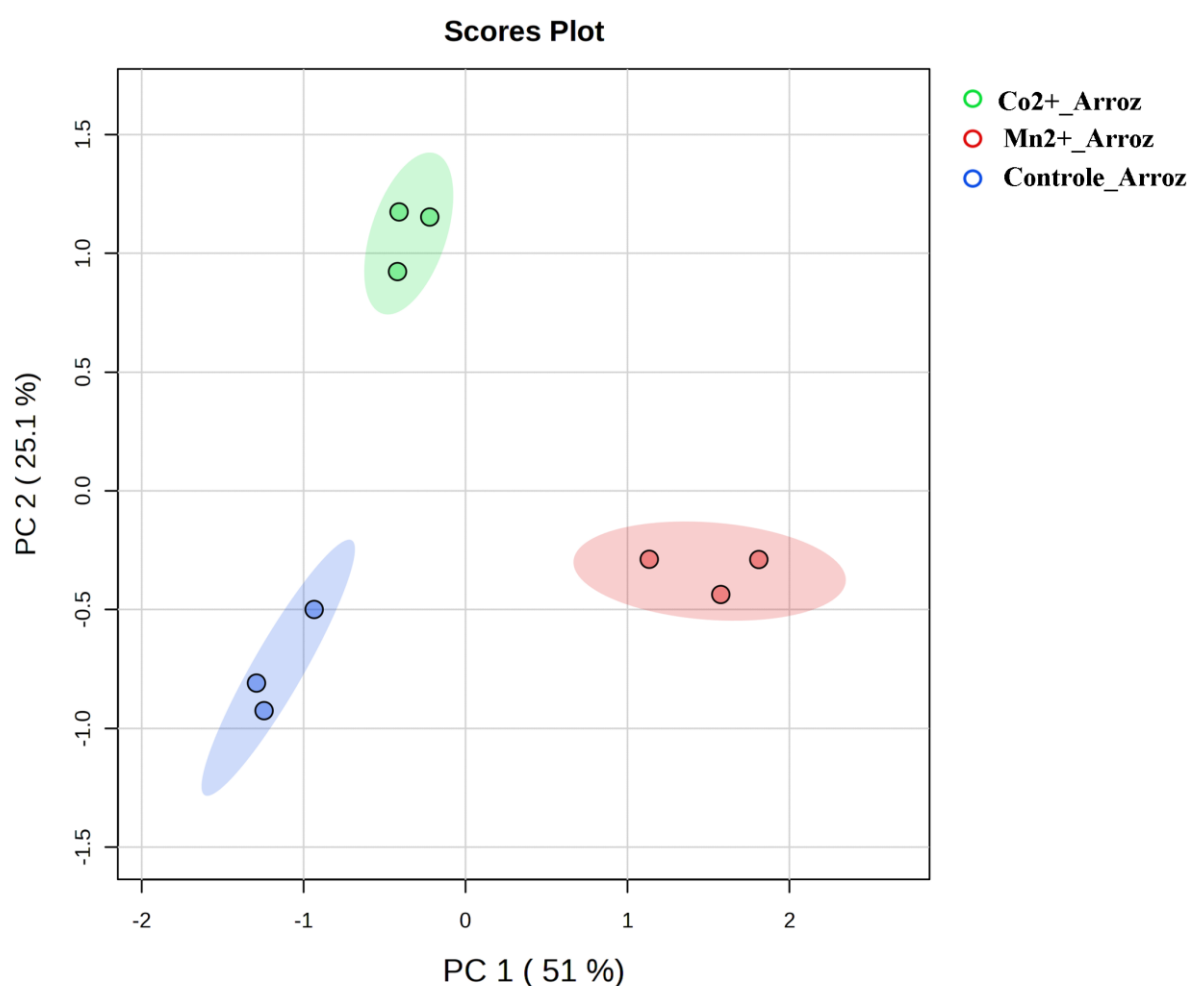


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando GNPS e Cytoscape

A PCA realizada com os dados obtidos em meio sólido teve como valores representados pela PC1 de 51,7%, enquanto o PC2 contribuiu com 25,1%, conforme observado na FIGURA 4.41. O gráfico de dispersão destacou uma separação distinta entre os grupos analisados, semelhantemente ao que havia sido

visto para o experimento em meio líquido. O gráfico de biplot, FIGURA 4.42, ilustrou a distribuição vetorial de cada metabólito. Nesse caso, pelo fato de o meio de cultivo apresentar muitos metabólitos agrupados em um quadrante específico, sua leitura se torna um pouco trabalhosa. A FIGURA 4.43 apresenta um dendrograma, também separando efetivamente os grupos experimentais em regiões distintas. O gráfico também traz o grupo de cultivo com íon  $Mn^{2+}$  sendo significativamente diferente dos demais.

FIGURA 4.41- Gráfico de análises de componentes principais em meio sólido (scores)

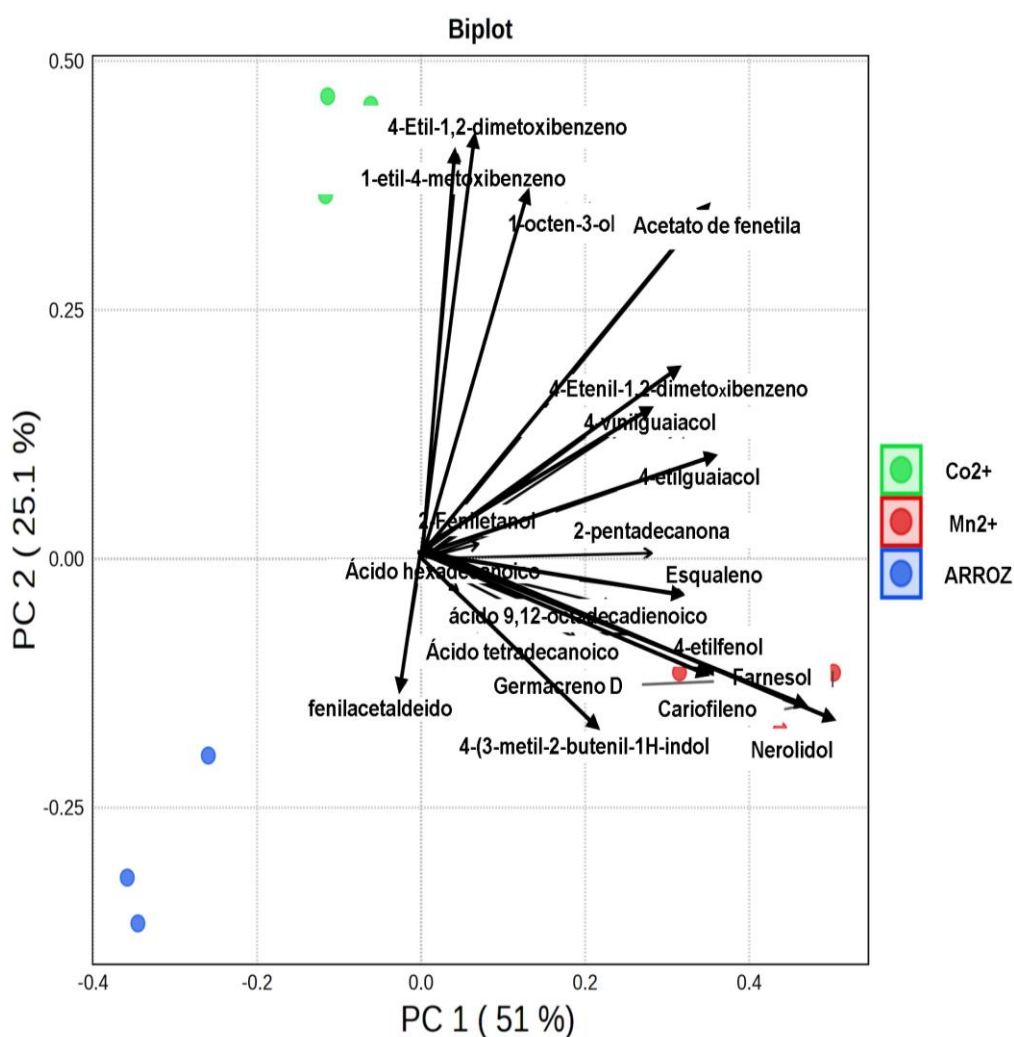


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

O heatmap apresentado (FIGURA 4.44) mostra o perfil de compostos voláteis emitidos pelo *P. citrinum* em meio sólido (arroz) submetidas a diferentes

tratamentos com cátions metálicos: manganês ( $Mn^{2+}$ ), cobalto ( $Co^{2+}$ ) e um controle sem adição de metais.

FIGURA 4.42- Gráfico de análises de componentes principais em meio sólido (biplot)

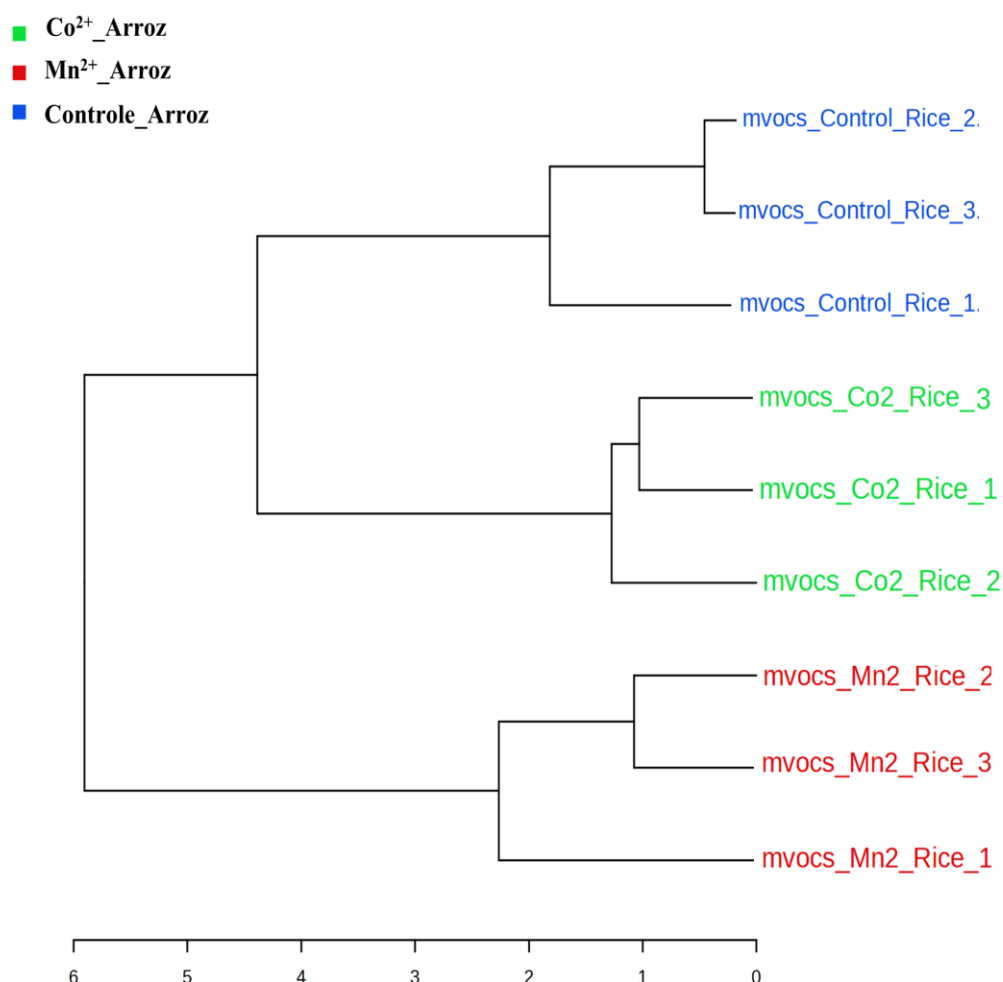


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

A adição de  $Mn^{2+}$  induziu uma elevação expressiva nos níveis de diversos compostos voláteis, como esqualeno, nerolidol, farnesol, germacreno D e cariofileno, todos associados a rotas metabólicas dos terpenóides. A coloração vermelha intensa de diversas células no heatmap indica que  $Mn^{2+}$  atua como um

forte indutor do metabolismo secundário nesse meio, provavelmente ativando rotas ligadas à defesa dos microrganismos e ao metabolismo dos terpenoides.

FIGURA 4.43- Gráfico de dendrograma dos cultivos em meio sólido

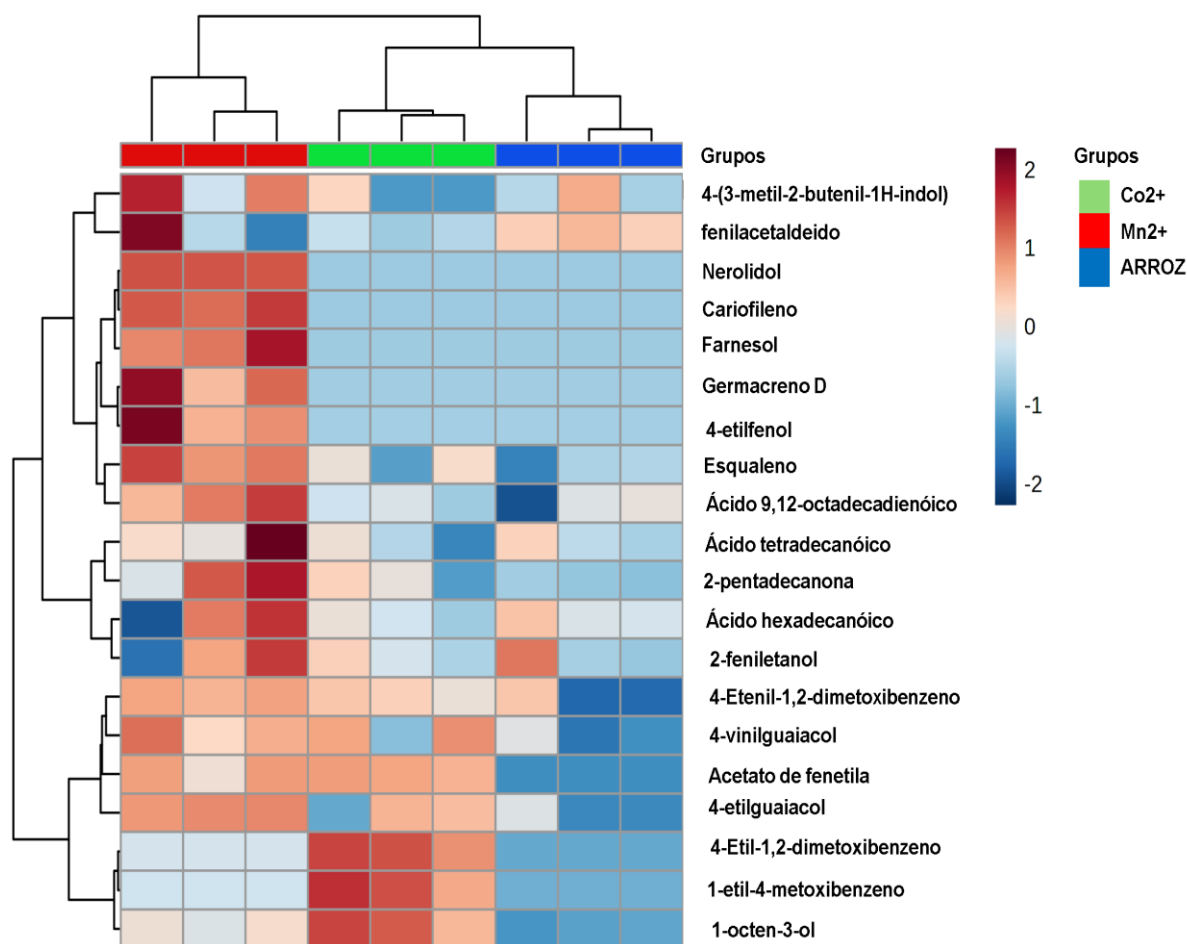


Fonte: Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

Por outro lado, a adição de Co<sup>2+</sup> apresentou um efeito mais moderado e seletivo sobre o perfil de compostos voláteis. Observou-se um aumento na abundância de alguns compostos O-metilados, além da oxilipina 1-octen-3-ol, indicando que o cobalto influencia rotas metabólicas distintas das ativadas pelo manganês. Esses resultados reforçam a ideia de que o Co<sup>2+</sup> pode modular vias

relacionadas principalmente à biossíntese de compostos metilados e derivados de ácidos graxos.

FIGURA 4.44 - Mapa de calor representando as intensidades dos COVs entre os grupos avaliados em meio sólido



Fonte Elaborado pelo autor (2025), utilizando a plataforma MetaboAnalyst

Quando observamos mais profundamente os metabólitos observados no meio líquido podemos notar uma produção de compostos alquil pirazínicos intimamente relacionado ao cultivo com o íon  $\text{Co}^{2+}$ .

O surgimento dessas moléculas também ocorre de outras formas na natureza, sabe-se atualmente que é possível encontrar alquil pirazinas em plantas como ervilha verde, insetos (mosca da fruta do mediterrâneo, *Ceratitidis capitata*), além de bactérias e fungos (Chuman *et al.*, 1987 ; Silva-Junior *et al.* 2018; Longo ; Saroman 2006) .

A indústria alimentícia possui um grande interesse na produção de pirazinas, a biossíntese desses compostos, quando comparado com a produção sintética acontece em condições mais brandas impactando menos na produção de substâncias poluentes (Sharma *et.al* 2020 ; Meng, Wang, Xiao, 2015).

Identificar um produtor eficiente de pirazinas por meio de testes de triagem é fundamental para as fases seguintes do processo biossintético, que envolvem a otimização das condições de cultivo e de fato a ampliação da produção em sistemas de biorreatores (Yang *et al.*, 2020). A princípio a cepa de *Penicillium* utilizada nesse estudo parece ser um microrganismo promissor para estudos futuros seguindo essa temática.

As vias biossintéticas responsáveis pela formação dos compostos 2,5-dimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina e 3-etenil-2,5-dimetilpirazina, conforme descritas por Silva-Junior *et al.* (2018) e ilustradas na FIGURA 4.45, têm início a partir do aminoácido L-treonina. Esse precursor é convertido em aminoacetona por ação de uma oxidase. Em seguida, duas moléculas de aminoacetona se condensam, passando por uma reação de desidratação que leva à formação da 2,5-dimetil-3,6-di-hidropirazina (DHP). Essa intermediária cíclica é então oxidada, resultando no composto 2,5-dimetilpirazina.

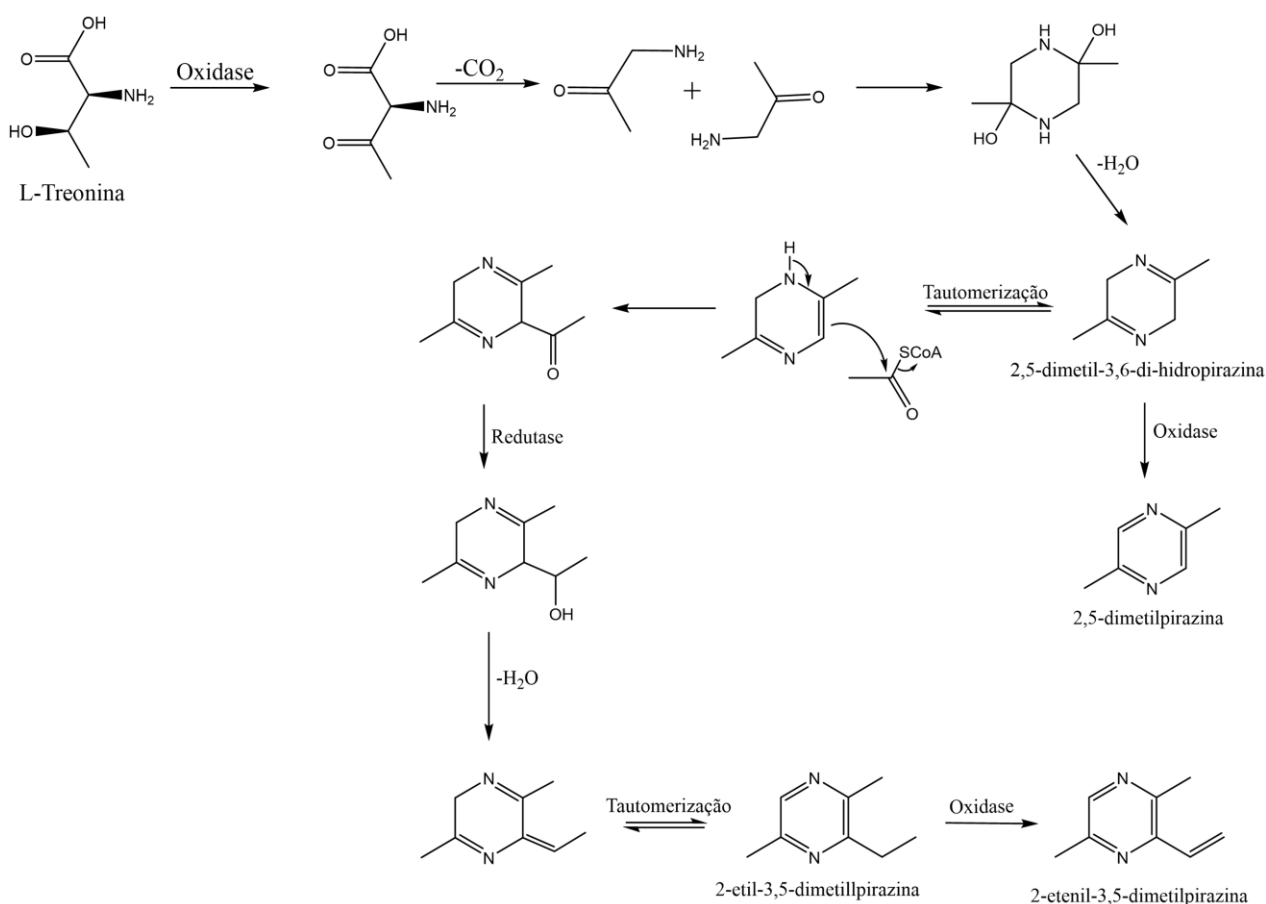
Esse composto foi detectado tanto nas amostras controle quanto nos tratamentos com adição dos cátions manganês e cobalto, no entanto, observou-se que o cátion cobalto teve um impacto mais expressivo na intensificação da biossíntese da 2,5-dimetilpirazina.

Os compostos 3-etil-2,5-dimetilpirazina e 3-etenil-2,5-dimetilpirazina são formados por uma rota paralela, com um desvio biossintético que ocorre a partir da tautomerização da DHP e da adição de um grupo acetato na posição C3. A carbonila resultante dessa modificação é reduzida a um álcool, que posteriormente sofre uma desidratação, essa transformação é seguida por uma nova tautomerização, originando o composto 3-etil-2,5-dimetilpirazina. Na etapa final, uma oxidase promove a oxidação do grupo etil, formando o composto 3-

etenil-2,5-dimetilpirazina.

As alquilpirazinas produzidas ao longo dessas rotas foram formadas de maneira mais proeminente na presença do íon  $\text{Co}^{2+}$ , reforçando a hipótese de que esse cátion tem um papel fundamental na ativação ou estabilização de enzimas envolvidas nas reações. A análise geral das rotas biossintéticas revela a presença de diversas etapas de oxidação e redução, indicando o envolvimento de enzimas oxidorreductoras, possivelmente da família do citocromo P450. Essas enzimas são amplamente conhecidas por catalisar reações complexas, como hidroxilações e oxidações de cadeias alquílicas, compatíveis com os tipos de transformações observadas.

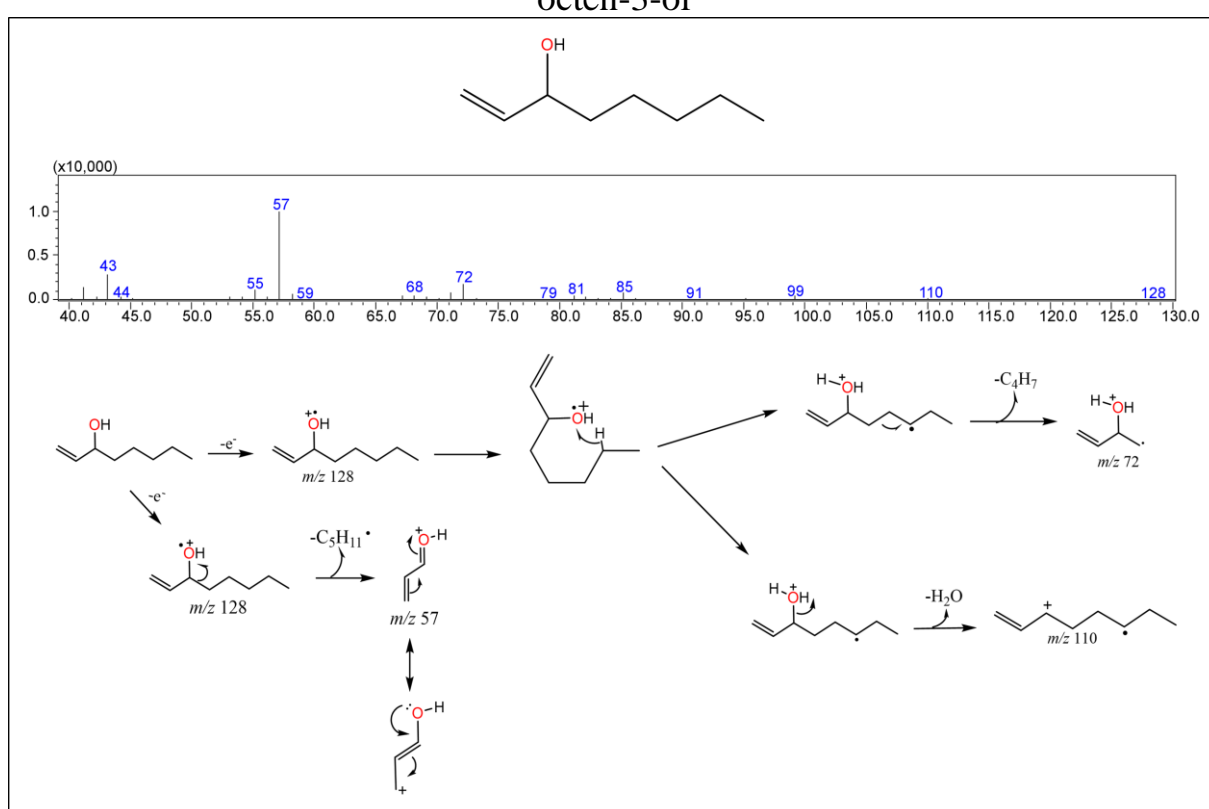
FIGURA 4.45- Proposta de biossíntese de alquil pirazinas obtidas nos cultivos em meio líquido



Fonte: Adaptado de Silva-Junior *et al* (2018)

O 1-octen-3-ol, apresentado na FIGURA 4.46, destacou-se como um dos metabólitos mais expressivos nos cultivos realizados em meio sólido com a adição de cobalto. Popularmente conhecido como "álcool de cogumelo", este composto volátil é amplamente emitido por diversos gêneros fúngicos, incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Ulocladium* (Bennett ; Inamdar, 2015).

FIGURA 4.46- Estrutura, espectro de massa e proposta de fragmentação do 1-octen-3-ol



Fonte: Autoria própria (2025)

Estudos anteriores demonstram que o 1-octen-3-ol atua como atraente químico para insetos como as moscas tsé-tsé (*Glossina pallidipes* e *G. morsitans*), além de funcionar como feromônio de agregação para besouros das espécies *Oryzaephilus surinamensis* e *O. mercator* (Hall *et al.*, 1984; Pierce *et al.*, 1989).

Adicionalmente, pesquisas conduzidas por Pfeil e Mumma (1993) revelaram que o 1-octen-3-ol, quando aplicado isoladamente, exerce um efeito

repelente sobre moscas forídeas, afetando tanto machos quanto fêmeas. De acordo com Fäldt *et al.* (1999), compostos voláteis com cadeia de oito carbonos, como o 1-octen-3-ol, podem desempenhar papel ecológico importante, ao atrair predadores naturais de pragas fúngicas, atuando assim como parte de um sistema defensivo.

Por outro lado, esses mesmos voláteis já demonstraram ser aversivos para certos predadores, como a lesma *Ariolimax columbianus*, conforme observado por Wood *et al.* (2001). Esse metabólito em baixas concentrações foi capaz de repelir lesmas, caracóis e nematoides, enquanto que em altas doses ocasionou suas mortes, (khoja, *et.al.*, 2019; Khoja; Salim *et al.*, 2021, Hummadi; Esam *et al.*, 2021). 1-octen-3-ol também possui atividades antibacterianas e antifúngicas (Xiong *et.al.*, 2017).

A oxidação do ácido linoleico catalisada por enzimas é a via que leva à formação de voláteis de oito carbonos FIGURA 4.47, depende da oxidação do ácido graxo poli-insaturado ácido linoleico por uma lipoxigenase e da clivagem posterior do hidroperóxido de ácido graxo intermediário por uma hidroperóxido liase, conforme descrito em duas vias diferentes, de acordo com Tressl *et al.* (1982) e Wurzenberger e Grosch (1984).

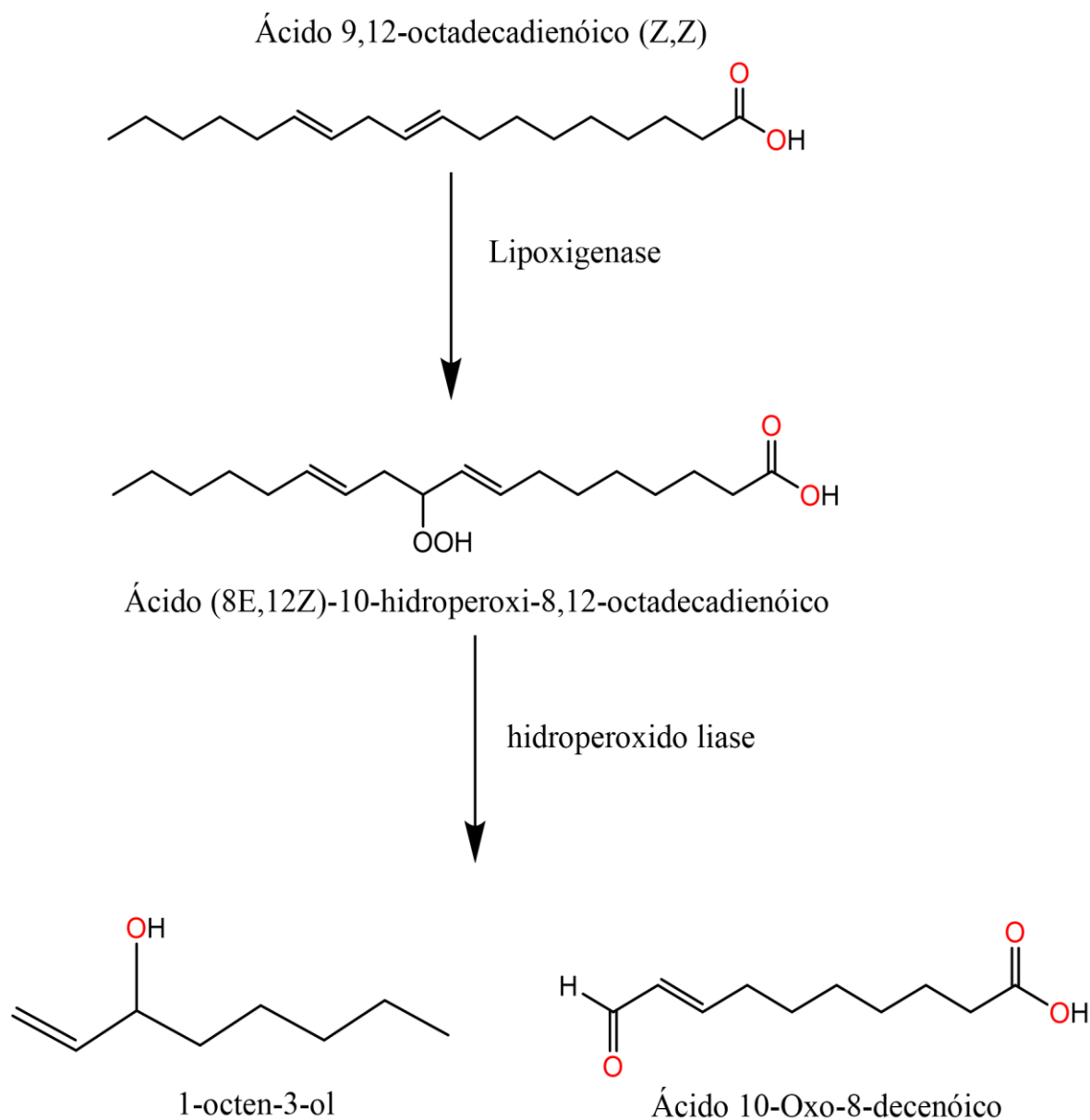
Em nosso estudo, observamos que a lipoxigenase (LOX) apresentou uma notável estabilização na presença do íon  $\text{Co}^{2+}$ . Esse efeito estabilizador pode estar diretamente relacionado à capacidade do cátion em prevenir processos que levam à desnaturação da enzima, favorecendo a preservação de sua estrutura tridimensional nativa e, conseqüentemente, da sua atividade catalítica.

A literatura já descreve amplamente o papel de aditivos metálicos na estabilização de enzimas. Segundo Beneytout *et al.* (1989), Gotz-Schmidt, Wenzel e Schreier (1986), bem como Hatley e Franks (1991), a ação estabilizadora de certos íons metálicos está frequentemente associada à sua habilidade de interagir com grupos funcionais específicos das proteínas, reduzindo a flexibilidade conformacional excessiva e protegendo a estrutura

contra agentes desnaturantes. De forma semelhante, Hall *et al.* (2008) destacam que a manutenção da atividade enzimática na presença de metais pode ser atribuída à minimização de interações não-específicas com o meio, além de um possível efeito direto sobre os centros ativos ou regiões de ligação da enzima.

Mais especificamente, um estudo conduzido por Yuzuru, Teruhiko e Kei (1978) relatou a estabilização da atividade da lipoxigenase pelo íon  $\text{Co}^{2+}$ , corroborando os dados obtidos em nosso trabalho.

FIGURA 4.47- proposta de rota biossintética para o 1-octen-3-ol



Fonte: Adaptado de Tressl *et al* 2002

Os terpenóides produzidos por fungos despertam considerável interesse na pesquisa científica devido à ampla gama de atividades biológicas que apresentam. Esses metabólitos secundários têm sido associados a efeitos tóxicos, propriedades antimicrobianas, ação antitumoral, citotoxicidade e atividades anti-inflamatórias, conforme demonstrado em diversos estudos (Akihisa *et al.*, 2007; Mothana *et al.*, 2000).

O ponto chave na regulação da biossíntese de metabólitos secundários ocorre na etapa de controle da atividade enzimática (Quin *et al.*, 2015). Estudos mostram que o ciclo catalítico das sesquiterpeno sintases responde à disponibilidade de íons metálicos divalentes. Por exemplo, ao incubar *in vitro* variantes da  $\Delta 6$ -protoludeno sintase na presença de  $Mg^{2+}$ , o principal produto formado é o  $\Delta 6$ -protoludeno. No entanto, quando o cofator metálico é substituído por  $Ca^{2+}$ , o perfil de sesquiterpenos desloca-se, passando a gerar preferencialmente  $\beta$ -elemeno como composto majoritário (Quin *et al.*, 2015).

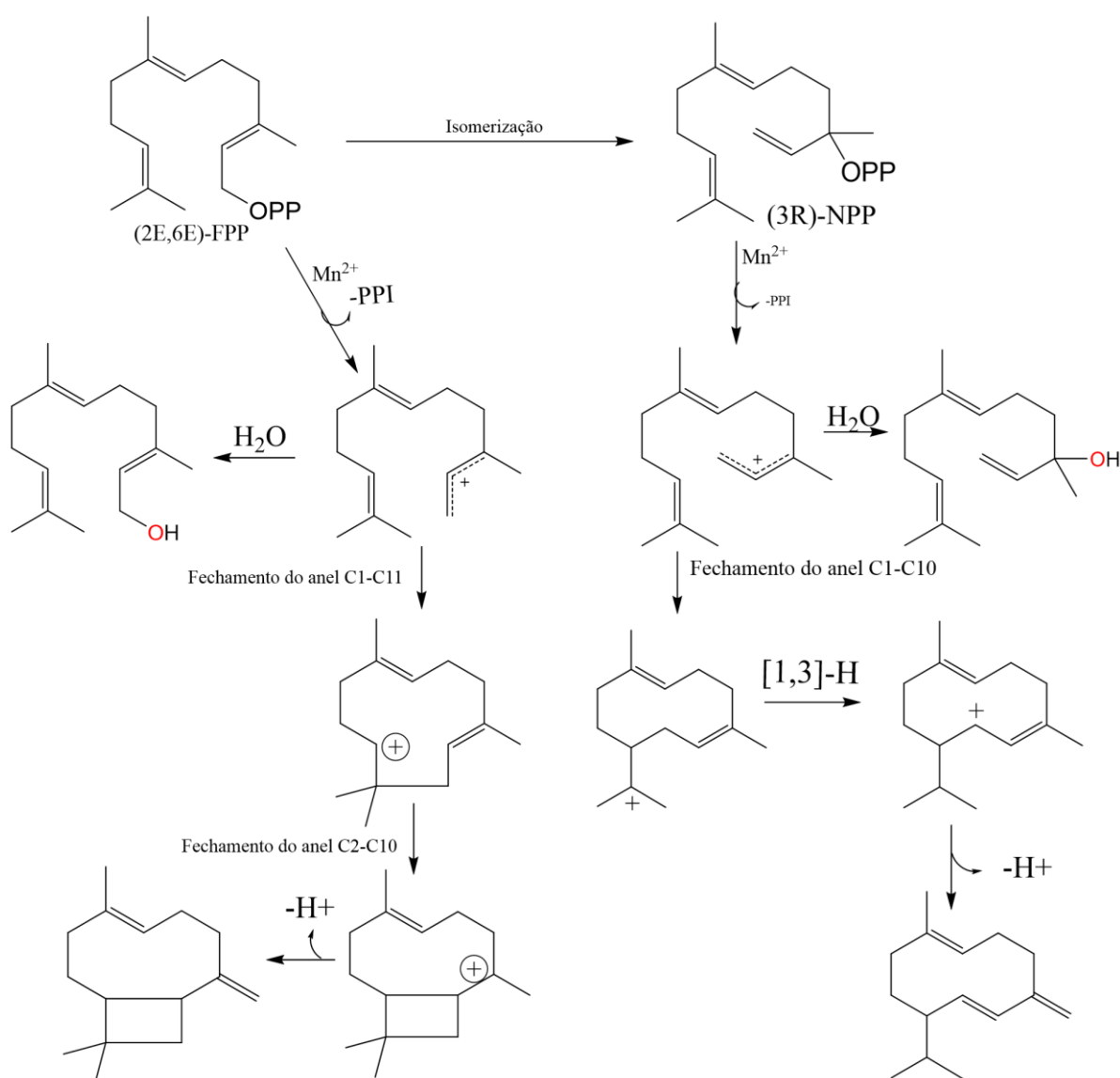
Em nosso estudo conseguimos obter uma efetiva indução de sesquiterpenoides em meio sólido junto a adição de  $Mn^{2+}$  nele conseguimos expressar diversas sesquiterpeno sintases, as reações envolvidas foram descritas por Schmidt-Dannert (2015) são representadas na FIGURA 4.48.

Diversas espécies do gênero *Penicillium* são reconhecidas pela produção de sesquiterpenos com estruturas e propriedades variadas. Por exemplo, *P. cyclopium* é capaz de produzir germacreno A, enquanto *P. expansum* sintetiza germacreno B. Já *P. clavigerum* apresenta  $\beta$ -elemeno como um de seus metabólitos voláteis (Fischer *et al.*, 1999), e *P. caseifulvum* destaca-se pela produção de  $\beta$ -cariofileno (Larsen, 1998).

*Penicillium roqueforti*, uma das espécies mais estudadas do gênero, exibe um perfil químico ainda mais diversificado. Além do  $\beta$ -elemeno, esse fungo é capaz de produzir uma ampla gama de sesquiterpenos, incluindo diepi- $\alpha$ -cedreno,  $\beta$ -gurjuneno, aristoloqueno, valenceno,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -himacaleno e  $\beta$ -bisaboleno (Demyttenaere *et al.*, 2003; Jelen, 2002).

Os terpenos são a classe mais abundante de metabólitos naturais, exibindo funções antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, como demonstrado para o nerolidol (Chan *et al.*, 2016), o farnesol inibe a germinação e o crescimento de *Ustilaginoidea virens* via produção de EROS (Yu *et al.*, 2024). O  $\beta$ -cariofileno está associado a múltiplas propriedades biológicas (Francomano *et al.*, 2019), a estrutura do germacreno D, com seu espectro de massas e fragmentação proposta é apresentada na FIGURA 4.49.

FIGURA 4.48 – Biossíntese de terpenóides fúngicos induzidos pela adição de  $Mn^{2+}$



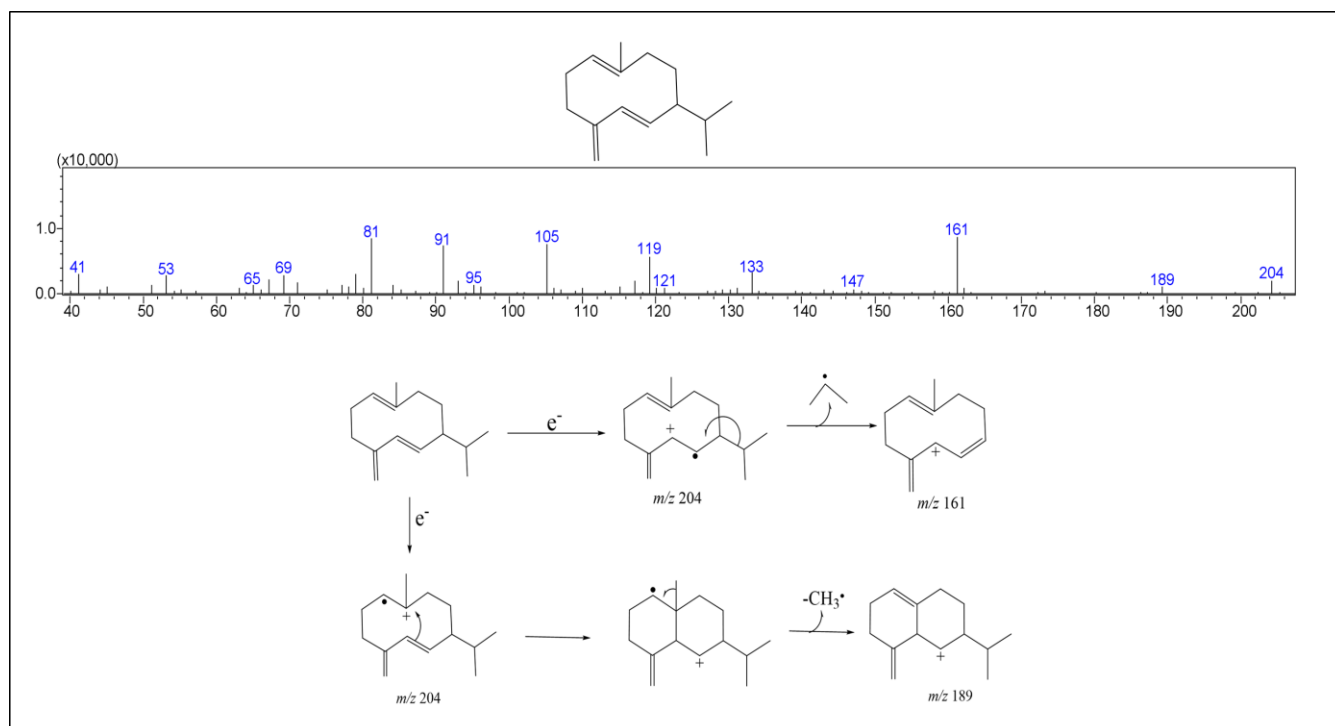
Fonte: Adaptado de Schmidt-Dannert 2015

O composto 4-vinilguaiacol (4VG), resultante da biotransformação

do ácido ferúlico, foi identificado como um metabólito significativamente induzido em cultivos realizados em meio sólido, especialmente na presença do cátion manganês. Esse resultado indica que o  $Mn^{2+}$  pode atuar como um modulador importante na atividade enzimática envolvida na conversão do ácido ferúlico em 4VG.

O 4-vinilguaiacol é um composto de grande interesse para a indústria alimentícia, sendo amplamente utilizado como agente aromatizante. Seu aroma característico, descrito como aroma de cravo, é particularmente valorizado na produção de certas cervejas especiais, como as do tipo *Weissbier* (cerveja de trigo belga) e *Rauchbier* (cerveja defumada alemã) (Mathew *et al.*, 2007). A capacidade de induzir sua produção por meio de condições específicas de cultivo, como a adição de manganês, destaca o potencial biotecnológico do processo e abre caminhos para aplicações industriais voltadas à biossíntese controlada de compostos aromáticos naturais.

FIGURA 4.49- Estrutura, espectro de massas e proposta de fragmentação do germacreno D

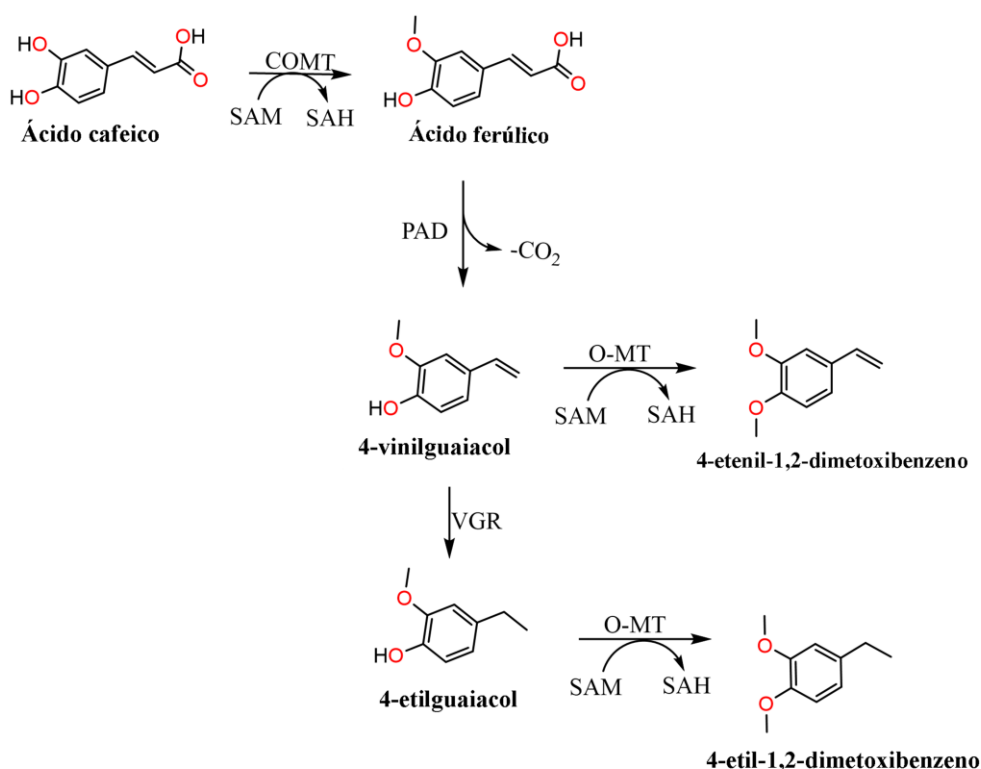


Fonte: Autoria própria (2025)

Estudos sobre as enzimas envolvidas na descarboxilação de ácido ferúlico (AF) para 4VG foram realizados principalmente em bactérias e leveduras ( Priefert *et al.*, 2001 ). Altas concentrações de 4VG foram obtidas em culturas de *Bacillus coagulans* BK07 (908 mg/l) ou *Debaryomyces hansenii* (1470 mg/l) por Karmakar *et al.* (2000) e Mathew *et al.* (2007) , respectivamente.

Ainda há poucos estudos relatando esse processo em fungos, *Aspergillus niger* tem sido relatado como uma espécie promissora para a biotransformação de FA e 4VG ( Peña 2010; Ward *et al.*, 2006 ). Em nosso estudo podemos detectar o 4VG sendo produzido pelo fungo *P. citrinum*, e além dele outros metabólitos que podem surgir a partir de outras enzimas, no caso o 4-etil-guaicol (4EG) produzido a partir de uma redutase de 4VG e a forma metilada 1,2-dimetoxi-4-vinilbenzeno produzida por uma *O*-metiltransferase de 4VG, ainda foi possível observar a formação de 4-etil-1,2-metoxibenzeno provavelmente advinda de um *O*-metiltransferase de 4EG (FIGURA 4.50)

FIGURA 4.50- Representação das rotas enzimáticas de 4VG e seus derivados



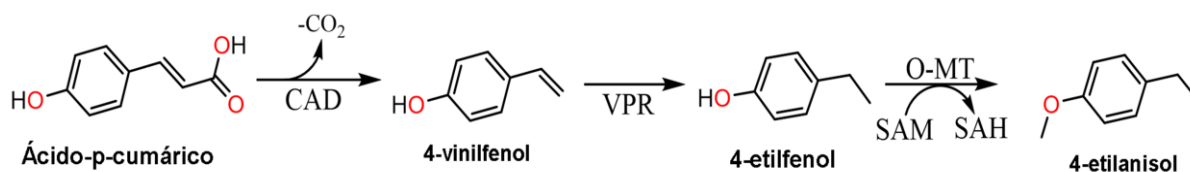
Fonte: Autoria própria (2025)

O 4-etilfenol é um composto fenólico que pode ser formado a partir da atuação enzimática de microrganismos como *Brettanomyces bruxellensis*, os quais transformam o ácido p-cumárico por meio de duas etapas enzimáticas distintas. A primeira envolve a ação de uma ácido p-cumárico descarboxilase, que converte esse ácido em 4-vinilfenol. Em seguida, uma vinil redutase reduz a ligação dupla da estrutura, originando o 4-etilfenol (Hixson *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, foi possível observar novamente a formação de compostos derivados por modificações na estrutura fenólica, especificamente a presença de 4-etilanol, um composto metilado estruturalmente relacionado ao 4-etilfenol. A detecção desse composto sugere a ocorrência de uma possível reação de metilação enzimática, provavelmente catalisada por uma O-metiltransferase, conforme ilustrado na FIGURA 4.51. Essa classe de enzimas atua transferindo um grupo metila para compostos fenólicos, o que pode modificar profundamente suas propriedades químicas e biológicas.

Estudos recentes indicam que algumas O-metiltransferases podem depender da presença de íons metálicos como cofatores para sua atividade catalítica (Abdelraheem *et al.*, 2022). No contexto do nosso experimento, observamos que o uso de  $\text{Co}^{2+}$  em altas concentrações favoreceu de forma mais pronunciada a formação de 4-etilanol quando comparado ao  $\text{Mn}^{2+}$ , sugerindo uma maior eficiência da atividade enzimática dependente de cobalto neste processo.

Figura 4.51 – Mecanismo proposto para produção de 4-etilfenol e 4-etilanol em *P.citrinum*

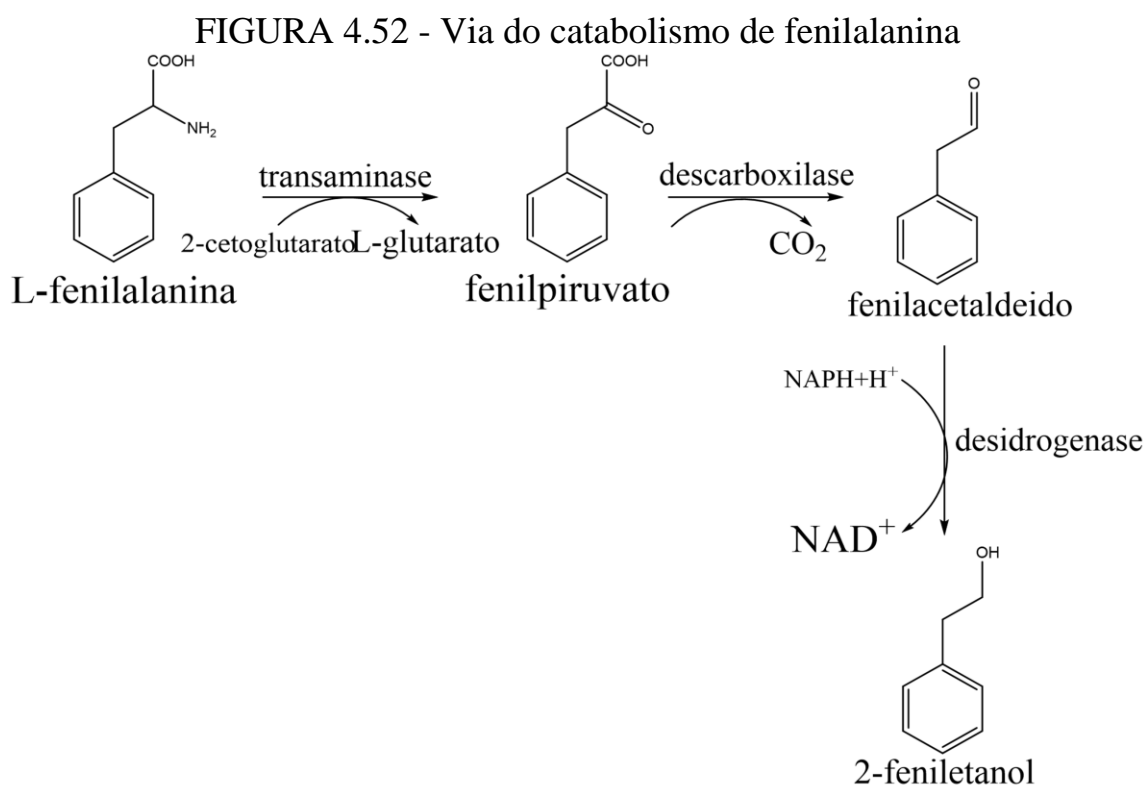


Fonte Autoria própria (2025)

Por fim foi possível observar alguns metabólitos derivados da via de

Ehrlich assim como já se tinha observado no cultivo sob irradiação com luz UV. A FIGURA 4.52 demonstra a via de Ehrlich obtida a partir do catabolismo do aminoácido L-fenilalanina.

A L-fenilalanina é transaminada para fenilpiruvato por uma enzima transaminase, em seguida ocorre uma descarboxilação para fenilacetaldeído pela fenilpiruvato descarboxilase e então reduzido a 2-feniletanol por uma desidrogenase ( Etschmann *et al.*, 2002).



Fonte: Adaptado de Etschmann *et al* (2002)

O 2-feniletanol é um álcool aromático com fragrância semelhante à de rosas, considerado um componente importante de diversos produtos. É amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos, perfumaria e alimentos. O principal uso do 2-feniletanol no mercado mundial é como ingrediente de aroma para modificar certas composições de aroma ( Hua *et al.*, 2014 ; Liu, *et.al* 2014; Chang *et.al* 2015).

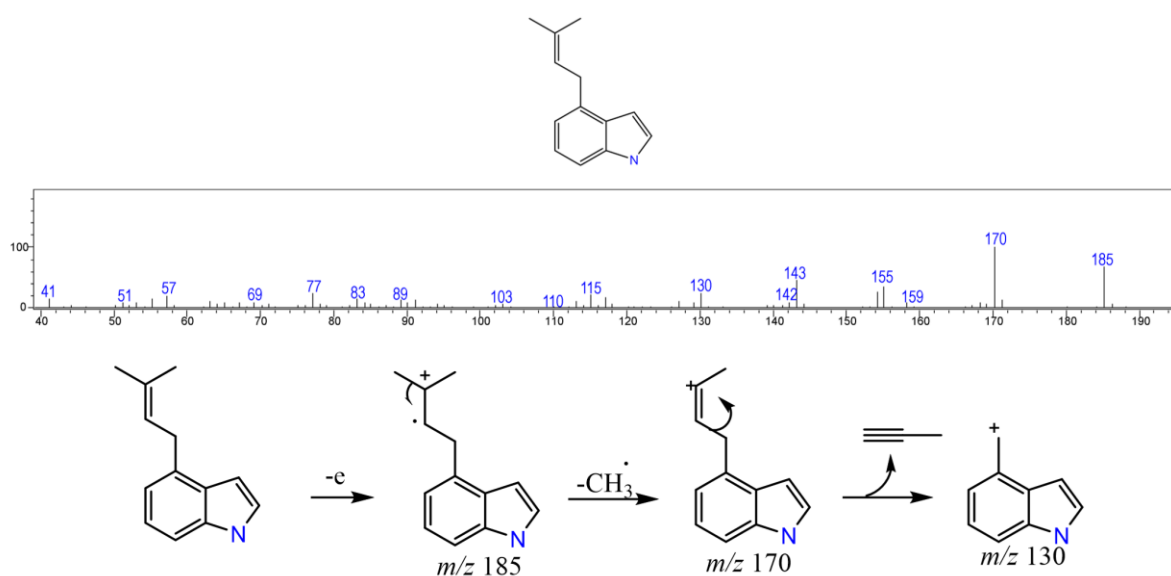
Muitos estudos têm se concentrado na produção biotecnológica de

sabores naturais, como benzaldeído, vanilina,  $\gamma$ -decalactona, acetoína, tetrametilpirazina e 2-feniletanol ( Etschmann *et al.*, 2002 , Xu *et al.*, 2007 , Krings; Berger, 1998 ; Zhang *et al.*, 2006 ). Dentre essas fragrâncias naturais, o 2-Feniletanol tem recebido crescente atenção por seu valor como composto aromatizante, e houve um progresso considerável em sua produção.

Alguns estudos já relatam que a mudança de meio pode trazer impacto consideravel na produção desse composto em diversos microrganismos (Eshkol *et.al*, 2009., Cui *et al.*, 2008., Etschmann *et al.*, 2003). Em nossas condições demonstramos que o 2-feniletanol pode ter seu fator de produção aumentado em fungo *P. citrinum* com a adição de fatores abioticos como a adição de metais divalentes ( $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ).

Um metabólito prenilado derivado do aminoacido triptofano, o 4-(3-Metil-2-butenil)-1H-indol (FIGURA 4.53), apresentou uma maior produção com a adição de  $Mn^{2+}$ , esses compostos são comumente observados em diversos fungos.

FIGURA 4.53 – Estrutura, espectro de massas e proposta de fragmentação de 4-(3-Metil-2-butenil)-1H-indol



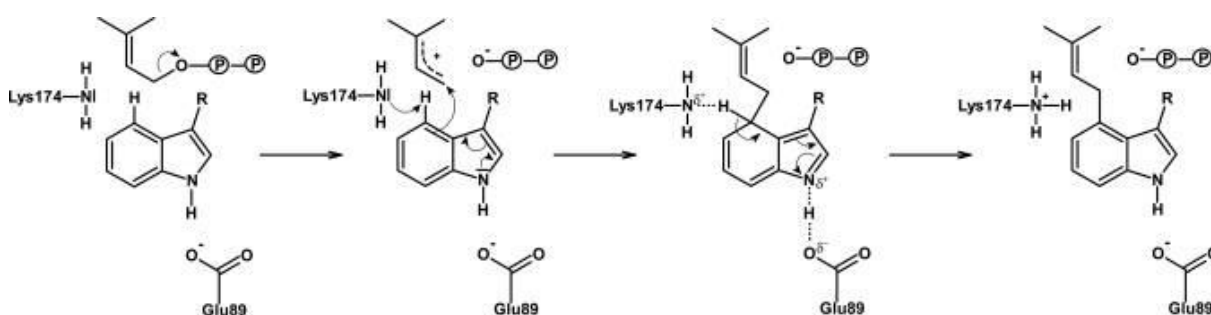
Fonte: Autoria própria (2025)

Metzger *et al.* (2009) propuseram um mecanismo biossintético em três etapas para a formação da estrutura central da molécula 4-(3-Metil-2-butenil)-1H-indol (FIGURA 4.54). Na primeira etapa, análoga à biossíntese dos sesquiterpenos, um cátion divalente coordena-se ao oxigênio do grupo difosfato e a resíduos de aspartato, resultando em uma redução da energia de ativação necessária para a formação do carbocátion (eletrófilo).

Na segunda etapa, um resíduo de lisina interage com o hidrogênio do carbono quatro do núcleo indólico, concomitantemente a uma série de deslocalizações eletrônicas iniciadas no nitrogênio da estrutura. Esse rearranjo facilita o ataque nucleofílico do carbono quatro ao eletrófilo formado.

Na terceira etapa, ocorre a desprotonação do carbono quatro, acompanhada por mais uma deslocalização eletrônica, desta vez no sentido inverso ao observado anteriormente. Adicionalmente, a ligação de hidrogênio presente no núcleo indólico interage com um grupo carboxilato de um resíduo de aminoácido, promovendo a estabilização da carga gerada e formando a molécula base do indol prenilado.

FIGURA 4.54 – Biossíntese proposta para a formação de indóis prenilados simples C4 em fungos



Fonte: Metzger *et al.* (2009)

Os indóis prenilados simples também demonstraram diversas atividades biológicas (Almeida *et al.*, 2021; Netz; Opatz. 2015). A eurotiumina, uma amida indólica derivada do fungo *Eurotium* sp., apresentou propriedades antioxidantes (Simal; Youssef, 2021). Indóis prenilados isolados do fungo

*Penicillium paneum* apresentaram potentes atividades citotóxicas contra as linhagens celulares A-549 e HCT-116 (Li *et al.*, 2014)

Com base nesses resultados, fica evidente que os indóis prenilados simples, apesar de sua estrutura relativamente básica, possuem um amplo espectro de atividades biológicas promissoras, que vão desde propriedades antioxidantes até atividade citotóxica contra linhagens celulares específicas. Essa diversidade funcional ressalta a importância de prosseguir com investigações detalhadas acerca desses compostos e seus derivados, ampliando o entendimento de suas potenciais aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

Tais metabólitos, assim como diversos outros obtidos neste estudo, demonstram o potencial da técnica de hidrodestilação, que atualmente é pouco explorada no estudo de compostos orgânicos voláteis. Nossos experimentos confirmaram que a hidrodestilação é, de fato, uma excelente alternativa, oferecendo vantagens em termos de custo-benefício e versatilidade em comparação ao headspace-SPME.

## **5. CONCLUSÃO**

## 5. CONCLUSÃO

Em síntese, nosso estudo, ao integrar redes moleculares e análises estatísticas, permitiu revelar um panorama abrangente de vias modificadas em *P. citrinum* isolado de solo de manguezal. Esta abordagem revelou-se eficaz para caracterizar, pela primeira vez, aspectos relevantes do volatiloma dessa espécie.

A aplicação de íons metálicos como  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  evidenciou respostas bioquímicas distintas, refletidas na atividade modulada de enzimas-chave. Além disso, a exposição à luz UV-A demonstrou um efeito sinérgico na indução de metabólitos voláteis relacionados ao controle do estresse oxidativo.

De forma geral, os resultados indicam que a manipulação dos fatores abióticos se torna uma estratégia promissora para estimular a produção de compostos voláteis com alto potencial biotecnológico, abrindo novas perspectivas para o aproveitamento de microrganismos oriundos de ecossistemas extremos.

## **6. REFERÊNCIAS**

## 6. REFERÊNCIAS

Aamir S., Sutar S., Singh S.K., Baghela A. (2015) A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5(2): 74–81.

ABDEL-AZEEM, Ahmed M. et al. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2016. p. 3-28.

ABDELRAHEEM, Eman et al. Methyltransferases: functions and applications. *ChemBioChem*, v. 23, n. 18, p. e202200212, 2022.

AKIHISA, Toshihiro et al. Efeitos anti-inflamatórios e antitumorais de ácidos triterpênicos e esteróis do fungo *Ganoderma lucidum*. *Química & biodiversidade*, v. 4, n. 2, p. 224-231, 2007.

ALMEIDA, Mariana C. et al. Tryptophan derived natural marine alkaloids and synthetic derivatives as promising antimicrobial agents. *European journal of medicinal chemistry*, v. 209, p. 112945, 2021.

BAI, S. et al. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 15, p. 7035–7048, 2013.

BAQUEIRO-PEÑA, Itzamná et al. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiaicol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, v. 101, n. 12, p. 4721-4724, 2010.

BECHER, Paul G. et al. Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nature Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 821-829, 2020.

BENEYTOUT, Jean-Louis et al. Properties of a lipoxygenase in green algae (*Oscillatoria* sp.). *Plant physiology*, v. 91, n. 1, p. 367-372, 1989.

BENNETT, Joan W.; INAMDAR, Arati A. Are some fungal volatile organic compounds (VOCs) mycotoxins?. *Toxins*, v. 7, n. 9, p. 3785-3804, 2015.

BODE, Helge Björn et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

BONUGLI-SANTOS, Rafaella C. et al. Fungos marinhos: diversidade de enzimas e aplicações biotecnológicas. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 269, 2015.

BOUHLEL, Jihéne et al. Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. *Journal of Chromatography A*, v. 1497, p. 9-18, 2017.

BRAGA, Antonio Fernando VC et al. Antimicrobial Potential of Soil/Sediment Mangrove Associated Fungi: A Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 35, n. 8, p. e-20240032, 2024.

BRAGA, Gilberto UL et al. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current genetics*, v. 61, p. 405-425, 2015.

BUSTILLOS, Oscar Vega. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas – GC/MS. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-a-gas-acoplada-a-espectrometria-de-massas-gc-ms/>. Acesso em: 27 out. 2023.

CHAN, Weng-Keong et al. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.

CHANG, Perng-Kuang et al. Suppression of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. *Toxins*, v. 7, n. 10, p. 3887-3902, 2015.

CHERNIN, Leonid et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. *Environmental microbiology reports*, v. 3, n. 6, p. 698-704, 2011.

CHUMAN, T. et al. Isolation, identification, and synthesis of male-produced sex pheromone of papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*, v. 13, p. 1979-1992, 1987.

CUI, Z. F. et al. Optimization of the medium and conditions for the production of 2+ phenylethanol by yeast. *Food and Fermentation Industries*, v. 34, n. 8, p. 56, 2008.

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

DEDYUKHINA, Emiliya G.; EROSHIN, Valery K. Essential metal ions in the control of microbial metabolism. *Process biochemistry*, v. 26, n. 1, p. 31-37, 1991.

Demyttenaere JCR, Morina RM, Sandra P (2003) Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *J Chromatogr A* 985:127–135

DIAS, Léo Ruben Lopes et al. Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados em Ecossistema de Manguezal. *Revista de Investigação Biomédica*, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2017.

DUBEY, Manish Kumar et al. Regulation and role of metal ions in secondary metabolite production by microorganisms. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2019. p. 259-277.

ESHKOL, N. et al. Produção de 2-feniletanol a partir de L-fenilalanina por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* tolerante ao estresse. *Journal of applied microbiology*, v. 106, n. 2, p. 534-542, 2009.

ETSCHMANN, M. et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 59, p. 1-8, 2002.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 531-536, 2003.

EZRA, David et al. Proton transfer reaction-mass spectrometry as a technique to measure volatile emissions of *Muscodor albus*. *Plant Science*, v. 166, n. 6, p. 1471-1477, 2004.

Fäldt J, Jonsell M, Nordlander G, Borg-Karlson AK (1999) Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their function as insect attractants. *J Chem Ecol* 25:567–590

FASANELLA, Cristiane Cipola. Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo. 2012.

FERREIRA, A. C.; LACERDA, L. D. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. *Ocean and Coastal Management*, v. 125, p. 38–46, 2016.

Fischer G, Schwalbe R, Moller M, Ostrowski R, Dott W (1999) Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* 39:795–810.

FOSTER, Andrew W.; OSMAN, Deenah; ROBINSON, Nigel J. Metal preferences and metallation. *Journal of biological chemistry*, v. 289, n. 41, p. 28095-28103, 2014.

FRANCOMANO, Fabrizio et al.  $\beta$ -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019.

GARDNER, Julian W. et al. (Ed.). *Sensores e sistemas sensoriais para um nariz eletrônico*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992.

GOTZ-SCHMIDT, EM; WENZEL, M.; SCHREIER, P. C<sub>6</sub>-voláteis em homogeneizados de folhas verdes: localização da atividade da hidroperóxido liase. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie*, v. 2, pág. 152-155, 1986.

Hall DR, Beevor PS, Cork A, Nesbitt BF, Vale GA (1984) 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Sci Appl* 5:335–339

HALL, Colin Eric et al. Stabilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 3, p. 258-264, 2008.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98

HARMS, Hauke; SCHLOSSER, Dietmar; WICK, Lukas Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 177-192, 2011.

HATLEY, RHM; FRANKS, F. Aplicações de DSC no desenvolvimento de processos aprimorados de liofilização para produtos biológicos lábeis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 37, n. 8, p. 1905-1914, 1991.

HERRMANN, Andreas (Ed.). *The chemistry and biology of volatiles*. John Wiley & Sons, 2011.

HIDALGO, Kevin et al. Volatolomics in bacterial ecotoxicology, a novel method for detecting signatures of pesticide exposure?. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 3113, 2019.

HIXSON, Josh L. et al. Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 9, p. 2293-2298, 2012.

HONEKER, Linnea K. et al. The volatilome: a vital piece of the complete soil metabolome. *Frontiers in Environmental Science*, v. 9, p. 649905, 2021.

HOUBRAKEN, Jos AMP; FRISVAD, Jens C.; SAMSON, Robert A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, v. 44, p. 117-133, 2010.

HUA, Sui Sheng T. et al. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin research*, v. 30, p. 71-78, 2014.

HUMMADI, Esam H. et al. Volatile organic compounds of *Metarhizium brunneum* influence the efficacy of entomopathogenic nematodes in insect control. *Biological Control*, v. 155, p. 104527, 2021.

IMHOFF, Johannes F. Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource. *Marine drugs*, v. 14, n. 1, p. 19, 2016.

Jelen HH (2002) Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *J Agric Food Chem* 50:6569–6574

KARMAKAR, B. et al. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*, v. 80, n. 3, p. 195-202, 2000.

KATHIRESAN, Kandasamy; BINGHAM, Brian L. *Biology of mangroves and mangrove ecosystems*. 2001.

KHAN, Sumera Afzal et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC microbiology*, v. 8, p. 1-10, 2008.

KHOJA, Salim et al. Fungal volatile organic compounds show promise as potent molluscicides. *Pest management science*, v. 75, n. 12, p. 3392-3404, 2019.

KHOJA, Salim et al. Volatiles of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, attract and kill plant parasitic nematodes. *Biological Control*, v. 152, p. 104472, 2021.

Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

KŁOSOWSKI, Grzegorz; MIKULSKI, Dawid; PIELECH-PRZYBYLSKA, Katarzyna. Pyrazines biosynthesis by *Bacillus* strains isolated from natto fermented soybean. *Biomolecules*, v. 11, n. 11, p. 1736, 2021.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 49, p. 1-8, 1998.

KURAMATA, Masato et al. Citrinolactones A, B and C, and sclerotinin C, plant growth regulators from *Penicillium citrinum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 71, n. 2, p. 499-503, 2007.

LANDAUD, Sophie; HELINCK, Sandra; BONNARME, Pascal. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 77, n. 6, p. 1191-1205, 2008.

Larsen TO (1998) Volatile flavour production by *Penicillium caseifulvum*. *Int Dairy J* 8:883–887

LARSEN, Thomas Ostenfeld; FRISVAD, Jens Christian. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, v. 99, n. 10, p. 1153-1166, 1995.

LI, Chun-Shun et al. Prenylated Indole Alkaloid Derivatives from Marine Sediment-Derived Fungus *Penicillium paneum* SD-44. *Helvetica Chimica Acta*, v. 97, n. 10, p. 1440-1444, 2014.

LINDINGER, W.; JORDAN, A. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chemical Society Reviews*, v. 27, n. 5, p. 347-375, 1998.

LIU, Jingyu et al. Analysis of *Streptomyces* volatilomes using global molecular networking reveals the presence of metabolites with diverse biological activities. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 4, p. e00552-22, 2022.

LIU, Pu et al. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC microbiology*, v. 14, p. 1-14, 2014.

LONGO, María Asunción; SANROMÁN, María Angeles. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

MARINHO, Andrey Moacir do Rosário. Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae). 2005.

MATHEW, Sindhu; ABRAHAM, T. Emília; SUDHEESH, S. Conversão rápida de ácido ferúlico em metabólitos de 4-vinil guaiacol e vanilina por *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 2, pág. 48-52, 2007.

MATYSIK, Silke; HERBARTH, Olf; MUELLER, Andrea. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. *Chemosphere*, v. 76, n. 1, p. 114-119, 2009.

MOTHANA, Ramzi AA et al. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of natural products*, v. 63, n. 3, p. 416-418, 2000.

NARAGHI, Kamran et al. Use of volatile fingerprints for rapid screening of antifungal agents for efficacy against dermatophyte *Trichophyton* species. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 146, n. 2, p. 521-526, 2010.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do et al. *Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos*. 2018.

NETZ, Natalie; OPATZ, Till. Marine indole alkaloids. *Marine drugs*, v. 13, n. 8, p. 4814-4914, 2015.

NGUYEN, Don D. et al. Grazer-induced changes in molecular signatures of cyanobacteria. *Algal Research*, v. 61, p. 102575, 2022.

NIKI, Etsuo et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

OLIVEIRA, Francisco C. et al. Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatogénico *Albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. *Química Nova*, v. 40, n. 8, p. 890-894, 2017.

OREOPOULOU, Antigoni; TSIMOGIANNIS, Dimitrios; OREOPOULOU, Vassiliki. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, p. 243-259, 2019.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. "Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A literature Review". *Frontiers in Microbiology*, 10: 294, 2019.

Pfeil RM, Mumma RO (1993) Bioassay for evaluating attraction of the phorid fly, *Megaselia halterata* to compost colonized by the commercial mushroom, *Agaricus bisporus* and to 1-octen-3-ol and 3-octanone. *Entomol Exp Appl* 69:137–144

Pierce AM, Pierce HD Jr, Borden JH, Oehlschlager AC (1989) Production dynamics of cucujolide pheromones and identification of 1-octen-3-ol as a new aggregation hormone for *Oryzaephilus surinamensis* and *O. mercator* (Coleoptera: Cucujidae). *Environ Entomol* 18:747–755.

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

POHL, Carolina H.; KOCK, Johan LF. Oxidized fatty acids as inter-kingdom signaling molecules. *Molecules*, v. 19, n. 1, p. 1273-1285, 2014.

PONT, Neus Planas; KENDALL, Catherine A.; MAGAN, Naresh. Analysis of volatile fingerprints for monitoring anti-fungal efficacy against the primary and opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*, v. 173, p. 93-101, 2012.

PRATA, P. S.; MOGOLLÓN, N. G. S. R; AUGUSTO, F. Técnicas Cromatográficas Multidimensionais na Investigação de Metabólitos Secundários. *Scientia Chromatographica*, v. 8,n. 4, p. 209-229, 2016 .

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, Alexander. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 296-314, 2001.

QUIN, Maureen B.; MICHEL, Stephen N.; SCHMIDT-DANNERT, Claudia. Moonlighting Metals: Insights into Regulation of Cyclization Pathways in Fungal  $\Delta 6$ -Protoilludene Sesquiterpene Synthases. *ChemBioChem*, v. 16, n. 15, p. 2191-2199, 2015.

RAJPAR, Muhammad Nawaz; ZAKARIA, Mohamed. Mangrove fauna of Asia. In: *Mangrove Ecosystems of Asia*. Springer link, New York, NY, 2014. p. 153-197.

RAY, Ramesh C. (Ed.). *Sustainable Biofuels: Opportunities and Challenges*. 2021.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, v. 42, n. 2, p. 265–270, 13 mar. 1950

RODRIGUES, I. V. P. et al. Diversity of Soil Filamentous Fungi Influenced by Marine Environment in São Luís, Maranhão, Brazil. *The Scientific World Journal*, v. 2020, p. 1–6, 1 maio 2020.

ROMANO, Stefano et al. Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine drugs*, v. 16, n. 7, p. 244, 2018.

SÁ, Carina et al. Effects of volatile sulfur compounds on growth and oxidative stress of *Rhizobium leguminosarum* E20-8 exposed to cadmium. *Science of The Total Environment*, v. 800, p. 149478, 2021.

SAHGAL, Natasha et al. Trichophyton species: use of volatile fingerprints for rapid identification and discrimination. *British journal of dermatology*, v. 155, n. 6, p. 1209-1216, 2006.

SAHGAL, Natasha; MAGAN, Naresh. Fungal volatile fingerprints: Discrimination between dermatophyte species and strains by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 131, n. 1, p. 117-120, 2008.

Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

SALINAS-GARCÍA, Miguel Ángel et al. Cheiros extremos — produção microbiana de compostos orgânicos voláteis nos limites da vida. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 49, p. fuaf004, 2025.

SAMSON, Robert A. Introduction to food and airborne fungi. American Society Microbiology, 2002.

SCHMIDT, Ruth et al. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, v. 9, n. 11, p. 2329-2335, 2015.

SCHMIDT-DANNERT, Claudia. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Biotechnology of isoprenoids*, p. 19-61, 2015.

SCHULZ-BOHM, Kristin; MARTÍN-SÁNCHEZ, Lara; GARBEVA, Paolina. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra-and inter-kingdom interactions. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2484, 2017.

SCIORTINO JR, Carmen V. Atlas of clinically important fungi. John Wiley & Sons, 2017.

SEAGER, Sara; SCHRENK, Matthew; BAINS, William. An astrophysical view of Earth-based metabolic biosignature gases. *Astrobiology*, v. 12, n. 1, p. 61-82, 2012.

SHARMA, Abha et al. Prospecting the potential of agroresidues as substrate for microbial flavor production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 4, p. 18, 2020.

SHIRK, Megan C.; WAGNER, William P.; FALL, Ray. Isoprene formation in *Bacillus subtilis*: a barometer of central carbon assimilation in a bioreactor?. *Biotechnology progress*, v. 18, n. 5, p. 1109-1115, 2002.

SILVA-JUNIOR, Eduardo A. et al. Pyrazines from bacteria and ants: convergent chemistry within an ecological niche. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 2595, 2018.

SPECKBACHER, Verena et al. The Lipoxygenase Lox1 Is Involved in Light-and Injury-Response, Conidiation, and Volatile Organic Compound Biosynthesis in the Mycoparasitic Fungus *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 2004, 2020.

STAROWICZ, Małgorzata. Analysis of volatiles in food products. *Separations*, v. 8, n. 9, p. 157, 2021.

STEINKE, Michael et al. Volatile biomarkers for aquatic ecological research. In: *Advances in ecological research*. Academic Press, 2018. p. 75-92.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

TANAPICHATSAKUL, Chutima et al. Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Current microbiology*, v. 75, p. 476-483, 2018.

TANAPICHATSAKUL, Chutima et al. Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Current microbiology*, v. 75, p. 476-483, 2018.

TELES, A. M. et al. Triagem fitoquímica de extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 8, p. 1–12, 16 jul. 2020.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

TRESEDER, Kathleen K. Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. In: *The fungal community*. CRC Press, 2005. p. 733-752.

TRESSL, Roland; BAHRI, Daoud; ENGEL, Karl Heinz. Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 30, n. 1, p. 89-93, 1982.

USAI, Marianna et al. Chemotaxonomic evaluation by volatolomics analysis of fifty-two genotypes of *Myrtus communis* L. *Plants*, v. 9, n. 10, p. 1288, 2020.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, v. 78, n. 1, p. 343-371, 2014.

WANG, Yu et al. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 78, p. 1-16, 2016.

WARD, O. P. et al. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in applied microbiology*, v. 58, p. 1-75, 2005.

WEI, Hongjuan et al. OSMAC (one strain many compounds) approach in the research of microbial metabolites--a review. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, v. 50, n. 6, p. 701-709, 2010.

WEISSKOPF, Laure; SCHULZ, Stefan; GARBEVA, Paolina. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 6, p. 391-404, 2021.

WENKE, Katrin; KAI, Marco; PIECHULLA, Birgit. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, v. 231, p. 499-506, 2010.

WILSON, Alphas D.; BAIETTO, Manuela. Applications and advances in electronic-nose technologies. *sensors*, v. 9, n. 7, p. 5099-5148, 2009.

Wood WF, Archer CL, Largent DL (2001) 1-Octen-3-ol, a banana slug antifeedant from mushrooms. *Biochem Syst Ecol* 29:531–533

WURZENBERGER, Margot; GROSCH, Werner. The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 794, n. 1, p. 25-30, 1984.

XIONG, Chuan et al. In vitro antimicrobial activities and mechanism of 1-octen-3-ol against food-related bacteria and pathogenic fungi. *Journal of oleo science*, v. 66, n. 9, p. 1041-1049, 2017.

XU, Ping; HUA, Dongliang; MA, Cuiqing. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *TRENDS in Biotechnology*, v. 25, n. 12, p. 571-576, 2007.

YANG, Fan et al. Genome sequencing and flavor compound biosynthesis pathway analyses of *Bacillus licheniformis* isolated from Chinese Maotai-flavor liquor-brewing microbiome. *Food Biotechnology*, v. 34, n. 3, p. 193-211, 2020.

YOUSSEF, Fadia S.; SIMAL-GANDARA, Jesus. Comprehensive overview on the chemistry and biological activities of selected alkaloid producing marine-derived fungi as a valuable reservoir of drug entities. *Biomedicines*, v. 9, n. 5, p. 485, 2021.

YU, Mina et al. Farnesol inhibits growth and development of *Ustilaginoidea virens*. *New Plant Protection*, v. 1, n. 2, p. e17, 2024.

YU, Zhenzhong; FISCHER, Reinhard. Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 25-36, 2019.

YUAN, Joshua S. et al. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 6, p. 323-331, 2009.

YUZURU, Matsuda; TERUHIKO, Beppu; KEI, Arima. Cristalização e especificidade posicional da hidroxidação da lipoxigenase de *Fusarium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 530, n. 3, p. 439-450, 1978.

ZHANG, Yongmei et al. Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 73, p. 771-779, 2006.