

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

**INFLUÊNCIA DO CÁTION MANGANÊS-II COMO AGENTE ABIÓTICO  
NO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS EXTREMÓFILOS DO  
GÊNERO *Talaromyces***

**Mauricio Augusto Pinto Moreno da Silva Alves\***

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

**Orientador: 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 Tese de Doutorado do candidato Mauricio Augusto Pinto Moreno da Silva Alves, realizada em 29/08/2025.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau (UEM)

Profa. Dra. Jéssica Cristina Amaral (ESALQ/USP)

Prof. Dr. Antonio José Cantanhede Filho (IFMA)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

**“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.**  
**(Simone de Beauvoir)**

## Agradecimentos

---

A Deus, por me conceder força e fé para caminhar nesta batalha.

À minha família, em especial aos meus pais Adenilce Miranda, Mauricio Augusto e Andreia Pereira, por todo amor e apoio em todos os momentos.

A minha querida esposa Jessica Dias, por todo incentivo, dedicação, paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, que me permitiu enfrentar grandes desafios, agradeço pelo incentivo e por acreditar no meu trabalho, pela orientação ao longo desses anos e pelos conhecimentos adquiridos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em química da Universidade Federal de São Carlos pelos conhecimentos que foram repassados.

A todos dos departamento de química, docentes, técnicos e secretarias pelas contribuições gerais.

Aos companheiros de laboratório pela amizade, tempos de luta e conhecimentos repassados.

As agencias de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro à minha pesquisa.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização desta pesquisa.

## Lista de abreviaturas

---

<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio <sup>1</sup>
<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono <sup>13</sup>
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H</b>	Espectroscopia de Correlação Hidrogênio-Hidrogênio
<b>DAD</b>	Detector de Arranjo de Diodos
<b>DDA</b>	Aquisição Dependente de Dados
<b>DEPT</b>	Aumento sem Distorção por Transferência de Polarização
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil
<b>ESI</b>	Ionização por Electrospray
<b>FBMN</b>	Rede Molecular Baseada em Características
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
<b>GNPS</b>	Rede Molecular Social Global de Produtos Naturais
<b>HCA</b>	Análise de Agrupamento Hierárquico
<b>HMBC</b>	Correlação de Múltiplas Ligações Heteronucleares
<b>HRMS</b>	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
<b>HSQC</b>	Coerência Quântica Simples Heteronuclear
<b>LC-MS</b>	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>m/z</b>	Razão Massa/Carga
<b>MeOD</b>	Metanol Deuterado (CD <sub>3</sub> OD)

<b>MRM</b>	Monitoramento de Reações Múltiplas
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de Massas Tandem
<b>MS-FINDER</b>	Ferramenta preditiva de fragmentação
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
<b>NPAAtlas</b>	Atlas de Produtos Naturais
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais
<b>PDA</b>	Ágar Batata Dextrose
<b>PLS-DA</b>	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>Qq-ToF</b>	Tempo de Voo com Quadrupolo (Analisador de Massas)
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SISGEN</b>	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<b>SIRIUS</b>	Software para anotação estrutural via MS
<b>SPE</b>	Extração em Fase Sólida
<b>TIC</b>	Cromatograma de Íons Totais
<b>UPLC</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>δ</b>	Deslocamento Químico

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1 - Tabela dos meroterpenoides indicados na rede molecular. ....	46
Tabela 2 - Ajustes obtidos na curva de calibração.....	57
Tabela 3 - Substâncias anotadas pela biblioteca NIST na região de (6,90 a 9,0 minutos) que não foram observadas no extrato controle. ....	65
Tabela 4 - Parâmetros cristalográficos do esteroide 2a. ....	90
Tabela 5 - Comprimentos de ligações e ângulos selecionados para o esteroide 2a. ....	91
Tabela 6 - Deslocamento químico do composto 1.....	119
Tabela 7 - Deslocamento químico do composto 2.....	127
Tabela 8 - Deslocamento químico do composto 3.....	136
Tabela 9 - Compostos anotados no processo de desreplicação com equivalência estrutural aos compostos isolados. ....	141
Tabela 10 - Ajustes obtidos para a curva de calibração dos compostos isolados e quantificação nos extratos dos meios de cultivo czapek e arroz. ....	145

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1</b> - Número anual de compostos naturais publicados e proporção percentual de estruturas inéditas em relação ao total de substâncias isoladas no período.....	4
<b>Figura 2</b> - Aplicação biotecnológica de diferentes fungos. ....	5
<b>Figura 3</b> – Fungo <i>Talaromyces</i> sp isolado de ambientes extremo na região polar.....	8
<b>Figura 4</b> - Fungos de solos contaminados com metais pesados.....	9
<b>Figura 5</b> - Exemplos de compostos descritos para espécies do gênero <i>Talaromyces</i> .....	12
<b>Figura 6</b> – Micrografia do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i> . ....	14
<b>Figura 7</b> - Inserção dos cátions metálicos como fonte de indução e desenvolvimento. ....	17
<b>Figura 8</b> - Morfologia de crescimento do fungo <i>Talaromyces</i> sp. em placa de Petri e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio com lente de 40x.....	24
<b>Figura 9</b> - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês.....	25
<b>Figura 10</b> - Evolução da massa micelial de acordo com o aumento de concentração de manganês.....	26
<b>Figura 11</b> - Cromatogramas do fungo <i>Talaromyces</i> sp em 254 nm (0 mM, controle e 15 e 31 mM, experimento com $Mn^{2+}$ ). ....	28
<b>Figura 12</b> - Cromatogramas do fungo <i>Talaromyces</i> sp em 254 nm (0 mM, controle e 62 mM, experimento com $Mn^{2+}$ ). ....	28
<b>Figura 13</b> - Cromatogramas do fungo <i>Talaromyces</i> sp em 254 nm (0 mM, controle e 125 e 250 mM, experimento com $Mn^{2+}$ ). ....	29
<b>Figura 14</b> - Espectro de hidrogênio do composto 1 (400 MHz, MeOD). ....	30
<b>Figura 15</b> - Espectro de hidrogênio do composto 2 (400 MHz, MeOD). ....	31
<b>Figura 16</b> - Espectro de hidrogênio do composto 3 (400 MHz, MeOD). ....	32
<b>Figura 17</b> - Espectro de hidrogênio do composto 4 (400 MHz, MeOD). ....	33
<b>Figura 18</b> - Espectro de hidrogênio do composto 5 (400 MHz, MeOD). ....	34

<b>Figura 19</b> - Espectro de hidrogênio do composto 6 (400 MHz, MeOD).....	35
<b>Figura 20</b> - Espectro de hidrogênio do composto 7 (400 MHz, MeOD).....	36
<b>Figura 21</b> - Cromatogramas do fungo <i>Talaromyces</i> sp em 254 nm (0 mM, controle e 500 e 1000 mM, experimento com Mn <sup>2+</sup> ). .....	37
<b>Figura 22</b> - Análise de componentes principais (PCA) de 27 amostras em triplicata com área de confiança de 95%. .....	39
<b>Figura 23</b> - Gráfico de loadings das amostras analisadas, indicando os compostos isolados.....	40
<b>Figura 24</b> - Dendrograma das amostras nos níveis de concentração de manganês. ....	41
<b>Figura 25</b> - Rede molecular obtida a partir do extrato fúngico das concentrações de 0 mM (nós de cor vermelha) e 125 mM (nós de cor azul) do fungo <i>Talaromyces</i> sp., agrupada pelo software Cytoscape 3.10.2, com destaque para as principais anotações. ....	43
<b>Figura 26</b> - Agrupamento dos policetideos isolados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo <i>Talaromyces</i> sp.....	44
<b>Figura 27</b> - Agrupamento dos meroterpenoides anotados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo <i>Talaromyces</i> sp. ....	45
<b>Figura 28</b> - Cromatograma do fungo <i>Talaromyces</i> sp. com indicação dos meroterpenoides isolados. ....	46
<b>Figura 29</b> - Cromatograma de DPPH obtido por eluição isocrática com 70% de ACN / 30% de água em 6 minutos (detecção, $\lambda = 330$ nm), (DPPH-H, verde) e (DPPH, vermelho). ....	56
<b>Figura 30</b> - Curva analítica na faixa linear de 0,0125 a 0,20 mM. ....	56
<b>Figura 31</b> - Cromatogramas obtidos dos padrões de ácido ascórbico, ácido gálico e rutina e extratos com e sem a adição do cátion manganês por eluição isocrática com fase móvel composta por ACN/água na proporção v:v 70/30 após 30 minutos de reação entre as amostras e o radical DPPH em uma concentração molar de 0,075 mM.....	59
<b>Figura 32</b> - Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), por meio da ação de diferentes compostos antioxidantes após um tempo de reação de 30 minutos no escuro à temperatura ambiente (25 °C). ....	60
<b>Figura 33</b> - Análise de componentes principais (PCA) de 12 amostras em triplicata com área sombreada de 95%. ....	61

<b>Figura 34</b> - Rede molecular obtida a partir dos extratos (Controle, HCl, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e KOH) agrupados pelo software Cytoscape 3.10.2, destacando as principais anotações obtidas a partir da biblioteca GNPS.....	62
<b>Figura 35</b> - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento com HCl (Preto). .....	63
<b>Figura 36</b> - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento <i>com</i> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Preto). .....	64
<b>Figura 37</b> - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento com KOH (Preto). .....	64
<b>Figura 38</b> - Principais estruturas químicas identificadas na biblioteca NIST observadas nos cromatogramas com variação no tempo de retenção entre 6,90 a 9,0 minutos. ....	65
<b>Figura 39</b> - Morfologia do crescimento de <i>Talaromyces fuscoviridis</i> em placa de Petri e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio com lente de 40x. ....	75
<b>Figura 40</b> - Dendrograma baseado na distância genética, utilizando o método neighbor-joining, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região β-Tub da amostra microbiana e as sequências de cepas de microrganismos relacionados presentes nos bancos de dados Mycobank (CBS Knaw, atualmente Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e GenBank.....	76
<b>Figura 41</b> - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês.....	77
<b>Figura 42</b> - Taxa de crescimento médio do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i> em teste controle e em teste de toxicidade com diferentes concentrações de Mn <sup>2+</sup> e a variação de pH nos dias de experimento.....	77
<b>Figura 43</b> - Rede molecular obtida a partir do extrato fúngico de <i>Talaromyces fuscoviridis</i> , agrupada pelo software Cytoscape 3.10.2, com destaque para as principais anotações. O agrupamento de esteroides está destacado em vermelho. ....	79
<b>Figura 44</b> - Agrupamento de esteroides anotados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i> . Os nós em vermelho indicam o branco do solvente, os nós em azul indicam o (controle) e os nós em verde indicam o experimento associado ao fungo com o cátion manganês, destacando os esteroides isolados. ....	80
<b>Figura 45</b> - Espectro de massas do esteroide 1a (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI). ....	82
<b>Figura 46</b> - Espectro de massas do esteroide 2a (espectro de HRMS com fonte de ionização	

ESI). .....	82
<b>Figura 47</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do esteroide 1a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	83
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do esteroide 1a (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	84
<b>Figura 49</b> - Espectro de RMN DEPT-135 do esteroide 1a ( $\text{CDCl}_3$ ). .....	84
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN HMBC do esteroide 1a ( $\text{CDCl}_3$ ).....	85
<b>Figura 51</b> - Espectro de RMN HSQC do esteroide 1a ( $\text{CDCl}_3$ ).....	86
<b>Figura 52</b> - Espectro de RMN COSY do esteroide 1a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	86
<b>Figura 53</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do esteroide 2a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	87
<b>Figura 54</b> - Estrutura química e absorção no ultravioleta dos esteroides 1a e 2a. ....	88
<b>Figura 55</b> - Estrutura química e espectro de RMN de $^1\text{H}$ do esteroide 2a. ....	88
<b>Figura 56</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do esteroide 2a (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	89
<b>Figura 57</b> - Ilustração do tipo ORTEP da unidade assimétrica do esteroide 2a. Elipses térmicas representadas com 50% de probabilidade.....	89
<b>Figura 58</b> - Cadeia unidimensional formada pelo esteroide 2a com as interações intermoleculares $\text{O1-H1}\cdots\text{O1}'$ , visualizada no quadrante. ....	92
<b>Figura 59</b> - Gráfico de escores da PCA e loadings dos componentes principais PC1 e PC2, utilizando dados cromatográficos processados juntamente com os dados de cultivo do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i> em meio de cultura com e sem manganês. ....	93
<b>Figura 60</b> - Gráfico de abundância relativa dos esteroides isolados do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i> em meio de cultura com e sem manganês.....	94
<b>Figura 61</b> - Cromatograma de DPPH a 0,075 mM, obtido em modo de eluição isocrática com 70% de acetonitrila e 30% de água. ....	96
<b>Figura 62</b> - Potencial antioxidante dos esteróides 1a e 2a e do padrão $\beta$ -caroteno contra os radicais livres DPPH com 95% de sensibilidade. As concentrações utilizadas dos compostos foram: A) 2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , B) 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , C) 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , D) 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , E) 0,125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , F) 0,0625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . ....	97
<b>Figura 63</b> - Morfologia do crescimento em placa de Petri (frontal e posterior) do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i> e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio	

com lente de 40x. ....	107
<b>Figura 64</b> - Dendrograma baseado na distância genética, utilizando o método Neighbor-Joining, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região $\beta$ -Tub da amostra DRM e as sequências de cepas de microrganismos relacionados presentes nos bancos de dados Mycobank (CBS Knaw, atualmente Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e GenBank. ....	108
<b>Figura 65</b> - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês. ....	109
<b>Figura 66</b> - Taxa de crescimento médio do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i> em teste controle e em teste de toxicidade com diferentes concentrações de $Mn^{2+}$ e a variação de pH nos dias de experimento. ....	109
<b>Figura 67</b> – Cromatogramas nas concentrações de 0 mM e 125 mM dos compostos isolados. ....	111
<b>Figura 68</b> - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 1. ....	112
<b>Figura 69</b> – Espectro de RMN $^1H$ $CD_3OD$ , 400 MHz do composto 1. ....	114
<b>Figura 70</b> - Espectro de RMN $^{13}C$ $CD_3OD$ , 100 MHz do composto 1. ....	115
<b>Figura 71</b> – Espectro de RMN HSQC $CD_3OD$ , do composto 1. ....	116
<b>Figura 72</b> – Espectro de RMN HMBC $CD_3OD$ , do composto 1. ....	117
<b>Figura 73</b> – Espectro de RMN COSY $CD_3OD$ , do composto 1. ....	118
<b>Figura 74</b> - Espectro de massas do composto 1 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto. ....	120
<b>Figura 75</b> - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 2. ....	121
<b>Figura 76</b> – Espectro de RMN $^1H$ $CD_3OD$ , 400 MHz do composto 2. ....	123
<b>Figura 77</b> – Espectro de RMN $^{13}C$ $CD_3OD$ , 100 MHz do composto 2. ....	124
<b>Figura 78</b> – Espectro de RMN HSQC $CD_3OD$ , do composto 2. ....	125
<b>Figura 79</b> – Espectro de RMN HMBC $CD_3OD$ , do composto 2. ....	126
<b>Figura 80</b> - Espectro de massas do composto 2 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto. ....	128
<b>Figura 81</b> - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 3. ....	129

<b>Figura 82</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz do composto 3. ....	131
<b>Figura 83</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz do composto 3. ....	132
<b>Figura 84</b> – Espectro de RMN HSQC $\text{CD}_3\text{OD}$ , do composto 3. ....	133
<b>Figura 85</b> – Espectro de RMN HMBC $\text{CD}_3\text{OD}$ , do composto 3. ....	134
<b>Figura 86</b> – Espectro de RMN COSY $\text{CD}_3\text{OD}$ , do composto 3. ....	135
<b>Figura 87</b> - Espectro de massas do composto 3 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto. ....	137
<b>Figura 88</b> - Esquema biossintetico proposto para os compostos penicilida e purpactina A. ....	139
<b>Figura 89</b> - Agrupamento de depsidonas lactônicas isoladas (setas vermelhas) e anotadas (setas pretas) na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i> . Os nós em rosa indicam o controle experimental e os nós em azul indicam o experimento associado ao cátion manganês. ....	142
<b>Figura 90</b> - Espectro de mirror do composto 1. ....	143
<b>Figura 91</b> - Cromatograma dos compostos isolados. ....	144
<b>Figura 92</b> - Compostos isolados que foram quantificados nos meios de cultivo czapek e arroz com e sem o indutor de manganês. ....	146

## Resumo

### INFLUÊNCIA DO CÁTION MANGANÊS-II COMO AGENTE ABIÓTICO NO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS EXTREMÓFILOS DO GÊNERO *Talaromyces*.

Este trabalho investigou o impacto do cátion manganês-II como indutor abiótico na modulação do metabolismo secundário de fungos extremófilos do gênero *Talaromyces*, com foco na produção de compostos bioativos com potencial antioxidante. Foram conduzidos três modelos experimentais utilizando as espécies *Talaromyces sp.*, *Talaromyces fuscoviridis* e *Talaromyces aureolinus*, cultivadas em meios modificados contendo diferentes concentrações de  $Mn^{2+}$ , com o objetivo de ativar vias biossintéticas latentes e promover a geração de metabólitos secundários inéditos ou pouco explorados. No Capítulo 1, avaliou-se o efeito de concentrações crescentes de manganês (0 a 1000 mM) sobre o perfil metabólico de *Talaromyces sp.*, com destaque para alterações significativas em policetídeos envolvidos na rota mista de formação dos meroterpenoides. Foram isolados e caracterizados sete compostos por RMN e HRMS, incluindo fenóis e ácidos hidroxibenzoicos. Análises multivariadas (PCA e dendrograma) revelaram que concentrações intermediárias (125 e 250 mM) induziram mudanças distintas no perfil químico, sugerindo perturbação na biossíntese de metabólitos específicos. No capítulo 2, os extratos foram submetidos a triagem antioxidante utilizando um método adaptado de análise por DPPH-UPLC. A adição de  $Mn^{2+}$  aumentou a atividade antioxidante de frações específicas, correlacionando o estresse oxidativo à maior produção de compostos fenólicos e aromáticos. A análise por GC-MS permitiu anotar substâncias ausentes nos extratos controle. No Capítulo 3, o estudo concentrou-se no fungo *Talaromyces fuscoviridis*, isolado de solo contaminado por rejeito de mina de cobre. A produção de esteroides poliênicos foi estimulada pelo cultivo em arroz suplementado com  $Mn^{2+}$ , resultando no isolamento de dois compostos majoritários: Ergosta-3(4),7,14,22-tetraeno (1a), inédito na literatura, e Ergosta-5,7,14,22-tetraeno-3 $\beta$ -ol (2a), com estruturas confirmadas por RMN 1D/2D, HRMS e difração de raios X. Ambos apresentaram atividade antioxidante superior a 80% em comparação ao  $\beta$ -caroteno em baixas concentrações. A análise por PCA evidenciou clara separação entre as amostras com e sem  $Mn^{2+}$ , confirmando o papel indutor do cátion na biossíntese esteroidal. Por fim, no Capítulo 4, foram isoladas e quantificadas três depsidonas lactônicas produzidas pelo fungo *Talaromyces aureolinus* cultivado em meio czapek e arroz suplementado com manganês: composto 1 (11-hidroxi-3-(1-hidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-9-metil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona), composto 2 (7-hidroxi-4,11-dimetoxi-3-vinil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona) e composto 3 (1,6-di-hidroxi-8-metil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepina-11-ona). A quantificação por UPLC-MS indicou que o  $Mn^{2+}$  favoreceu a produção dos três compostos isolados, sugerindo efeito seletivo sobre a via biossintética das lactonas. A integração de dados espectroscópicos e redes moleculares (GNPS) evidenciou alterações no perfil químico global, com agrupamentos distintos entre os tratamentos com e sem  $Mn^{2+}$ . Os resultados demonstram que o manganês atua como modulador eficaz da expressão metabólica em fungos extremófilos, favorecendo a produção de metabólitos com potencial biotecnológico. A pesquisa contribui para o entendimento da resposta adaptativa desses organismos ao estresse metálico e oferece subsídios para a exploração racional da biodiversidade microbiana como fonte de novos compostos bioativos.

**Palavras chaves:** *fungos extremófilos, Talaromyces sp., Talaromyces fuscoviridis, Talaromyces aureolinus, compostos bioativos.*

## Abstract

### INFLUENCE OF THE CATION MANGANESE-II AS AN ABIOTIC AGENT ON THE SECONDARY METABOLISM OF EXTREMOPHILIC FUNGI OF THE GENUS *Talaromyces*.

This study investigated the impact of the manganese-(II) cation as an abiotic inducer in modulating the secondary metabolism of extremophilic fungi of the genus *Talaromyces*, with a focus on the production of bioactive compounds with antioxidant potential. Three experimental models were conducted using the species *Talaromyces* sp., *Talaromyces fuscoviridis*, and *Talaromyces aureolinus*, cultivated in modified media containing different concentrations of  $Mn^{2+}$ , aiming to activate latent biosynthetic pathways and promote the generation of novel or poorly explored secondary metabolites. In Chapter 1, the effect of increasing manganese concentrations (0 to 1000 mM) on the metabolic profile of *Talaromyces* sp. was evaluated, with emphasis on significant alterations in polyketides involved in the mixed pathway of meroterpenoid biosynthesis. Seven compounds were isolated and characterized by NMR and HRMS, including phenols and hydroxybenzoic acids. Multivariate analyses (PCA and dendrogram) revealed that intermediate concentrations (125 and 250 mM) induced distinct changes in the chemical profile, suggesting disruption in the biosynthesis of specific metabolites. In Chapter 2, the extracts were subjected to antioxidant screening using an adapted DPPH-UPLC assay. The addition of  $Mn^{2+}$  enhanced the antioxidant activity of specific fractions, correlating oxidative stress with the increased production of phenolic and aromatic compounds. GC-MS analysis allowed the annotation of substances absent in the control extracts. In Chapter 3, the study focused on the fungus *Talaromyces fuscoviridis*, isolated from soil contaminated by copper mine tailings. The production of polyene steroids was stimulated by cultivation in rice supplemented with  $Mn^{2+}$ , resulting in the isolation of two major compounds: Ergosta-3(4),7,14,22-tetraene (1a), unprecedented in the literature, and Ergosta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol (2a), with structures confirmed by 1D/2D NMR, HRMS, and X-ray diffraction. Both exhibited antioxidant activity greater than 80% compared to  $\beta$ -carotene at low concentrations. PCA analysis showed clear separation between samples with and without  $Mn^{2+}$ , confirming the inducing role of the cation in steroidal biosynthesis. Finally, in Chapter 4, three lactone depsidones were isolated and quantified from *Talaromyces aureolinus* grown in Czapek medium and rice supplemented with manganese: compound 1 (11-hydroxy-3-(1-hydroxy-3-methylbutyl)-4-methoxy-9-methyl-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocin-5-one), compound 2 (7-hydroxy-4,11-dimethoxy-3-vinyl-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocin-5-one), and compound 3 (1,6-dihydroxy-8-methyl-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one). Quantification by UPLC-MS indicated that  $Mn^{2+}$  favored the production of all three isolated compounds, suggesting a selective effect on the lactone biosynthetic pathway. The integration of spectroscopic data and molecular networking (GNPS) revealed alterations in the global chemical profile, with distinct clustering between treatments with and without  $Mn^{2+}$ . The results demonstrate that manganese acts as an effective modulator of metabolic expression in extremophilic fungi, favoring the production of metabolites with biotechnological potential. This research contributes to the understanding of the adaptive response of these organisms to metal-induced stress and provides a basis for the rational exploration of microbial biodiversity as a source of novel bioactive compounds.

**Keywords:** *extremophilic fungi, Talaromyces* sp., *Talaromyces fuscoviridis*, *Talaromyces aureolinus*, *bioactive compounds*.

## Sumário

1. Introdução	1
1.1. Importância dos fungos e seus metabólitos secundários	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1. Biotecnologia na ampliação das pesquisas com micro-organismos: o papel dos fungos na descoberta de novas aplicações	4
3.2. Fungos de ambientes extremos: adaptações, potencial biotecnológico e aplicações industriais	7
3.3. A quimiodiversidade dos fungos do gênero <i>Talaromyces</i>	11
3.4. Influência dos cátions metálicos na fisiologia fúngica	15
4. <b>Capítulo 1 – Manganês como causa de perturbação da biossíntese de policetídeos em <i>Talaromyces</i> sp.</b>	18
4.1. Introdução	18
4.2. Procedimentos experimentais gerais	19
4.3. Isolamento do fungo <i>Talaromyces</i> sp.	20
4.4. Crescimento do micro-organismo, extração e análise	21
4.5. Cultivo em larga escala	22
4.6. Construção das redes moleculares	23
4.7. Resultados e discussões	24
4.7.1. Identificação do fungo <i>Talaromyces</i> sp.	24
4.7.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês	25
4.7.3. Avaliação do perfil químico e identificação dos compostos isolados	27
4.7.4. Análise geral dos dados: análise de componentes principais do fungo <i>Talaromyces</i> sp	38
4.7.5. Abordagem dos metabólitos produzidos pelo fungo <i>Talaromyces</i> sp. por redes moleculares	42
4.8. Conclusões	47
5. <b>Capítulo 2 – O impacto do Mn<sup>2+</sup> na atividade antioxidante dos metabólitos produzidos por <i>Talaromyces</i> sp. avaliado por um método adaptado de DPPH-UPLC e análise por GC-MS</b>	48
5.1. Introdução	48
5.2. Procedimentos experimentais gerais	49
5.3. Isolamento do micro-organismo	51
5.4. Crescimento do micro-organismo, adição de Mn <sup>2+</sup> cultivo e extração	51
5.5. Construção da rede molecular	52
5.6. Capacidade de avaliação dos radicais livres (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila - DPPH) por UPLC-DAD	53
5.7. Teste de atividade dos radicais livres (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila – DPPH)	54
5.8. Resultados e discussões	54
5.8.1. Efeito do cátion manganês no crescimento do fungo <i>Talaromyces</i> sp.	54
5.8.2. Avaliação de um método cromatográfico para análise dos radicais livres de DPPH por UPLC	55
5.8.3. Avaliação das áreas dos picos do par DPPH/DPPH-H e cálculo da atividade antioxidante	57
5.8.4. Classificação qualitativa do modo de extração dos extratos fúngicos	60
5.8.5. Avaliação das redes moleculares dos extratos fúngicos com e sem a adição do cátion	

manganês	61
5.8.6. Avaliação das redes moleculares dos extratos fúngicos com e sem a adição do cátion manganês	63
5.9. Conclusões	66
<b>6. Capítulo 3 – Esteróides poliênicos do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i> derivado de solo de mina de cobre: estruturas, aumento da produção e atividade antioxidante</b>	<b>67</b>
6.1. Introdução	67
6.2. Procedimentos experimentais gerais	68
6.3. Isolamento do micro-organismo	69
6.4. Identificação do micro-organismo	69
6.5. Produção dos extratos e fracionamento	70
6.6. Análise dos extratos fúngicos por UHPLC-MS/MS	71
6.7. Cultivo do fungo na presença de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	72
6.8. Análise GC/MS	73
6.9. Difração de raios X por cristal único	73
6.10. Ensaio do potencial antioxidante contra 2,2 Difenil-1-Picrilhidrazila (DPPH)	74
6.11. Resultados e discussões	74
6.11.1. Identificação do fungo <i>Talaromyces fuscoviridis</i>	74
6.11.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês	76
6.11.3. Perfil de metabólitos de <i>Talaromyces fuscoviridis</i>	78
6.11.4. Isolamento dos compostos e análise estrutural	82
6.11.5. Análise cristalográfica por raios X do esteroide 2a	89
6.11.6. Influência do cátion manganês na produção de esteroides poliênicos	93
6.11.7. Avaliação do método cromatográfico e do potencial antioxidante dos compostos isolados	95
6.12. Conclusões	98
<b>7. Capítulo 4 – Avaliação química e quantificação de depsidonas isoladas do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i> em meio czapek e arroz modificado com manganês</b>	<b>100</b>
7.1. Introdução	100
7.2. Procedimentos experimentais gerais	101
7.3. Isolamento do micro-organismo	102
7.4. Identificação do micro-organismo	102
7.5. Produção dos extratos e fracionamento	103
7.6. Análise dos extratos fúngicos por UHPLC-MS/MS	104
7.7. Construção da rede molecular	105
7.8. Análise UPLC/MS via modo de aquisição MRM para quantificação dos compostos isolados	105
7.9. Resultado e discussões	106
7.9.1. Identificação do fungo <i>Talaromyces aureolinus</i>	106
7.9.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês	108
7.9.3. Análise estrutural dos compostos isolados	111
7.9.4. Análise estrutural do composto 1: 11-hidroxi-3-(1-hidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-9-metil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona	112
7.9.5. Análise estrutural do composto 2: 7-hidroxi-4,11-dimetoxi-3-vinil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona	121
7.9.6. Análise estrutural do composto 3: 1,6-di-hidroxi-8-metil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepina-11-ona	129
7.9.7. Biossíntese das penicilideas lactônicas	138
7.9.8. Abordagem de redes moleculares	140

7.9.9. Quantificação dos compostos isolados	144
7.10. Conclusões	147
8. Referências	149

# 1. Introdução

---

## 1.1. Importância dos fungos e seus metabólitos secundários

Os fungos extremófilos, particularmente aqueles pertencentes ao gênero *Talaromyces*, têm se destacado como organismos de grande interesse biotecnológico devido à sua notável capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, como altas concentrações de metais pesados, temperaturas reduzidas e baixa disponibilidade de nutrientes (BILLS & GLOER, 2016; SHI et al., 2024; YOUSSEF & SINGAB, 2021). Essa resiliência fisiológica está associada a um metabolismo secundário altamente versátil, capaz de gerar uma diversidade de compostos bioativos com aplicações potenciais nos setores farmacêutico, agrícola, ambiental e industrial (LIND et al., 2017; CACHO, TANG & CHOOI, 2014; REEN et al., 2015; KELLER, 2015).

Apesar de sua promissora capacidade biossintética, muitos dos mecanismos moleculares que regulam a produção de metabólitos secundários nesses fungos permanecem pouco compreendidos. Estudos demonstram que fatores abióticos, como variações na disponibilidade de cátions metálicos e a exposição à radiação, podem atuar como gatilhos para a ativação de vias biossintéticas latentes (SAYED et al., 2020; LI et al., 2022). Tais estímulos promovem a não expressão de genes e ampliam a diversidade química dos metabólitos produzidos. No entanto, a compreensão das interações entre estresse ambiental e modulação metabólica ainda é limitada, especialmente em microrganismos provenientes de ambientes extremos (HUI et al., 2021; KISS et al., 2023; RADDADI et al., 2015).

Embora os genomas de muitos fungos revelem a presença de numerosos clusters de genes biossintéticos, a expressão dessa maquinaria depende de condições ambientais específicas (SUETRONG et al., 2023; ZHANG et al., 2023; ZHU et al., 2024; CHAUDHARY et al., 2024; LIND et al., 2017; CACHO, TANG & CHOOI, 2014; REEN et al., 2015; KELLER, 2015). Isso tem levado à redescoberta frequente de compostos já conhecidos, evidenciando a necessidade de estratégias que estimulem a expressão de novas vias metabólicas. Nesse contexto, ambientes naturalmente desafiadores têm se mostrado fontes promissoras de microrganismos capazes de sintetizar metabólitos inéditos, como observado em organismos isolados de vulcões (MARTIRENA-RAMÍREZ et al., 2024; DU et al., 2008), cavernas (RANGSEEKAWEW & PATHOM-AREE, 2019; TAVARES et al., 2018; SUETRONG et al., 2023), desertos e lagos hipersalinos (GEORGIEVA et al., 2023), bem como do oceano profundo (DU et al., 2010).

Com base nessa premissa, foi estabelecido um programa de bioprospecção de fungos extremófilos em regiões brasileiras de relevância ambiental, incluindo áreas mineradas. Em uma dessas expedições, amostras de solo rejeitado de uma mina de cobre no estado do Pará resultaram no isolamento de cepas pertencentes ao gênero *Talaromyces*. Um desses isolados, identificado como *Talaromyces fuscoviridis*, apresentou coloração azulada sugestiva de interação com metais e demonstrou forte atividade antioxidante em frações apolares, comparável ao  $\beta$ -caroteno. A análise química revelou dois esteroides majoritários, sendo um deles inédito na literatura científica (KIMURA, 1980; TATARCZAK-MICHALEWSKA & FLIEGER, 2022; VISAGIE et al., 2015). A pesquisa integrou abordagens metabolômicas e espectrometria de massas de alta resolução para identificar compostos diferencialmente destacados para avaliar sua atividade biológica por meio de bioensaios antioxidantes.

Este trabalho ampliou o conhecimento sobre os mecanismos de adaptação metabólica de fungos extremófilos, contribuindo para a descoberta de novas moléculas bioativas a partir de estratégias inovadoras para otimizar a produção de compostos de interesse biotecnológico, reforçando o valor da biodiversidade microbiana em ambientes extremos como recurso para inovação científica e tecnológica.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do cátion manganês-II como agente abiótico modulador do metabolismo secundário de fungos extremófilos do gênero *Talaromyces* sp, *Talaromyces fuscoviridis* e *Talaromyces aureolinus* com foco na produção, caracterização estrutural, quantificação e atividade antioxidante de metabólitos bioativos, a partir de abordagens integradas de cromatografia, espectrometria de massas, metabolômica e técnicas espectroscópicas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de manganês-II no crescimento micelial e na morfologia dos fungos *Talaromyces* sp., *Talaromyces fuscoviridis* e *Talaromyces aureolinus*, utilizando cultivo em meio Czapek e arroz modificado com manganês-II.

- Analisar a composição química dos extratos obtidos a partir do cultivo com e sem Manganês-II, empregando técnicas de LC-HRMS, GC-MS e espectrometria de massas a partir de dados em DDA via FBMN e redes moleculares (GNPS) para anotação e comparação de perfis metabólicos.

- Isolar, elucidar os compostos majoritários, empregando técnicas como RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , 1D e 2D, espectrometria de massas de alta resolução e difração de raios X.

- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos isolados, comparando sua eficácia com padrões conhecidos como o  $\beta$ -caroteno, utilizando o ensaio de DPPH acoplado a UPLC-DAD.

- Realizar estudos de quantificação dos metabólitos bioativos identificados em extratos cultivados em diferentes condições (czapek e arroz modificado com Manganês-II).

- Utilizar ferramentas como PCA e dendograma para diferenciar os perfis metabólicos de acordo com o tratamento com  $\text{Mn}^{2+}$ , buscando biomarcadores diferenciais relacionados à presença do cátion metálico.

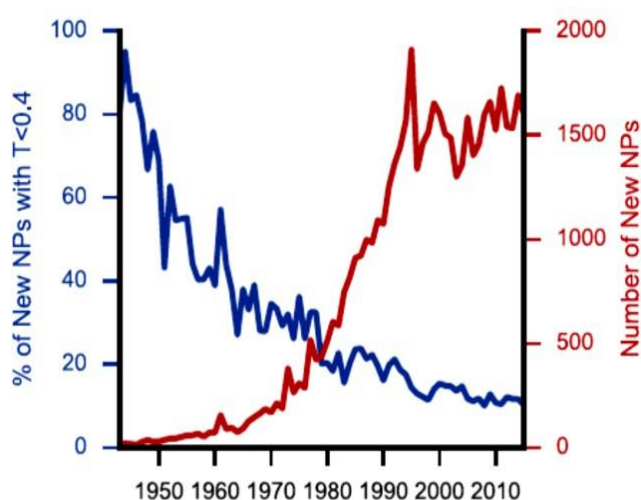
- Correlacionar os efeitos do manganês-II na indução de vias metabólicas específicas, afim de compreender os mecanismos moleculares de adaptação de fungos extremófilos e sua aplicação em estratégias de ativação de biossíntese de metabólitos secundários.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1. Biotecnologia na ampliação das pesquisas com micro-organismos: o papel dos fungos na descoberta de novas aplicações

Os fungos compõem um dos grupos microbianos mais versáteis e promissores no contexto biotecnológico. Essa relevância decorre de sua impressionante capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários bioativos, enzimas industriais e outras biomoléculas com propriedades inovadoras (MOORE & NEWMAN, 2025). Fungos filamentosos, em especial, destacam-se como produtores desses compostos em virtude da complexidade de seus genomas e da vasta diversidade biológica estimada em mais de 5 milhões de espécies (O'BRIEN et al., 2005). Em comparação às bactérias, os genomas fúngicos são maiores e abrigam agrupamentos gênicos mais abundantes e diversificados, responsáveis pela biossíntese de produtos naturais muitos dos quais ainda não foram acessados, pois permanecem de forma não expressa em condições-padrão de cultivo (KATZ & BALTZ, 2016; LV et al., 2023; ZHANG et al., 2023).

Essa riqueza metabólica tem impulsionado o uso de fungos em diversos setores: saúde humana, agricultura, biotecnologia industrial e ambiental. Entretanto, o reisolamento frequente de compostos já conhecidos ainda constitui um obstáculo importante à descoberta de novas moléculas bioativas. Um estudo de PYE et al. (2017) mostra que, apesar de se manter em torno de 1 500 o número de novos produtos naturais identificados anualmente, houve uma acentuada queda na descoberta de estruturas inéditas desde a década de 1940 (Figura 1).

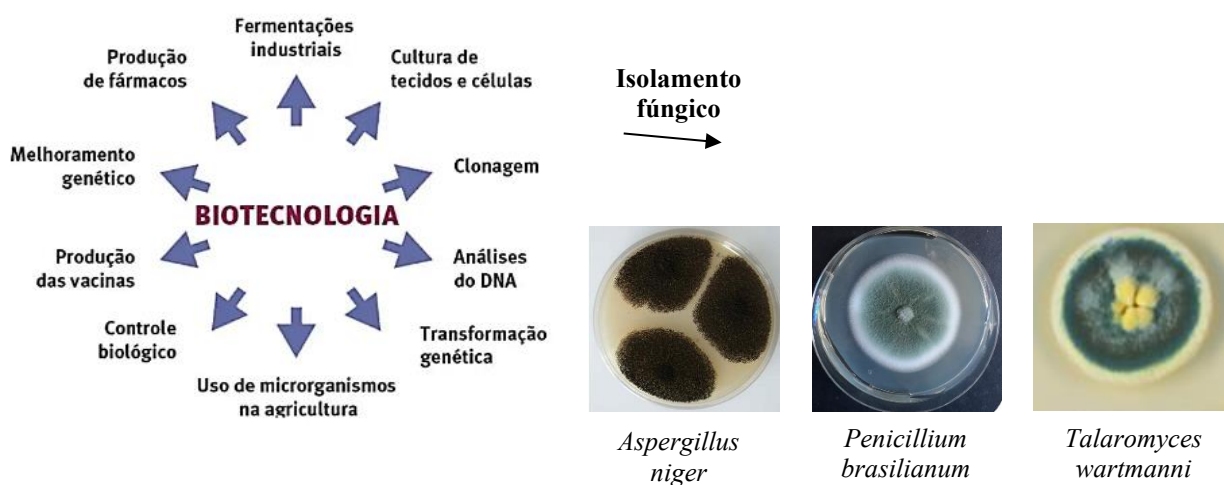


**Figura 1** - Número anual de compostos naturais publicados e proporção percentual de estruturas inéditas em relação ao total de substâncias isoladas no período.

**Fonte** - Adaptado de PYE et al. (2017).

Para lidar com essa limitação, abordagens como a desrepliação proposta nos anos 1990 por CONSTANT & BEECHER vêm sendo amplamente aplicadas. Esse processo visa eliminar rapidamente compostos já descritos nas etapas iniciais e triagem de extratos, otimizando tempo e recursos durante a prospecção.

A revolução das abordagens ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), aliada ao avanço em ferramentas de bioinformática, engenharia metabólica e técnicas modernas de cultivo e isolamento, tem permitido não só o acesso a espécies antes negligenciadas, mas também a ativação de clusters biossintéticos não expressos (Figura 2) (HORAI et al., 2010; WANG et al., 2016; ALONSO, MARSAL & JULIÀ, 2015; YI et al., 2016; COBLE & FRAGA, 2014; RUTTKIES et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2024). Além disso, tecnologias como CRISPR-Cas9 vêm transformando a engenharia genética fúngica, possibilitando a edição precisa de vias metabólicas e ampliando a produção de compostos de interesse farmacêutico ou industrial (AMAGATA et al., 2007; CHEN et al., 2015; COY & NIETO, 2009; NIETO & ÁVILA, [s.d.]; HAGEMANN et al., 2008; SANTALOVA et al., 2004; ZHANG et al., 2020; SHAO et al., 2010; MCLAFFERTY, 1981).



**Figura 2** - Aplicação biotecnológica de diferentes fungos.

**Fonte** - Adaptado de Abdulzahra B. et al. (2021), Akiyama D. et al. (2022), Medeiros L. et al. (2015).

Entre os metabólitos bioativos produzidos por fungos, destacam-se antibióticos (como a penicilina, de *Penicillium* spp.), imunossupressores (como a ciclosporina, de *Tolypocladium inflatum*), estatinas por *Aspergillus* spp., antifúngicos como a echinocandina, de *Glarea lozoyensis*, e compostos antioxidantes, antifúngicos e anti-inflamatórios produzidos pelos fungos do gênero *Talaromyces* (AMAGATA et al., 2007; COY & NIETO, 2009;

RIVERA et al., [s.d.]; NIETO & ÁVILA, [s.d.]; HAGEMANN et al., 2008; SANTALOVA et al., 2004; ZHANG et al., 2020; SHAO et al., 2010). Esses exemplos ilustram o impacto transformador da biotecnologia fúngica na medicina moderna. A combinação da metabolômica com espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear tem sido determinante na caracterização estrutural de novos compostos e na triagem de candidatos promissores ao desenvolvimento de fármacos (WANG et al., 2016; RUTTKIES et al., 2016; HORAI et al., 2010; COBLE & FRAGA, 2014; MCLAFFERTY, 1981; ZHU et al., 2024; CHAUDHARY et al., 2024).

O potencial dos fungos vai além da farmacologia. Na indústria, eles são amplamente utilizados para a produção de enzimas como celulases, amilases, proteases e lipases, aplicadas nas indústrias de biocombustíveis, alimentos, papel e têxtil. Fungos também são explorados na síntese de ácidos orgânicos (como ácido cítrico e ácido lático), biopolímeros e biossurfactantes como alternativas renováveis e ecologicamente sustentáveis aos derivados petroquímicos (PITT, 2014; EL-NAGGAR et al., 2015).

A diversidade funcional dos fungos se estende à biorremediação. Espécies ligninolíticas produzem enzimas como lacases, monooxigenases e peroxidases capazes de degradar compostos orgânicos recalcitrantes, incluindo pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Também têm se mostrado eficazes na recuperação de metais pesados por biossorção e bioprecipitação, contribuindo para o tratamento de efluentes contaminados de maneira ambientalmente segura (PÉREZ SILVA et al., 2008; DAS, VIMALA & KARTHIKA, 2008; MENDIL, TUZEN & SOYLAK, 2008; KHALILNEZHAD et al., 2014; PARVATHI, NARESHKUMAR & NAGENDRAN, 2007; HASAN et al., 2010; HASAN et al., 2012; GEORGIEVA et al., 2023).

Outro campo emergente e promissor é o estudo de fungos extremófilos e endofíticos. Adaptados a ambientes extremos como salinidade elevada, temperaturas severas, pH extremos ou alta radiação, esses microrganismos têm revelado metabólitos com propriedades antibióticas, anticancerígenas e antioxidantes ainda não descritas, ampliando as fronteiras da bioprospecção. Os fungos endofíticos, por sua vez, vêm sendo estudados por seu papel benéfico em simbiose com plantas, promovendo o crescimento vegetal, aumentando a resistência ao estresse e contribuindo para o controle biológico de patógenos. Tais características têm impulsionado o desenvolvimento de biofertilizantes e biopesticidas que reduzem a dependência de agroquímicos tradicionais (JÚNIOR et al., 2002; ZIEMBIŃSKA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007; COUTINHO et al., 1999; YERSHOV et al., 1996; SMALL et al., 2001; SUETRONG et al., 2023).

Apesar dos avanços, desafios persistem. A dificuldade de cultivo de espécies não-modelares, os entraves regulatórios para novos produtos bioativos e a necessidade de escalonamento econômico viável continuam a limitar o aproveitamento total do potencial fúngico (COUTINHO et al., 1999; JÚNIOR et al., 2002; YERSHOV et al., 1996; SMALL et al., 2001). No entanto, ferramentas como o sequenciamento de nova geração (NGS), a inteligência artificial aplicada à análise de dados biológicos e a modelagem *in silico* de vias biossintéticas têm oferecido soluções promissoras, conduzindo a abordagens mais precisas e eficientes (ZIEMBIŃSKA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007).

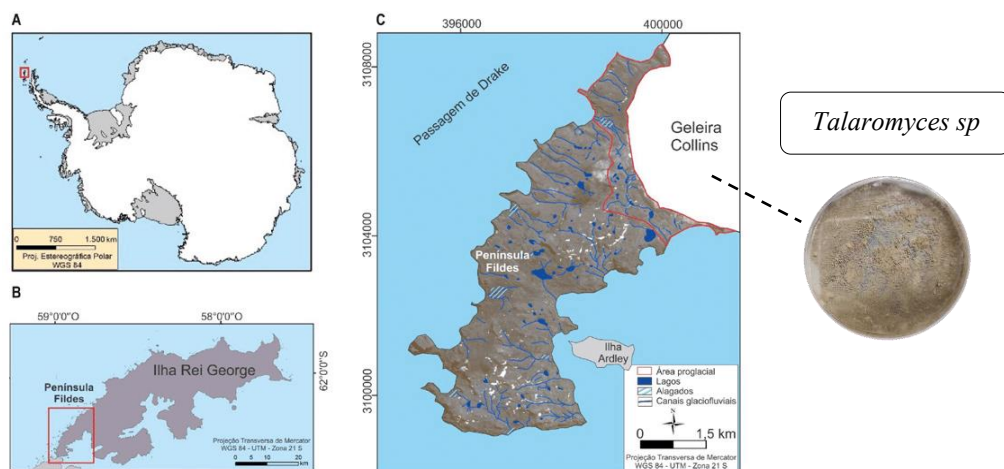
No cenário futuro, espera-se que a integração entre biotecnologia sintética, biologia computacional, metabolômica avançada e engenharia de processos permita o desenvolvimento de cepas fúngicas otimizadas para aplicações específicas. Essa convergência de tecnologias deverá acelerar a descoberta de biomoléculas inovadoras e consolidar a biotecnologia fúngica como pilar estratégico para a bioeconomia global e a sustentabilidade industrial.

A biotecnologia aplicada aos fungos não apenas amplia o conhecimento sobre a diversidade metabólica desses microrganismos, mas também abre novas possibilidades para o desenvolvimento de produtos inovadores e sustentáveis. O aprofundamento das pesquisas nessa área exige uma abordagem multidisciplinar, combinando técnicas avançadas de biologia molecular, química analítica, bioinformática e engenharia de processos, de forma a maximizar o potencial biotecnológico dos fungos e suas contribuições para a ciência e a indústria.

### **3.2. Fungos de ambientes extremos: adaptações, potencial biotecnológico e aplicações industriais**

Em meio aos desafios impostos pelos ambientes mais inóspitos da Terra, algumas formas de vida conseguem não apenas sobreviver, mas prosperar. É o caso dos fungos extremófilos que são organismos capazes de se desenvolver em condições consideradas letais para a maioria dos seres vivos. Sejam temperaturas elevadas, ambientes com frios intensos, alta salinidade, elevada radiação, índice de pH extremo ou escassez de nutrientes. Esses microrganismos demonstram uma notável adaptação fisiológica e bioquímica que os torna fontes promissoras de inovação científica e tecnológica (MERINO et al., 2019). Os fungos extremófilos chamam a atenção não apenas pela resistência natural que apresentam, mas também por seu potencial para gerar diferentes enzimas, metabólitos bioativos e outras biomoléculas de interesse biotecnológico. As adaptações que lhes conferem essa resistência envolvem modificações estruturais e funcionais em nível celular e molecular, fruto de uma

longa evolução sob pressões ambientais intensas (ALAZARD et al., 2003; BAKER & BANFIELD, 2003; AISLABIE & MCLEOD, 2006; BAKER-AUSTIN & DOPSON, 2007; WADSWORTH & COCKELL, 2017; PULSCHEN et al., 2018; ALTAIR et al., 2018; MERINO et al., 2019). A classificação dos fungos extremófilos está diretamente relacionada ao tipo de estresse ambiental ao qual estão adaptados. Os fungos termofílicos, por exemplo, desenvolvem-se em temperaturas superiores a 45°C e podem ser encontrados em locais como fontes termais, solos vulcânicos e pilhas de compostagem. Gêneros como *Thermomyces* e *Myceliophthora* são conhecidos pela produção de enzimas termoestáveis, altamente valorizadas nas indústrias de biocombustíveis e processamento de biomassa (ALAZARD et al., 2003; BAKER & BANFIELD, 2003; AISLABIE & MCLEOD, 2006; BAKER-AUSTIN & DOPSON, 2007; WADSWORTH & COCKELL, 2017; PULSCHEN et al., 2018; ALTAIR et al., 2018; MERINO et al., 2019). Por outro lado, os psicrofílicos e psicrotófos prosperam em temperaturas abaixo de 15°C, sendo frequentemente isolados de ambientes polares e regiões permanentemente congeladas (Figura 3). Espécies como *Antarctomyces*, *Glaciozyma* e *Talaromyces* produzem proteínas e enzimas que funcionam em baixas temperaturas, com aplicações promissoras na indústria alimentícia e farmacêutica.

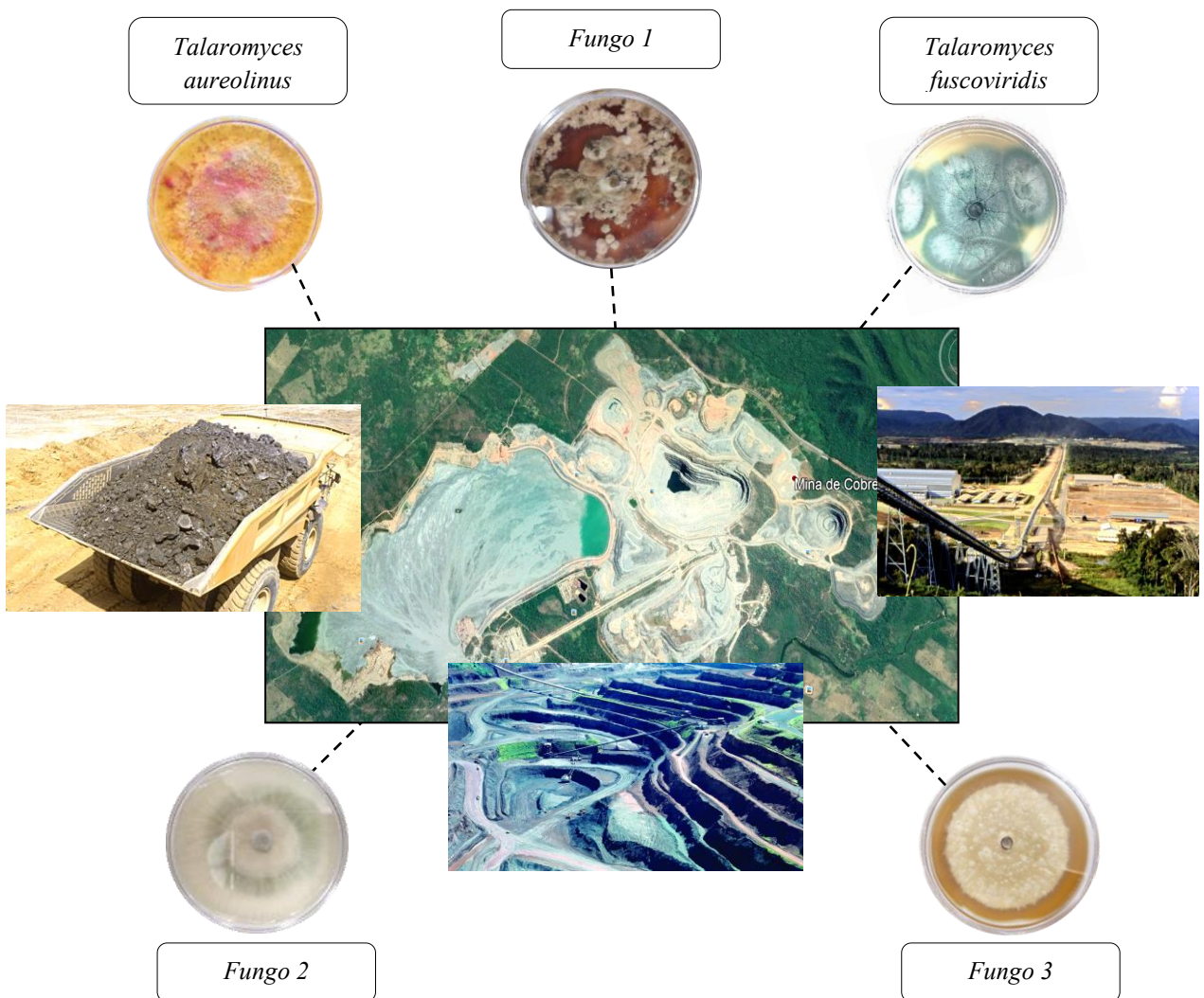


**Figura 3** – Fungo *Talaromyces* sp isolado de ambientes extremo na região polar.

**Fonte** - Adaptado de Petsch C. et al. (2021).

Também se destacam os fungos halotolerantes e halofílicos, que suportam ou necessitam de altas concentrações salinas para crescer. Esses organismos, encontrados em solos contaminados com metais pesados (Figura 4), ambientes salinos, desertos salgados e ambientes marinhos hipersalinos, incluem representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (ALAZARD et al., 2003; BAKER & BANFIELD, 2003; AISLABIE & MCLEOD, 2006; BAKER-AUSTIN & DOPSON, 2007; WADSWORTH & COCKELL, 2017; PULSCHEN et al., 2018; ALTAIR et al., 2018; MERINO et al., 2019).

Em ambientes de pH extremo, surgem os fungos acidófilos e alcalófilos, que se desenvolvem em solos ácidos, resíduos industriais e ambientes alcalinos. Suas enzimas funcionam de forma eficiente sob essas condições adversas, sendo empregadas em produtos de limpeza, na indústria de papel e na biorremediação. Outro grupo fascinante são os fungos radorresistentes, como *Cladosporium* e *Cryptococcus*, que sobrevivem à uma condição de elevada radiação. Esta habilidade é atribuída, em parte, à presença de melanina em suas células, que atua como barreira protetora contra o estresse oxidativo. Essas espécies estão sendo estudadas para aplicações espaciais, como escudos biológicos para astronautas e sistemas de bioconversão em ambientes extraterrestres.



**Figura 4** - Fungos de solos contaminados com metais pesados.

**Fonte** - Adaptado do google imagens sobre a mina do sossego – Canaã dos Carajas.

A capacidade dos fungos extremófilos de lidar com condições tão severas está associada a um conjunto sofisticado de mecanismos adaptativos. Entre eles, destacam-se: alterações na composição da membrana celular, que conferem estabilidade térmica, flexibilidade em baixas temperaturas e resistência à pressão osmótica; síntese de enzimas que mantêm sua atividade em condições que inativariam enzimas convencionais; produção de compostos protetores, como pigmentos, antioxidantes e osmoprotetores que preservam estruturas celulares e evitam danos moleculares; regulação gênica refinada, com ativação de vias de reparo de DNA, expressão de proteínas e controle epigenético em resposta ao ambiente (ALAZARD et al., 2003; BAKER & BANFIELD, 2003; AISLABIE & MCLEOD, 2006; BAKER-AUSTIN & DOPSON, 2007; WADSWORTH & COCKELL, 2017; PULSCHEN et al., 2018; ALTAIR et al., 2018; MERINO et al., 2019).

A biotecnologia moderna tem voltado seus olhos para os fungos extremófilos como fontes de soluções inovadoras em múltiplos setores. Enzimas obtidas desses organismos vêm sendo incorporadas em processos industriais que exigem desempenho sob condições extremas, como fabricação de biocombustíveis, produção de alimentos, limpeza industrial e tratamento de resíduos.

Além disso, muitos fungos extremófilos produzem metabólitos com atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e até antitumoral, representando um grande potencial para a descoberta de novos fármacos. Na área ambiental, sua capacidade de biorremediação de locais contaminados por metais pesados ou solventes tóxicos amplia as perspectivas de uso sustentável da biotecnologia (ALAZARD et al., 2003; BAKER & BANFIELD, 2003; AISLABIE & MCLEOD, 2006; BAKER-AUSTIN & DOPSON, 2007; WADSWORTH & COCKELL, 2017; PULSCHEN et al., 2018; ALTAIR et al., 2018; MERINO et al., 2019; ZHAI et al., 2016).

Dessa forma, os fungos extremófilos surgem não apenas como curiosidades da biologia, mas como protagonistas em um cenário científico que busca respostas inovadoras e sustentáveis para os desafios do século XXI. A união entre conhecimento ecológico, tecnologia de ponta e pensamento interdisciplinar poderá transformar esses organismos singulares em pilares de uma nova era biotecnológica.

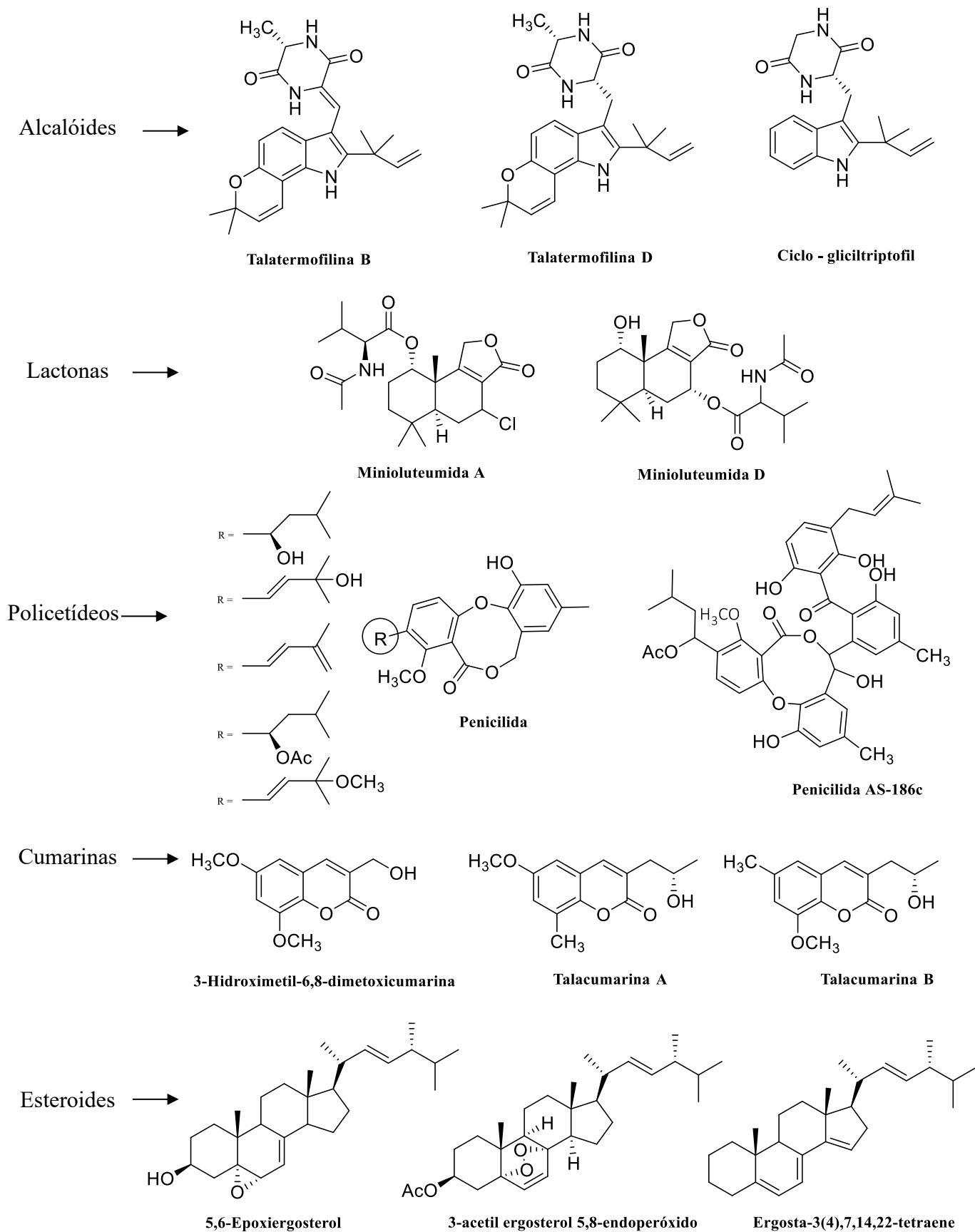
### 3.3. A quimiodiversidade dos fungos do gênero *Talaromyces*

O gênero *Talaromyces* (Trichocomaceae) é amplamente distribuído em diversos habitats, incluindo solo, superfície de plantas e em alimentos. Muitas de suas espécies apresentam notável versatilidade fisiológica, como a resistência ao calor, metais pesados, capacidade de degradação de resíduos orgânicos e produção de enzimas com aplicações industriais. Além de seu uso na produção de alimentos e na agricultura, algumas espécies são investigadas por seu potencial biotecnológico, como no biocontrole de pragas e na produção de compostos com interesse biológico (EL-NAGGAR et al., 2015; PROKSA, 2010).

A quimiodiversidade do gênero *Talaromyces* tem despertado grande interesse na comunidade científica, particularmente no campo dos metabólitos secundários. Estudos mostram que esse gênero apresenta uma rica fonte de compostos bioativos, incluindo alcaloides, policetídeos, terpenóides e esteroides (Figura 5). Essas substâncias apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, como propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes (EL-NAGGAR et al., 2015; PROKSA, 2010).

Algumas espécies, como *Talaromyces pinophilus*, se destacam pela capacidade de degradar resíduos agrícolas, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e a reciclagem de biomassa para utilização em processos de biorremediação. Já *Talaromyces funiculosus* é conhecido por sua presença em alimentos, podendo atuar tanto na biotransformação de substratos quanto na deterioração de produtos alimentícios, levando à podridão da parte central de diferentes frutos. Essa versatilidade funcional é refletida na diversidade química dos metabólitos produzidos por esses fungos (KUML et al., 2014; LIU et al., 2021).

Entre os metabólitos identificados, destacam-se as talatermofilinas, compostos que podem desempenhar um papel essencial na proteção de fungos extremófilos contra o estresse oxidativo induzido por diferentes contaminantes ambientais. Além disso, essas moléculas apresentam atividade nematicida, demonstrando eficácia contra os vermes de vida livre *Panagrellus redivivus* (CHU et al., 2010; GUO et al., 2011; GUO et al., 2012). Outro grupo de metabólitos de interesse são as lactonas sesquiterpênicas minioluteumidas, que exibem atividade citotóxica contra células tumorais hepáticas, sugerindo um potencial terapêutico relevante (ZHAI et al., 2015; NGOKPOL et al., 2015).



**Figura 5** - Exemplos de compostos descritos para espécies do gênero *Talaromyces*.

**Fonte** - Adaptado de Zhai M. M.. et al. (2016)

Adicionalmente, foram identificados diversos esteroides com atividade inibitória sobre a monoamina oxidase, enzima responsável pela degradação de neurotransmissores essenciais para a regulação do equilíbrio fisiológico do sistema nervoso. A inibição dessa enzima pode contribuir para a manutenção dos níveis de neurotransmissores envolvidos em funções neuromoduladoras, além de conferir um efeito antioxidante (DING et al., 2015; NGOKPOL et al., 2015; FUJIMOTO et al., 1988; ELE et al., 2014; LI et al., 2011a; LI et al., 2011b). Outro aspecto notável é a capacidade de várias espécies do gênero *Talaromyces* de produzir pigmentos naturais, como as azafilonas. Essas substâncias possuem aplicações promissoras na indústria de corantes naturais e cosméticos, destacando-se como alternativas sustentáveis aos corantes sintéticos (DING et al., 2015; NGOKPOL et al., 2015; FUJIMOTO et al., 1988; ELE et al., 2014; LI et al., 2011a; LI et al., 2011b).

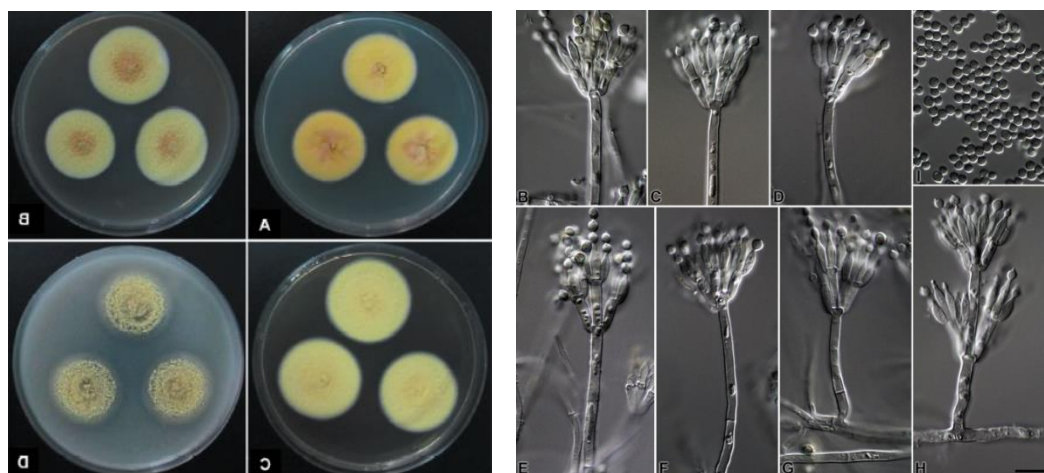
O crescente interesse pela diversidade química dos fungos *Talaromyces* se deve às suas possíveis aplicações na indústria farmacêutica, agroquímica e biotecnológica. Assim, a investigação de suas vias biossintéticas e o desenvolvimento de novas metodologias para a descoberta de compostos bioativos são áreas de estudo promissoras, com potencial para avanços significativos na exploração de metabólitos secundários fúngicos.

Apesar do grande avanço na caracterização química das espécies de *Talaromyces*, muitas ainda permanecem pouco estudadas, indicando um vasto potencial inexplorado. A capacidade dessas espécies de biossintetizar metabólitos únicos, impulsionada por seu maquinário enzimático diversificado, reforça a importância de investigações futuras. O contínuo avanço nas abordagens metabolômicas, aliado ao uso de ferramentas computacionais para análise de biossíntese, torna evidente a necessidade de uma exploração mais profunda da quimiodiversidade dos fungos do gênero *Talaromyces*. Dessa forma, a descoberta de novos metabólitos poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos, agroquímicos e biotecnologias sustentáveis.

Esses fungos são encontrados em uma ampla gama de ambientes, o que reforça sua impressionante capacidade adaptativa. Em solos, por exemplo, espécies como *Talaromyces aureolinus* (Figura 6) e *Talaromyces purpureogenus* habitam áreas ricas em matéria orgânica, desempenhando papel essencial na decomposição da biomassa e na ciclagem de nutrientes, processos fundamentais para a manutenção dos ecossistemas (WEI; XU; WANG, 2021).

Esses fungos do gênero *Talaromyces* apresentam morfologia típica de fungos filamentosos, caracterizada pelo desenvolvimento de hifas septadas que formam micélio vegetativo denso. Em suas estruturas reprodutivas, produzem conídios assexuados, geralmente dispostos em conidióforos ramificados ou simples, e ascósporos sexuados dentro de ascos, que

são frequentemente agrupados em cleistotecios ou estruturas similares a esporângios. Esses organismos podem exibir variações morfológicas dependendo das condições de crescimento, mas a presença de hifas bem definidas e a capacidade de formar tanto conídios quanto ascósporos (WEI; XU; WANG, 2021).



**Figura 6** – Micrografia do fungo *Talaromyces aureolinus*.

**Fonte** - Adaptado de Wei Shangzhu et al. (2021).

Já em ambientes marinhos, algumas linhagens demonstram notável tolerância à salinidade, o que não apenas evidencia sua adaptação fisiológica, mas também desperta o interesse científico por seu potencial como fonte de biomoléculas com propriedades estruturais e bioativas únicas, muitas vezes distintas daquelas produzidas por espécies de ambientes terrestres.

Outro aspecto relevante é a presença de *Talaromyces* como fungos endofíticos. Espécies como *Talaromyces wortmannii* são isoladas de tecidos vegetais, sugerindo uma relação simbiótica com as plantas hospedeiras. Nessa interação, o fungo pode atuar na promoção do crescimento vegetal, além de contribuir para a resistência a estresses bióticos e abióticos, como patógenos e condições ambientais adversas (MACCHERONI et al., 2010; SANTOYO et al., 2016; AZEVEDO et al., 2000; REKHA et al., 2013).

Em habitats considerados extremos, como regiões com altas temperaturas, ambientes contaminados por metais pesados ou substratos com baixa disponibilidade de nutrientes, espécies como *Talaromyces sayulitensis* e *Talaromyces marneffei* se destacam. A capacidade de sobreviver e até prosperar em tais condições adversas revela um metabolismo altamente flexível, capaz de ativar vias bioquímicas específicas para sua sobrevivência — um atributo valioso para aplicações em biotecnologia ambiental e industrial (PONGPOM et al.,

2020; PASRICHA et al., 2016; GÔES et al., 2017).

Essa ampla diversidade ecológica é, portanto, reflexo direto da adaptabilidade e da riqueza metabólica do gênero *Talaromyces*. O estudo aprofundado dessas espécies e de seus ambientes naturais não apenas amplia nosso conhecimento sobre a ecologia microbiana, mas também abre portas para novas descobertas em áreas como bioprospecção de compostos bioativos, produção de enzimas industriais e soluções sustentáveis para os desafios da agricultura e do meio ambiente.

### **3.4. Influência dos cátions metálicos na fisiologia fúngica**

Os cátions metálicos exercem funções centrais na bioquímica e fisiologia dos fungos, atuando como verdadeiros moduladores da atividade celular (GADD, 2010). Elementos como ferro (Fe) e manganês (Mn) não apenas participam de reações metabólicas essenciais, mas também influenciam profundamente a expressão gênica, a estrutura celular e a produção de compostos bioativos (SANTELLI et al., 2010; DAS et al., 2011). A compreensão de como esses metais impactam a vida fúngica tem ganhado relevância à medida que se reconhece seu potencial para aplicação em biotecnologia, especialmente na produção de metabólitos secundários e na adaptação a ambientes extremos (GAVRILESCU, 2004).

Entre esses elementos, o ferro destaca-se como um cofator vital para uma série de processos bioquímicos, incluindo a respiração celular, o metabolismo de radicais livres e a síntese de sideróforos que são moléculas especializadas na captação de ferro em ambientes pobres nesse nutriente (TEBO et al., 2004; TEBO et al., 2005; NEALSON, 2006). Já o manganês, embora tradicionalmente associado a organismos fototróficos, tem demonstrado a capacidade de substituir parcialmente o ferro em diversas funções metabólicas, principalmente em contextos de escassez de ferro ou em ambientes ricos em Mn (BROUWERS et al., 2000; LEARMAN et al., 2011).

O ferro, em suas formas  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , é indispensável para a atividade de citocromos na cadeia transportadora de elétrons, essencial na geração de energia mitocondrial (TEBO et al., 2004). Ele também está envolvido no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (EROs), na síntese de grupos heme e em complexos ferro-enxofre (NEALSON, 2006).

Por sua vez, o manganês, geralmente presente como  $Mn^{2+}$ , ativa diversas enzimas antioxidantes, incluindo uma variante da superóxido dismutase (SOD), participa da fotossíntese em microrganismos e pode atuar em vias bioquímicas semelhantes às do ferro, contribuindo para a resistência celular ao estresse oxidativo (GORBACHEVA et al., 2009; HANSEL et al., 2012).

Essa substituição funcional entre Ferro e o Manganês tem efeitos profundos sobre a fisiologia fúngica, alterando desde a respiração mitocondrial até a produção de compostos secundários, passando por aspectos morfológicos como a estrutura da parede celular (BURGER et al., 2008; SANTELLI et al., 2010).

Quando o manganês substitui o ferro na enzima superóxido dismutase, há uma reconfiguração da resposta antioxidante. Essa mudança pode resultar em uma capacidade aumentada de eliminar EROs, especialmente em fungos adaptados a ambientes oxidantes (HOPE; BOTT, 2004; LEARMAN et al., 2011; SUJITH; BHARATHI, 2011). Em espécies extremófilas, a predominância de Mn-SOD sobre Fe-SOD está frequentemente associada a maior resistência a estresses ambientais.

O ferro é essencial para a função dos citocromos mitocondriais. Em sua ausência, e diante de altas concentrações de manganês, pode haver uma modulação da respiração aeróbica, levando alguns fungos a favorecerem vias fermentativas como rota alternativa para geração de energia (NEALSON; TEBO; ROSSON, 1988; HANSEL et al., 2012).

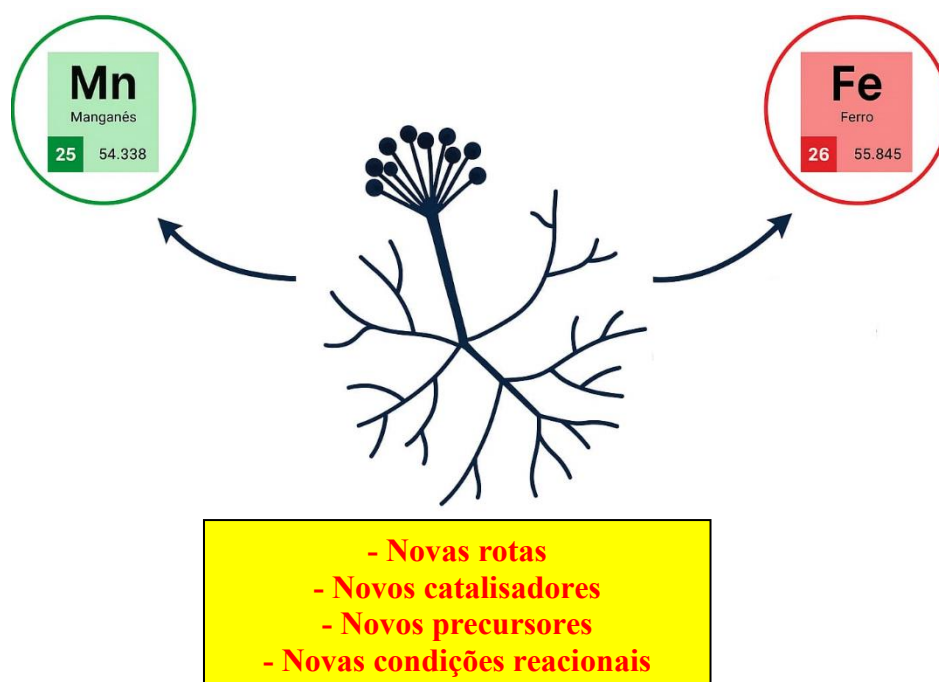
A disponibilidade de ferro e manganês regula diretamente a produção de sideróforos e influencia a síntese de compostos como policetídeos e alcaloides. A presença de manganês, ao alterar esse balanço, pode reprogramar metabolicamente os fungos. Estudos com espécies dos gêneros *Talaromyces* e *Aspergillus* demonstram que a variação nos níveis de Fe e Mn impacta diretamente o perfil de metabólitos produzidos (ZHANG et al., 2002; SANTANA, 2009).

O manganês também pode influenciar a síntese de componentes da parede celular, como glicanos e quitina. Isso pode resultar em alterações estruturais, como o aumento da resistência mecânica ou mudanças na morfologia dos esporos. Em determinadas espécies, observa-se a formação de esporos menores e maior resistência ao estresse osmótico sob condições de baixo ferro e alto manganês (SANTELLI et al., 2010; SAMPAIO et al., 2008).

A manipulação dos níveis de ferro e manganês em culturas fúngicas tem se mostrado uma estratégia eficaz para induzir respostas metabólicas específicas. Dentre as principais aplicações destacam-se: produção direcionada de metabólitos de interesse, como pigmentos naturais, antibióticos, enzimas industriais e compostos bioativos com potencial farmacêutico; biorremediação e biomineração, aproveitando a capacidade adaptativa de fungos a ambientes contaminados com metais pesados, onde o manganês pode compensar a limitação de ferro (BURGOS et al., 2010; DAS et al., 2011; ATSDR, 2000; EPA, 1994); engenharia metabólica, com a introdução ou modulação de vias manganês-dependentes como alternativa a processos bioquímicos ferro-dependentes como 2-OGD e P-450, possibilitando maior robustez

celular em bioprocessos industriais.

A substituição funcional de ferro por manganês em fungos representa uma estratégia adaptativa fascinante, com implicações tanto ecológicas quanto biotecnológicas. O uso de abordagens integradas como metabolômica e espectrometria de massas é fundamental para desvendar as mudanças metabólicas envolvidas, permitindo a identificação de biomarcadores, novas rotas reacionais biossintéticas, novos catalisadores, novos precursores e novas condições reacionais (Figura 7) (EHRlich; NEWMAN, 2009; Moore & Newman, 2025; SUJITH; BHARATHI, 2011).



**Figura 7** - Inserção dos cátions metálicos como fonte de indução e desenvolvimento.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Avanços na engenharia genética e no uso de sistemas multiômicos (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) permitirão a construção de linhagens fúngicas otimizadas para ambientes industriais e extremos. Além disso, técnicas de co-cultivo em que diferentes microrganismos competem por espaço e nutrientes podem ser exploradas para estimular a produção de metabólitos específicos relacionados a interações simbióticas ou inibitórias.

Em resumo, o estudo das interações entre ferro e manganês no metabolismo fúngico abre caminhos promissores para o desenvolvimento de soluções sustentáveis e inovadoras em áreas como biotecnologia ambiental, industrial e farmacêutica. Os fungos, mais uma vez, se mostram aliados valiosos na busca por mecanismos experimentais mais eficientes.

## 4. Capítulo 1 – Manganês como causa de perturbação da biossíntese de policetídeos em *Talaromyces* sp.

---

### 4.1. Introdução

O metabolismo secundário fúngico é um tema-chave nas pesquisas de produtos naturais devido aos profundos impactos positivos ou negativos na saúde humana causados pelas substâncias resultantes desses processos bioquímicos (NEWMAN & CRAGG, 2016). Enquanto muitas substâncias fúngicas podem ser utilizadas no tratamento de doenças humanas, como os compostos azólicos, que são divididos em imidazóis e triazóis. Esses compostos são amplamente empregados no tratamento de diversas enfermidades, incluindo a Doença de Chagas, a redução dos efeitos nefrotóxicos causados por outros compostos, como a anfotericina B, e o tratamento de diferentes tipos de micoses causadas por fungos patogênicos, ou ainda inspirar a síntese e o desenvolvimento de novos fármacos, sendo a atorvastatina um bom exemplo, inspirada nas lovastatinas, elas também podem representar um grave problema de saúde para os animais em geral, quando atuam como micotoxinas, como moniliformina, fumonisinas, deoxinivalenol e seus congêneres, aflatoxinas, entre outras. A maioria dessas toxinas é carcinogênica. Portanto, ao estudar o metabolismo secundário microbiano, os cientistas estão dando grandes contribuições para a saúde e o bem-estar humano (WANG et al., 2018; PINEDO-RIVILLA, ALEU & DURÁN-PATRÓN, 2022; SI et al., 2018).

Os metabólitos secundários microbianos são predominantemente pequenas moléculas bioativas, com massas moleculares variando tipicamente entre 100 e 2000 Da (KELLER, 2019). Eles são classificados em grupos clássicos, como terpenoides, esteroides, alcaloides, policetídeos e também compostos de rotas biossintéticas mistas. Dependendo da taxonomia fúngica, os policetídeos podem ser a principal via metabólica para a produção de metabólitos secundários. Com os avanços das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível prever o potencial de produção de metabólitos secundários para quase qualquer microrganismo, além de caracterizar e compreender a ação do conjunto de enzimas necessárias para a biossíntese de substâncias importantes. Seguindo esses desenvolvimentos, hoje é possível expressão heteróloga para a biossíntese de um determinado metabólito, clonando essas informações genéticas em outro organismo, geralmente uma bactéria ou um fungo.

Apesar dos grandes avanços nessa área, ainda é um grande desafio prever e controlar a expressão da biossíntese de metabólitos secundários microbianos em linhagens selvagens, uma vez que a expressão dos genes biossintéticos depende de muitos fatores de ativação. Isso significa que, mesmo que um microrganismo tenha codificado um grande número

de genes biossintéticos em seu genoma, ele pode não expressá-los ou até nunca expressá-los em condições artificiais de crescimento. De fato, geralmente apenas alguns genes biossintéticos são expressos, resultando em substâncias que provavelmente já foram isoladas diversas vezes de outras espécies. Essas dificuldades podem representar obstáculos para a exploração biotecnológica da biodiversidade microbiana ainda existente no planeta, especialmente em países como o Brasil.

Alguns pesquisadores sugeriram estratégias para superar o reisolamento de substâncias conhecidas a partir de micro-organismos na busca por novos produtos naturais bioativos. O crescimento fúngico e a produção de metabólitos dependem fortemente da composição química do meio de cultivo e de fatores abióticos, como temperatura e luz (ROSA et al., 2019; FILL et al., 2016; BODE et al., 2002). Da mesma forma, interações bióticas com organismos antagonistas também podem induzir a biossíntese codificada em clusters gênicos biossintéticos crípticos. Embora essas estratégias sejam aleatórias, elas têm produzido resultados interessantes por meio de uma abordagem de tentativa e erro, expondo o microrganismo a diferentes condições de crescimento (FATHEPURE, 2014). Assim, uma única linhagem microbiana pode produzir diversos compostos interessantes, embora sem uma racionalização clara sobre como o agente indutor atua.

Nossa contribuição para essas estratégias de produção de metabólitos secundários envolve o uso de cátions de elementos de transição em substituição ao ferro. Muitos metais catiônicos desempenham um papel essencial nos sistemas enzimáticos e possuem uma função central em sua atividade. Nossa intenção é explorar um caminho para o metabolismo secundário que possa ser mais racionalizável e controlável no futuro. Aqui, relatamos que uma linhagem de *Talaromyces* sp. coletada no continente Antártico expressa mudanças fenotípicas na morfologia e no metabolismo quando exposta a diferentes concentrações de  $Mn^{2+}$  em substituição ao  $Fe^{3+}$ .

## 4.2. Procedimentos experimentais gerais

As análises cromatográficas analíticas foram realizadas utilizando um sistema Acquity UPLC M-Class da Waters, equipado com uma coluna CSH (C18 1,7  $\mu m$ , 2,1 x 100 mm). As separações preparativas por HPLC em fase reversa foram realizadas utilizando uma coluna Luna Phenyl Hexyl (21,2 x 250 mm, 10  $\mu m$ ) acoplada a um sistema Shimadzu SIL-20AP VP, equipado com detectores de ultravioleta (SPD-20AV) e índice de refração (RID-10A). A cromatografia em coluna de média pressão (MPLC) foi realizada em um sistema de cromatografia de média pressão Combiflash RF 200 da Teledyne-Isco, utilizando colunas

preenchidas com sílica gel RediSep Gold. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas de sílica gel GF254 pré-revestidas em folhas de alumina. As manchas foram visualizadas sob luz UV ou por pulverização com ácido sulfúrico a 10% em EtOH, seguida de aquecimento.

As análises por espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em um espectrômetro Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos Thermo com fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e 2D foram registrados em espectrômetros Bruker DRX 400, utilizando solução de  $\text{CDCl}_3$  com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol eram de grau analítico e foram adquiridos das empresas Synth (Diadema, SP, Brasil) ou Quimis (Indaiatuba, SP, Brasil). Para as separações por UPLC, foram utilizados acetonitrila e metanol de grau cromatográfico (Panreac, Barcelona, Espanha); a água foi purificada em um sistema Milli-Q (Elga) antes do uso. Todos os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical, Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil), Neogen (Lansing, Michigan, EUA), J. T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, Estados Unidos) e Synth (Diadema, SP, Brasil), e foram utilizados sem purificação adicional. O meio de cultura PDA (batata-dextrose-ágar) foi adquirido da Acumedia (Phillipsburg, New Jersey, Estados Unidos).

Para o cultivo do fungo, foi utilizado um incubador refrigerado com agitação Tecnal - TE - 421, ajustado para uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e agitação constante de 120 rpm. Os materiais utilizados foram esterilizados em uma autoclave vertical Phoenix, sob pressão de 1 atm e temperatura constante de  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Todo o experimento foi realizado sob condições assépticas em uma cabine de segurança biológica Filterflux classe II A1. A biomassa fúngica seca foi obtida utilizando um sistema de liofilização Christ Alpha 2 - 4 LD plus. Os extratos foram obtidos por extração em banho ultrassônico Unique - USC1650, realizada por 30 minutos, repetida três vezes.

### **4.3. Isolamento do fungo *Talaromyces* sp.**

O fungo *Talaromyces* sp. foi isolado de solo recém-exposto a 150 metros da geleira Collins ( $62^\circ09.794'\text{S}$   $58^\circ55.560'\text{W}$ ) na Ilha Rei George, região da Antártica, de acordo com a metodologia descrita por SANTOS et al. (2020). Após o isolamento, o fungo foi preservado em água esterilizada e depositado no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), Instituto de Biociências, sob o código LAMAI2549, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, Brasil. Ele também foi depositado no

Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil, sob o código LaBioMMi834. A identificação do fungo foi realizada com base no sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), abrangendo ITS 1, 5.8S e ITS 2.

#### **4.4. Crescimento do micro-organismo, extração e análise**

O fungo *Talaromyces* sp. foi inicialmente cultivado em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio PDA. O meio PDA (39 g) foi suspenso em 1,0 L de água destilada e esterilizado em autoclave sob 1 atm a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído nas placas e resfriado à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Em seguida, fragmentos de 5 mm de diâmetro contendo micélio fúngico foram utilizados para inocular as placas sob fluxo laminar. Após 14 dias de crescimento, essas placas foram usadas para preparar suspensões de esporos para experimentos subsequentes.

Com o auxílio de uma alça de platina, uma quantidade específica de células fúngicas foi raspada das placas e transferida para um tubo Falcon (50 mL) contendo 30 mL de água autoclavada, sendo então homogeneizada em vortex. A concentração de esporos foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC).

A influência do  $Mn^{2+}$  no metabolismo fúngico foi avaliada modificando o meio líquido de Czapek, composto por dextrose (30,0 g/L), extrato de levedura (20,0 g/L),  $NaNO_3$  (3,0 g/L),  $K_2HPO_4$  (1,0 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/L),  $KCl$  (0,5 g/L) e  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01 g/L). Para esse propósito, o  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  foi substituído por diferentes concentrações de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ . Foram preparadas oito concentrações de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  no meio Czapek, variando de 1000 mM (197,9 g/L) a 0,0 mM. Dois conjuntos de triplicatas de cada solução (50 mL) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (125 mL), autoclavados e inoculados sob condições assépticas com a suspensão de esporos preparada conforme descrito acima. O cultivo ocorreu por 15 dias a 28°C em agitador orbital a 100 rpm.

Após 15 dias de crescimento, um dos conjuntos de triplicatas foi utilizado para medir o crescimento fúngico. O micélio foi filtrado sob pressão reduzida em aparato de Büchner, seco em estufa a 110°C e pesado. O segundo conjunto foi extraído para avaliar a produção de metabólitos secundários. O conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi transferido para tubos Falcon de 175 mL e extraído por partição com acetato de etila, empregando o efeito salting-out com  $MgSO_4$  e  $AcONa$ , similar ao método de extração QuEChERS. Assim, foram adicionados 20 g de  $MgSO_4$  e 5 g de  $AcONa$  a cada tubo Falcon, seguido de agitação manual

vigorosa por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 50 mL de acetato de etila e o tubo foi novamente agitado. Após a separação das fases, 35 mL da fase superior (AcOEt) foram transferidos para um novo tubo Falcon contendo 300 mg de  $MgSO_4$  anidro, centrifugado a 5000 rpm. A fase líquida foi então removida, evaporada até a secura, redissolvida em metanol de grau HPLC e analisada por cromatografia UPLC-PDA.

A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma fase móvel composta por água (bomba A) e acetonitrila (bomba B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, em eluição gradiente de 15% a 100% de B em 12 minutos, a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L. As análises por UPLC-HRMS foram conduzidas utilizando a mesma coluna e eluição gradiente, com ionização por eletrospray no modo positivo em um analisador do tipo Orbitrap.

#### **4.5. Cultivo em larga escala**

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior, optou-se por cultivar o fungo em meio líquido suplementado com cloreto de manganês tetra hidratado ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) na concentração de 300 mM, com o objetivo de investigar a influência desse cátion na produção de metabólitos secundários. Para isso, foram preparados 24 frascos Erlenmeyer de 500 mL, cada um contendo 250 mL de meio Czapek modificado, que foram inoculados com uma suspensão de esporos do fungo, totalizando um volume de 6,0 litros de cultura.

Após um período de incubação de 15 dias, todo o conteúdo dos frascos foi submetido à liofilização, a fim de obter a massa residual. Essa biomassa seca foi então submetida a extrações sequenciais utilizando três porções de 500 mL de acetato de etila, seguidas por três porções de 500 mL de metanol. As extrações foram realizadas com auxílio de banho ultrassônico, favorecendo a liberação dos metabólitos da matriz fúngica.

Os extratos obtidos foram então submetidos à fracionamento por cromatografia a vácuo em coluna seca, preenchida com 100 g de sílica gel 60 (malha 60), montada com 30 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro. Os extratos foram previamente adsorvidos em sílica, secos e aplicados no topo da coluna. A eluição foi realizada com sistemas binários de solventes em diferentes proporções, resultando nas seguintes frações: F1 (hexano:acetato de etila, 95:05), F2 (hexano:acetato de etila, 70:30), F3 (acetato de etila, 100%), F4 (acetato de etila:metanol, 90:10), F5 (acetato de etila:metanol, 70:30) e F6 (metanol, 100%), todas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico.

As frações foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (UPLC-PDA) e os perfis cromatográficos obtidos foram

comparados aos resultados do experimento em pequena escala, visando identificar compostos que não estavam presentes no grupo controle (sem adição de  $Mn^{2+}$ ). Posteriormente, os compostos de interesse foram isolados e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS), permitindo a sua identificação estrutural e correlação com os efeitos induzidos pela presença do manganês no cultivo.

#### 4.6. Construção das redes moleculares

Visando avaliar as características dos compostos produzidos pelo fungo do gênero *Talaromyces*, os extratos obtidos foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-HRMS) para obtenção de dados espectrométricos de MS/MS de possíveis compostos dessa classe.

Uma vez obtidos, os dados de MS/MS foram convertidos para o formato mzXML utilizando o software MSConverter. Esses dados, após a conversão, foram processados no software MZmine v.2.53 para geração dos arquivos de processamento. A partir desses arquivos, foi possível atribuir diferentes policetideos e meroterpenoides que foram anotados por meio do processo de dereplicação. As anotações foram verificadas considerando um erro de exatidão de massa de até 5 ppm.

Tais arquivos foram submetidos à plataforma GNPS para a criação de redes moleculares com base nos recursos de análise *feature-based molecular networking* – FBMN, as quais foram visualizadas utilizando o software Cytoscape v.3.10.0.

A tolerância de íon é utilizada como parâmetro pela plataforma GNPS para a criação das redes moleculares. Essa tolerância é baseada nos valores de massa dos íons precursores e íons fragmentos gerados na obtenção dos dados de MS/MS. Cada valor é definido conforme a sensibilidade do equipamento utilizado. Geralmente, o valor de 0,02 Da é usado como padrão para equipamentos de alta resolução como q-TOF e q-Orbitrap, e 2,0 Da para equipamentos de baixa resolução como os *ion traps*. Portanto, sendo um equipamento de alta resolução, os valores escolhidos foram de 0,02 Da para ambos os parâmetros.

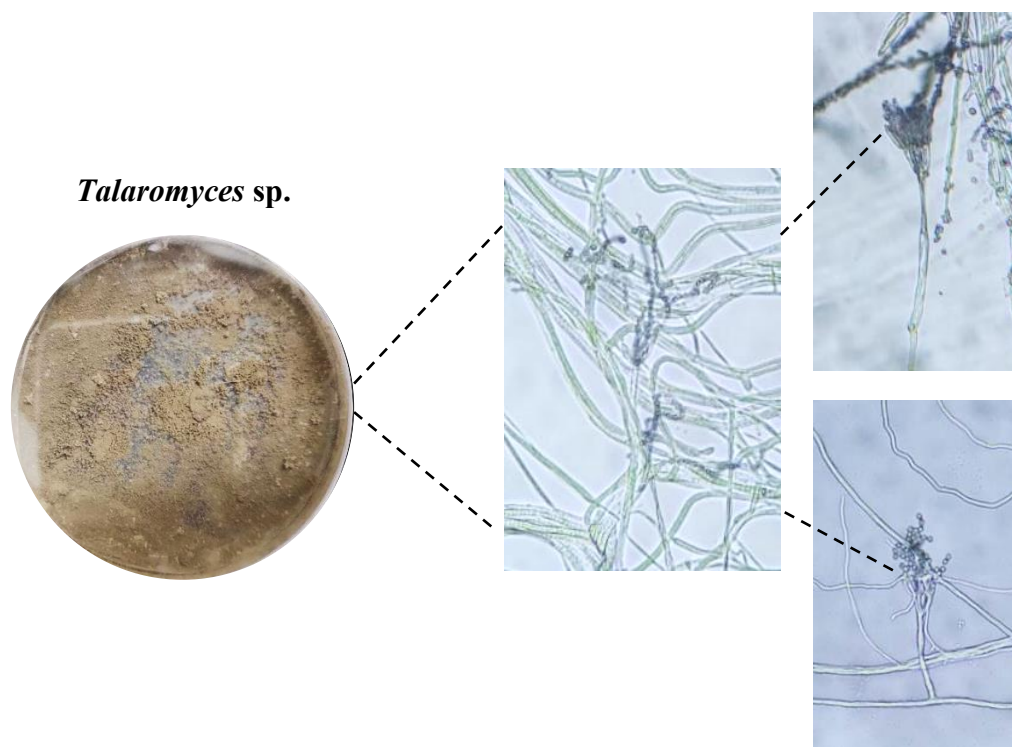
Outro parâmetro utilizado na criação das redes moleculares é o valor do *cosine score*, que é geralmente usado para definir o nível de similaridade entre os vetores conectados em cada nó. Em geral, os valores utilizados variam de 0 a 1, onde valores mais próximos de 1 restringem os agrupamentos formados àqueles mais idênticos, enquanto valores mais próximos de 0 resultam em maior número de combinações com pouca ou nenhuma similaridade, ou seja, menos idênticas. O valor recomendado para esse tipo de análise é 0,7.

Ainda com foco nas relações de similaridade, outro parâmetro importante para a definição final da rede molecular é o número de íons fragmentos que podem ser considerados semelhantes. Geralmente, esse parâmetro indica o quão semelhante um composto pode ser a outro, de acordo com a quantidade de seus íons fragmentos. O valor sugerido pela plataforma GNPS é 6, e o valor que melhor se adequou a essas análises foi 5.

## 4.7. Resultados e discussões

### 4.7.1. Identificação do fungo *Talaromyces* sp.

O fungo desenvolveu-se em placas de Petri contendo meio BDA, apresentando colônias de crescimento rápido com intensa pigmentação de coloração marrom na superfície e coloração amarelada na face oposta da placa. A micrografia (Figura 8) revelou a presença de conidióforos ramificados e verticilados, exibindo fiáldes distintas. Os conídios estavam dispostos em cadeias secas, sendo mais abundantes nas regiões superiores das estruturas conidiais. A partir dessa estrutura, originam-se as células conidiogênicas, incluindo metula e fiáldes. Essas características morfológicas são altamente compatíveis com fungos do gênero *Talaromyces* (VISAGIE et al., 2015; WEI; XU; WANG, 2021).



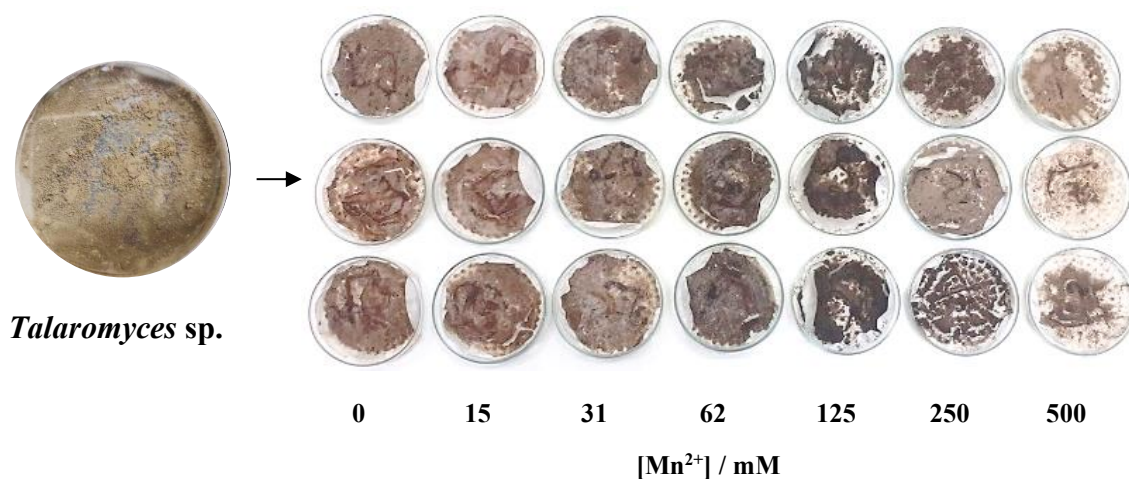
**Figura 8** - Morfologia de crescimento do fungo *Talaromyces* sp. em placa de Petri e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio com lente de 40x.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

#### 4.7.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês

A tolerância do fungo ao  $Mn^{2+}$  foi avaliada usando concentrações de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  variando de 0 a 1000 mM em meio base de czapek, onde fungos filamentosos geralmente crescem muito bem. As réplicas da concentração 0 mM foram usadas como referência para o crescimento do fungo. Observou-se que, em concentrações iniciais (0 - 31 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ), o fungo mantém sua coloração e não apresenta mudanças morfológicas macroscópicas aparentes. Em concentrações acima de 31 mM, o micélio começa a escurecer, até a concentração de 500 mM, onde produz apenas pequenas quantidades de células. Concentrações de 1000 mM de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  inibem completamente o crescimento do fungo. Assim, a concentração máxima na qual ainda consegue crescer está entre 250 e 500 mM.

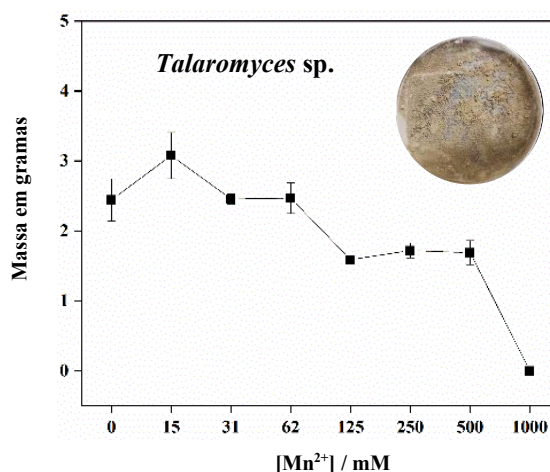
Essa mudança de cor de marrom para marrom-escuro provavelmente está relacionada ao acúmulo de dióxido de manganês ( $MnO_2$ ), um pó de cor preta a marrom, que é um produto da oxidação de  $Mn^{2+}$  pelas manganês peroxidases do fungo. Observou-se que os fungos utilizam essas peroxidases para lidar com o excesso de manganês. Após certa concentração, as peroxidases perdem sua capacidade de desintoxicação, e o fungo para de crescer (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016). Essa evolução de cor é acompanhada por mudanças na formação de massa micelial (Figura 9).



**Figura 9** - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A concentração de 15 mM  $Mn^{2+}$  promove um aumento de aproximadamente 15% na massa micelial, mas começa a retornar ao valor de controle em 31 e 62 mM, e então cai 40% nas concentrações de 125, 250 e 500 mM  $Mn^{2+}$  (Figura 10).



**Figura 10** - Evolução da massa micelial de acordo com o aumento de concentração de manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A toxicidade do  $Mn^{2+}$  inicia a atividade das peroxidases, ocorre em concentrações ligeiramente superiores a 62 mM. A inibição do crescimento microbiano por  $Mn^{2+}$  depende de muitos fatores, como pH e a presença de outros cátions, como  $Mg^{2+}$ . Enquanto algumas leveduras são inibidas a 32 mM  $Mn^{2+}$ , algumas bactérias do gênero *Serratia* podem tolerar até 1200 mM  $MnSO_4$ , embora muitas outras bactérias apresentem concentração inibitória mínima (MIC) geralmente abaixo de 30 mM. O fungo *Cladosporium cladosporioides* cresceu bem em um meio contendo 60 mM  $Mn^{2+}$ , mas também conseguiu tolerar 1200 mM (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016).

Enzimas peroxidases têm sido associadas à oxidação de manganês em várias espécies de microrganismos. Além disso, em certos fungos basidiomicetos, *Penicillium* e *Aspergillus*, a oxidação de manganês por enzimas peroxidases extracelulares também foi estudada. A enzima manganês peroxidase é capaz de promover a oxidação do íon manganês  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ , que é estabilizado por metabólitos derivados de ácidos orgânicos. O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao de outras peroxidases contendo heme, mas a manganês peroxidase exibe uma preferência por  $Mn^{2+}$  como doador de elétrons (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016).

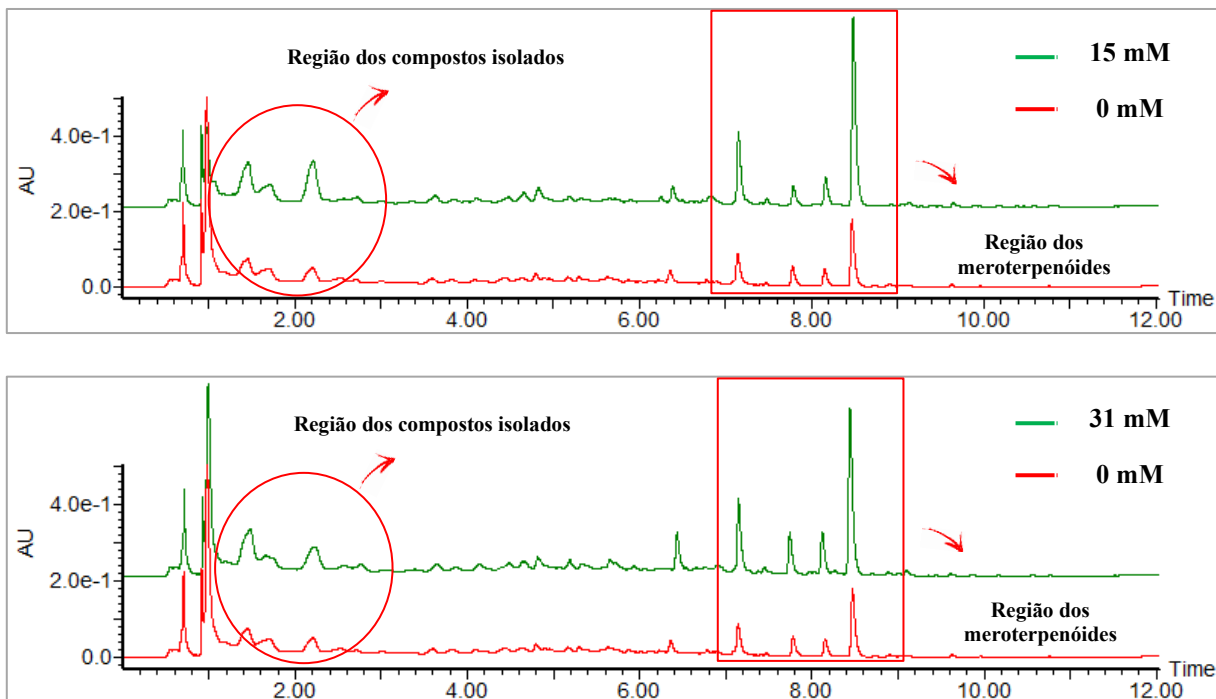
Embora os microrganismos apresentem uma ampla diversidade de níveis de tolerância ao  $Mn^{2+}$ , os estudos encontrados na literatura indicam que sempre haverá uma concentração mínima que começa a perturbar sua maquinaria bioquímica para se adaptar às condições adversas. Isso é interessante para nosso propósito neste trabalho, uma vez que a inibição ou indução de novas enzimas pode impactar na biossíntese de produtos naturais pelo fungo.

### 4.7.3. Avaliação do perfil químico e identificação dos compostos isolados

Após o teste de toxicidade com o cátion manganês, foram realizadas análises por UPLC-DAD dos extratos em suas respectivas concentrações, e os cromatogramas foram gerados. Observa-se que os compostos produzidos nestas condições sugerem uma resposta adaptativa ao ambiente de estresse. A presença de cátions metálicos, como manganês, em altas concentrações no ambiente pode levar ao estresse oxidativo nas células desses microrganismos. Em resposta a esse estresse, os microrganismos podem produzir metabólitos secundários com propriedades antioxidantes para neutralizar os radicais produzidos durante o estresse oxidativo. Além disso, a presença de cátions metálicos, especialmente em altas concentrações, pode afetar a atividade enzimática desses microrganismos, levando à produção de diferentes metabólitos secundários por diferentes vias biossintéticas. Em resumo, o aumento da concentração de cátions metálicos no ambiente pode levar a alterações na produção de metabólitos secundários por microrganismos como parte de sua resposta adaptativa ao estresse oxidativo e mudanças na atividade enzimática.

O gênero *Talaromyces* é bem conhecido pela produção de uma variedade de metabólitos secundários com interesse farmacêutico, biotecnológico e industrial. No entanto, a produção desses metabólitos ligada ao manganês ainda é relativamente desconhecida. Alcaloides, terpenoides, peptídeos, ésteres e policetídeos estão entre os principais metabólitos produzidos por *Talaromyces*.

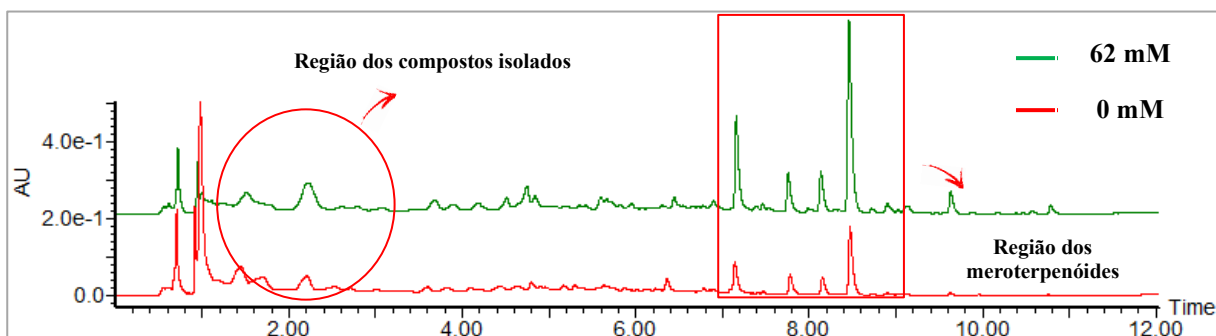
Com o objetivo de avaliar como o perfil químico desses fungos poderia ser alterado em diferentes concentrações de manganês, os cromatogramas obtidos nessa condição experimental e seu respectivo controle foram analisados. O aspecto físico das biomassas obtidas em cada nível de concentração de manganês indicou equivalência do ponto de vista químico, conforme a comparação dos cromatogramas. Vale ressaltar que, para níveis de concentração com menor proporção de manganês, pode-se observar a presença de picos equivalentes ao controle. Essa característica sugere que a influência desse metal em baixas concentrações não afeta sua maquinaria bioquímica. De acordo com a observação dos cromatogramas, os perfis químicos para os níveis de concentração (0, 15, 31 mM) (Figura 11), apresentaram picos similares com tempo de retenção (t.r) variando de 1 a 5 minutos e de 6 a 10 minutos para a faixa de compostos de interesse (compostos fenólicos isolados e meroterpenoides anotados).



**Figura 11** - Cromatogramas do fungo *Talaromyces* sp em 254 nm (0 mM, controle e 15 e 31 mM, experimento com  $Mn^{2+}$ ).

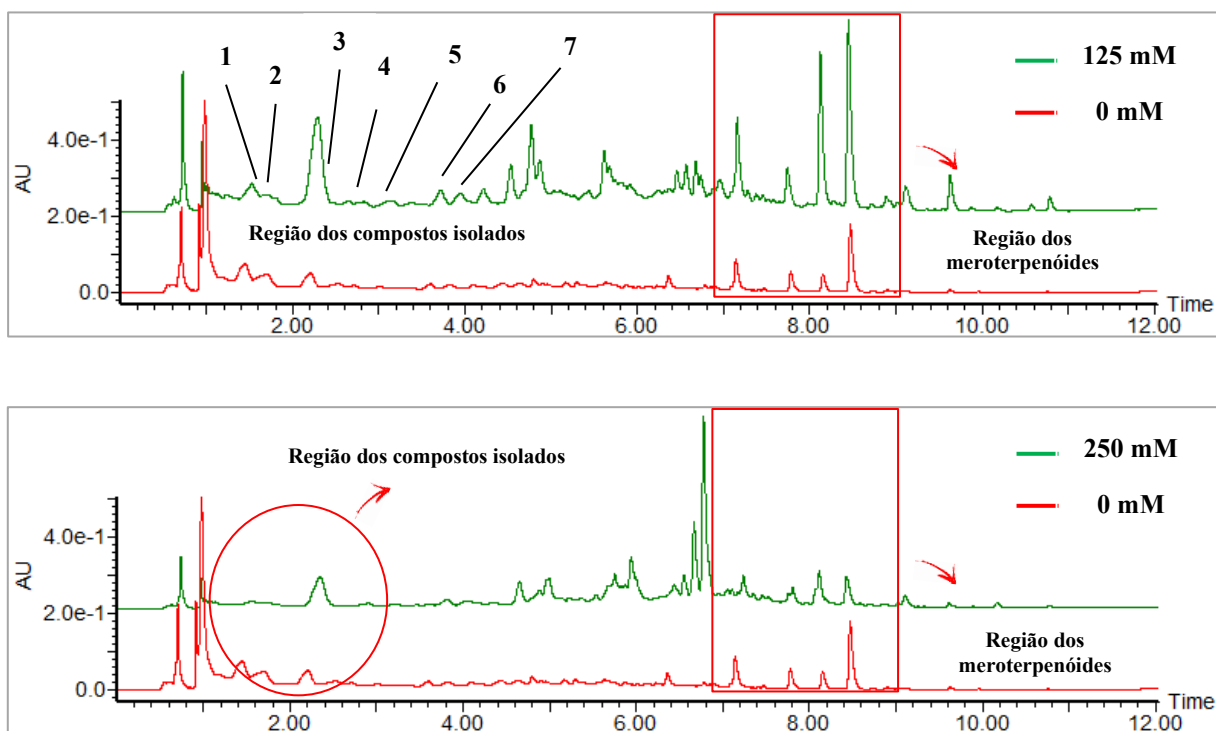
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Na presença de concentrações mais altas de manganês (a partir de 62 mM) (Figura 12), a maquinaria bioquímica começa a apresentar modificações variadas em relação ao seu controle, quando comparada aos mesmos tempos de retenção mencionados. Destacam-se as concentrações de 125 e 250 mM, onde houve uma maior variação nos picos presentes nos tempos de retenção de 1 a 5 minutos e de 6 a 10 minutos.



**Figura 12** - Cromatogramas do fungo *Talaromyces* sp em 254 nm (0 mM, controle e 62 mM, experimento com  $Mn^{2+}$ ).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 13** - Cromatogramas do fungo *Talaromyces* sp em 254 nm (0 mM, controle e 125 e 250 mM, experimento com  $Mn^{2+}$ ).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

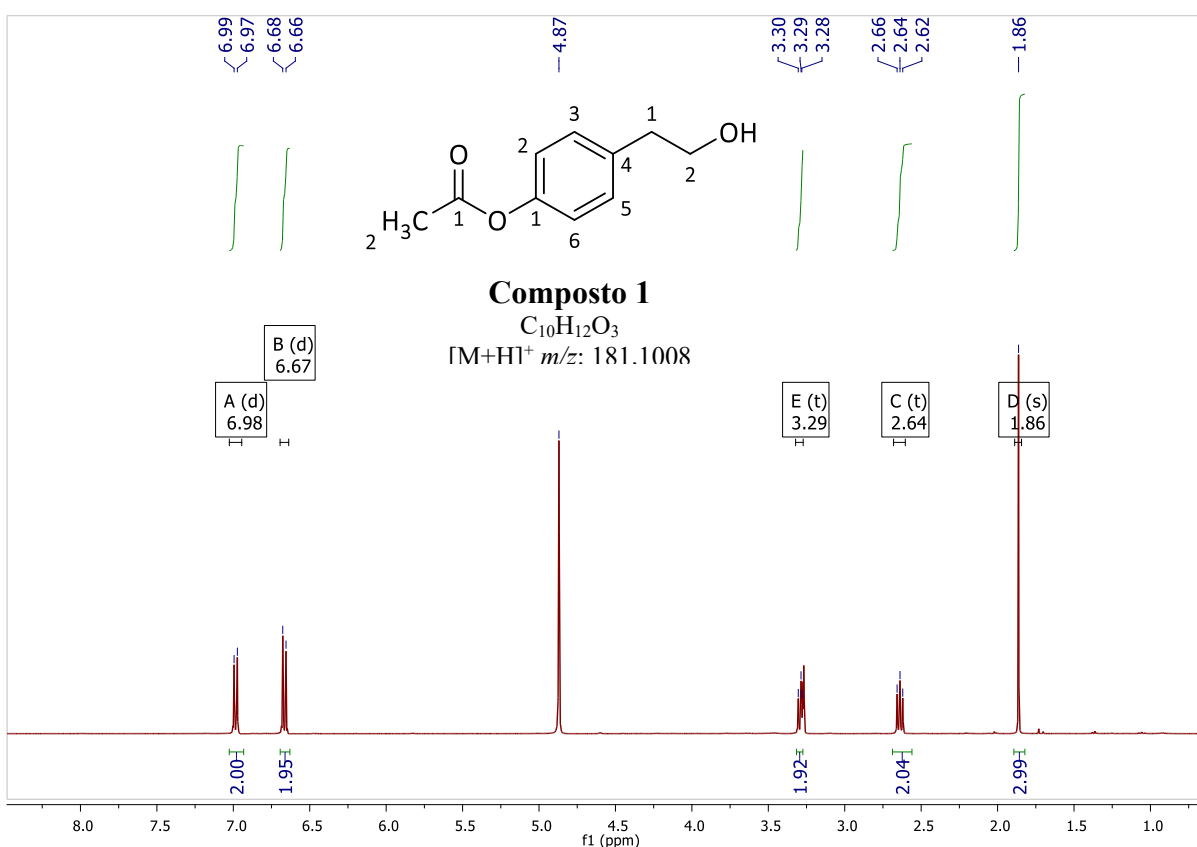
Ao comparar todos os cromatogramas, é possível escolher, com base na quantidade e variação dos picos nos tempos de retenção mencionados, qual nível de concentração seria utilizado na execução de experimentos em maior escala. Essa característica levou à escolha das concentrações de 125 ou 250 mM (Figura 13), pois foram consideradas promissoras para este estudo, revelando um comportamento distinto daquele apresentado pelo controle. Essa relação sugere um potencial para o isolamento dessas substâncias, além de fornecer informações cruciais sobre os processos metabólicos vulneráveis ao estresse causado por esse metal.

Entre os metabólitos isolados, a estrutura de 7 compostos purificados foram identificadas como 4-(2-hidroxietil) acetato de fenila (composto 1), 4-(2-hidroxietil) benzoato de metila (composto 2), 4-hidroxibenzoato de metila (composto 3), 3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4,4'-diil diacetato (composto 4), ácido 2,3-dihidroxibenzóico (composto 5), 2,4-dihidroxibenzoato de metila (composto 6), 4,5-dihidroxitetrahydro-2H-piran-2-ona (composto 7), demonstrados na Figura 13. Todos os compostos foram caracterizados por RMN e confirmados por HRMS.

O composto 1 (Figura 14) foi obtido como um sólido amorfo, e sua fórmula molecular,  $C_{10}H_{12}O_3$ , foi determinada com base nos dados de HRMS ( $m/z = 181,1008 [M + H]^+$ ), estabelecendo um índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a 5, valor compatível com a presença de um anel aromático e substituintes oxigenados.

Os dados de RMN de  $^1H$  confirmaram a presença de 11 hidrogênios na molécula. Na região aromática, foram observados sinais em  $\delta H$  6,99 (H-2), 6,97 (H-3), 6,68 (H-5) e 6,66 (H-6), compatíveis com um anel benzênico tetra-substituído, evidenciando a assimetria do sistema. Além disso, observaram-se sinais em  $\delta H$  3,29 e 2,64, atribuídos a hidrogênios metilênicos, e um sinal em  $\delta H$  1,86, correspondente a um grupo metila ligado diretamente a carbonila.

Em conjunto, os dados de HRMS e RMN sustentam a proposta estrutural de uma molécula aromática substituída, contendo simultaneamente um sistema benzênico funcionalizado coerente com a fórmula molecular determinada.

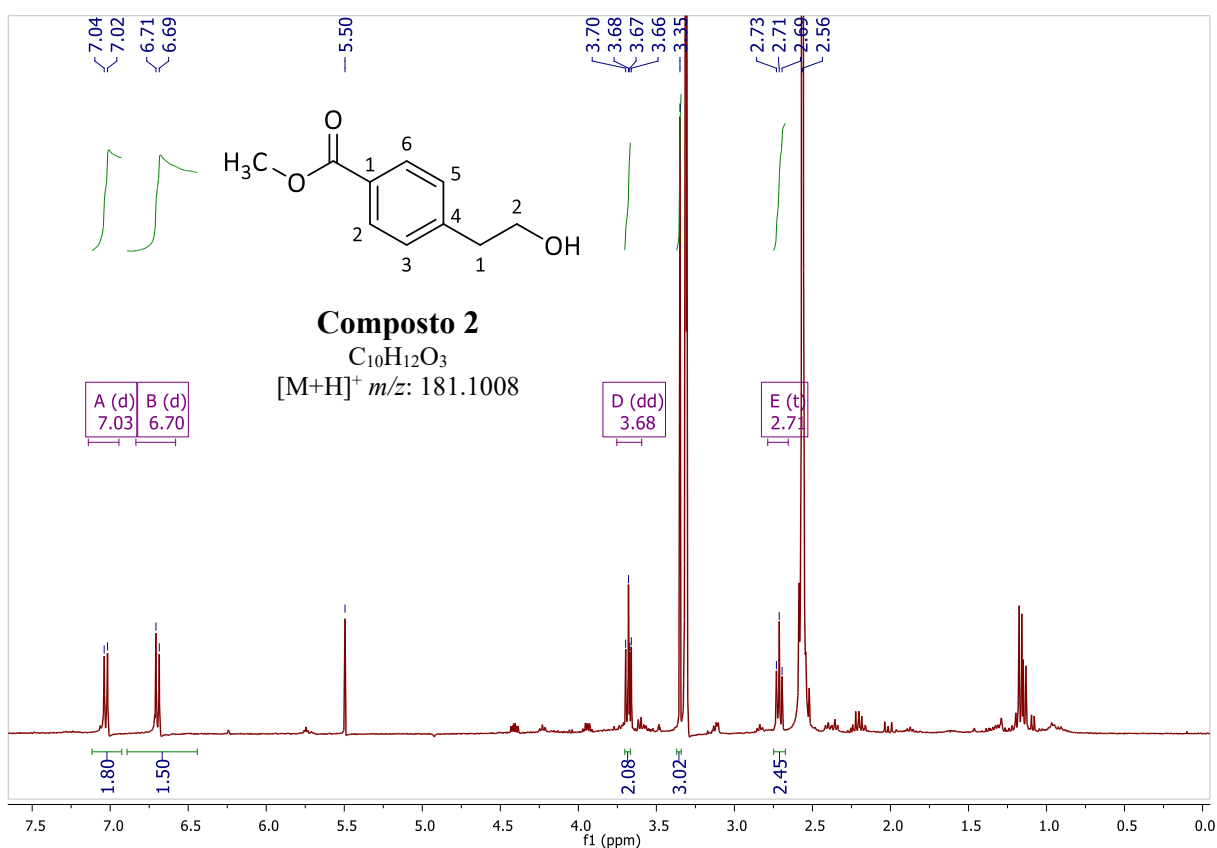


**Figura 14** - Espectro de hidrogênio do composto 1 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 2 (Figura 15) também foi obtido como sólido amorfo, apresentando a mesma fórmula molecular do composto 1 (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) e índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a 5. A diferença estrutural mais relevante entre os dois compostos foi evidenciada pelos dados de RMN de <sup>1</sup>H.

No espectro observa-se na região aromática sinais em δH 7,04 (H-2), 7,02 (H-3), 6,71 (H-5) e 6,69 (H-6), compatíveis com um anel benzênico tetra-substituído. Observa-se um sinal em δH 3,35, característico de hidrogênios de um grupo metoxila (-OCH<sub>3</sub>), reforçando a presença deste substituinte na molécula. Assim, embora compartilhem a mesma fórmula molecular, os dados de RMN de <sup>1</sup>H demonstram que o composto 2 apresenta variação no padrão estrutural relação ao composto 1, o que justifica as diferenças observadas nos deslocamentos químicos e confirma a presença de um grupo metoxila em posição distinta.

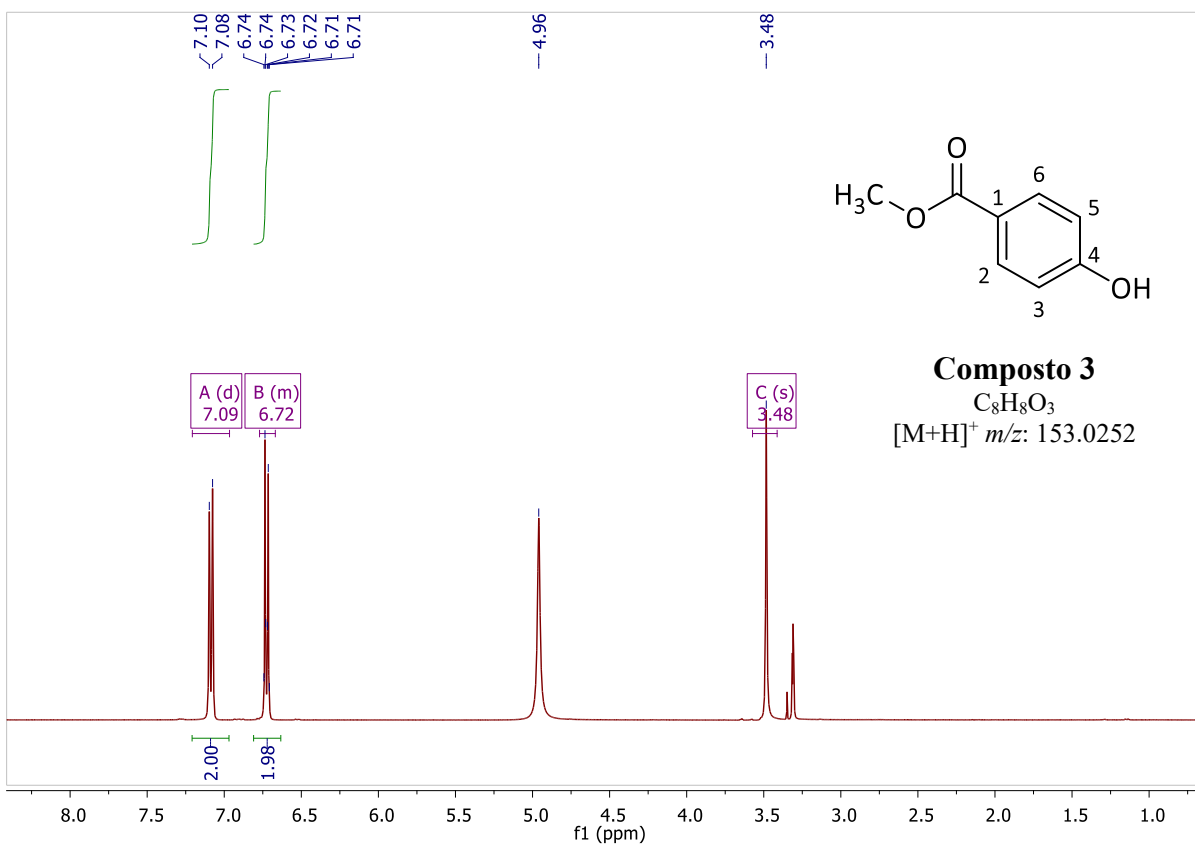


**Figura 15** - Espectro de hidrogênio do composto 2 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 3 (Figura 16) foi obtido como sólido amorfo, tendo sua fórmula molecular estabelecida como  $C_8H_8O_3$  a partir dos dados de HRMS ( $m/z = 153,0252 [M + H]^+$ ), com índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a 5.

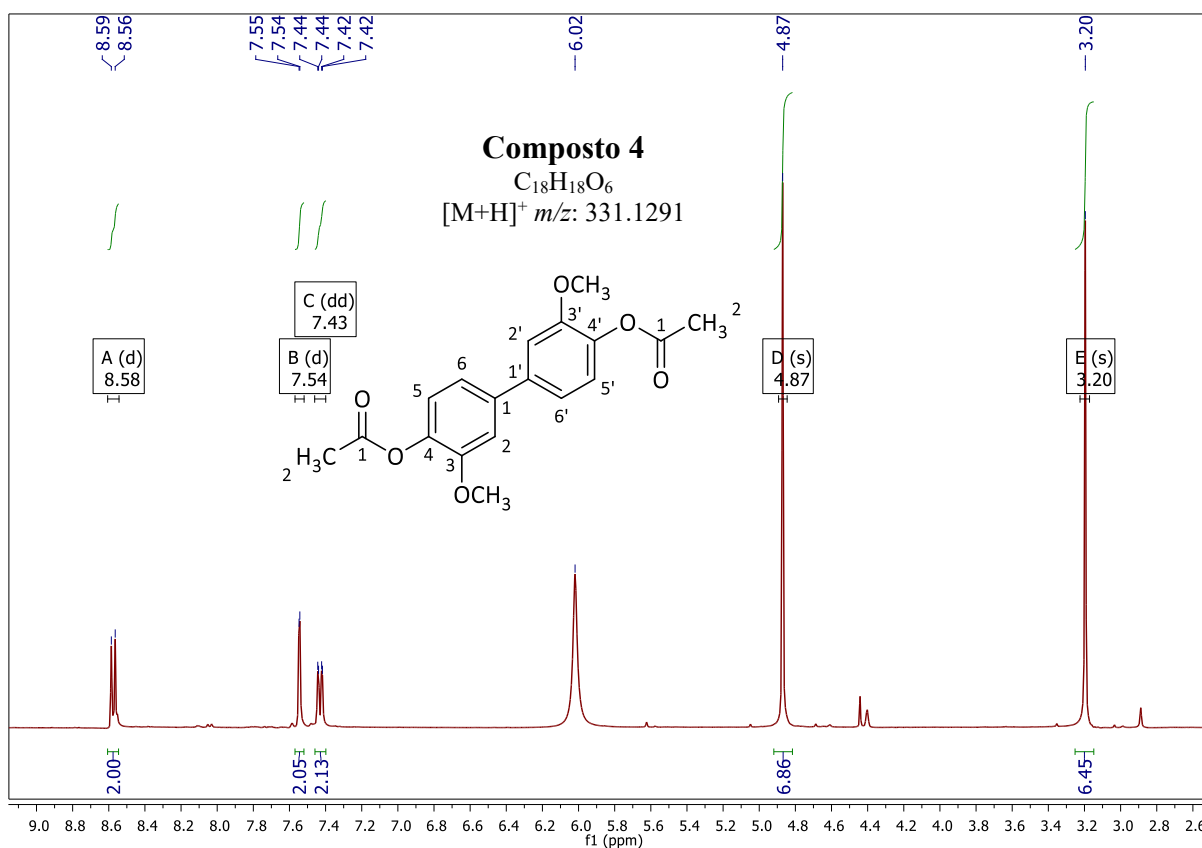
Os dados de RMN de  $^1H$  indicaram a presença de sete hidrogênios distribuídos em diferentes ambientes químicos. Na região aromática, foram observados sinais em  $\delta H$  7,10 (H-2), 7,08 (H-3), 6,74 (H-5) e 6,72 (H-6), caracterizando um sistema benzênico tetrasubstituído. Além disso, registraram-se sinais em  $\delta H$  3,48, compatível com um grupo metoxila ( $-OCH_3$ ).



**Figura 16** - Espectro de hidrogênio do composto 3 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 4 (Figura 17), foi isolado como sólido amorfo, e sua fórmula molecular,  $C_{18}H_{18}O_6$ , foi determinada por HRMS ( $m/z = 331,1291 [M + H]^+$ ), com IDH igual a 10. O espectro de RMN de  $^1H$  revelou deslocamentos em  $\delta H$  8,58; 7,55 e 7,43 para os hidrogênios aromáticos H-2, H-5 e H-6 e H-2', H-5' e H-6', além de sinais em  $\delta H$  4,87 referente as metoxilas presentes nesta estrutura e  $\delta H$  3,20 para as metilas. A simetria da molécula foi confirmada por experimentos de RMN bidimensional HMBC, onde os carbonos C-1 e C-1' mostraram correlação com os hidrogênios aromáticos H-2, H-5, H-6 e H-2', H-5' e H-6' equivalentes simétricos.

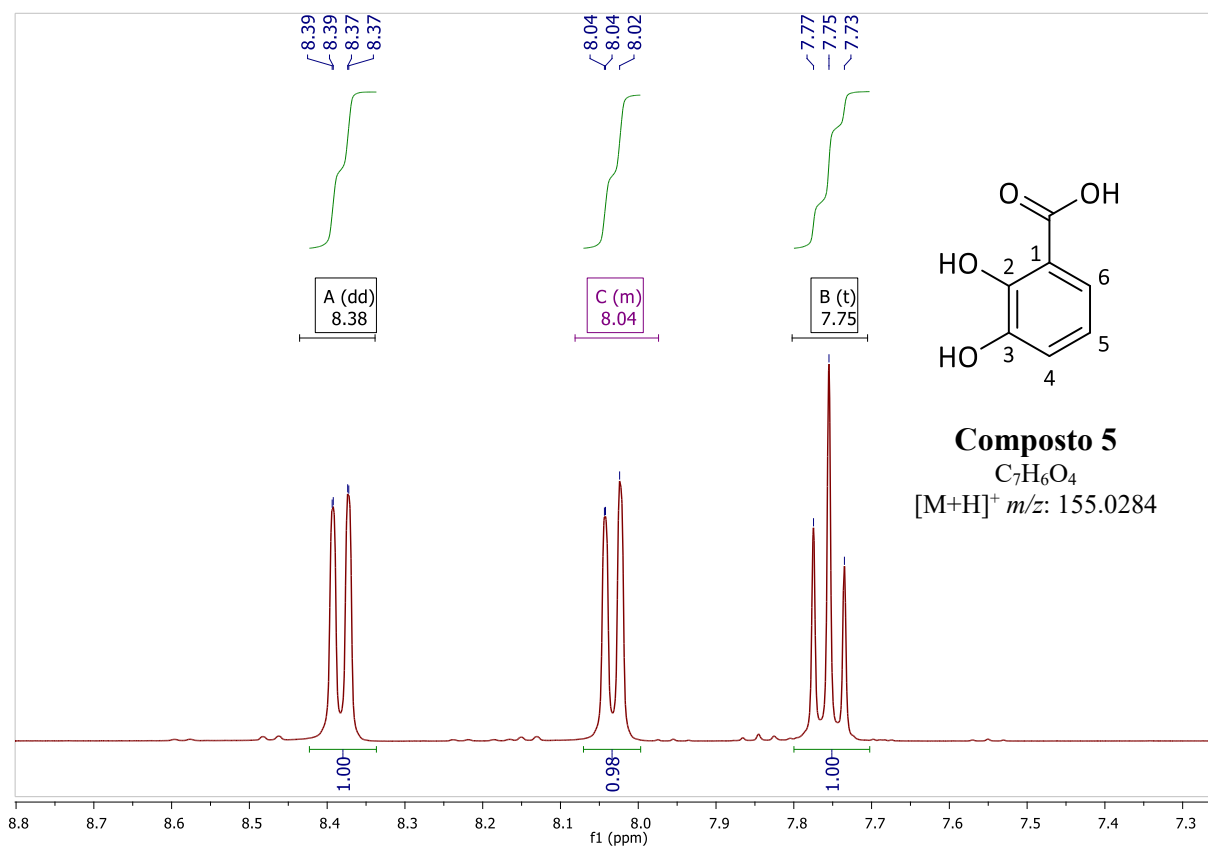


**Figura 17** - Espectro de hidrogênio do composto 4 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 5 foi obtido como sólido amorfo, apresentando fórmula molecular  $C_7H_6O_4$ , determinada por HRMS ( $m/z = 155,0284 [M + H]^+$ ), com índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a 5.

A análise do espectro de RMN de  $^1H$  revelou a presença de três hidrogênios aromáticos, observados em  $\delta H$  8,38 (H-4), 8,02 (H-5) e 7,75 (H-6). Esses sinais, situados em região característica de prótons aromáticos fortemente desblindados, são compatíveis com um anel benzênico tri-substituído por grupos desativadores eletrônicos, coerente com a fórmula molecular proposta.



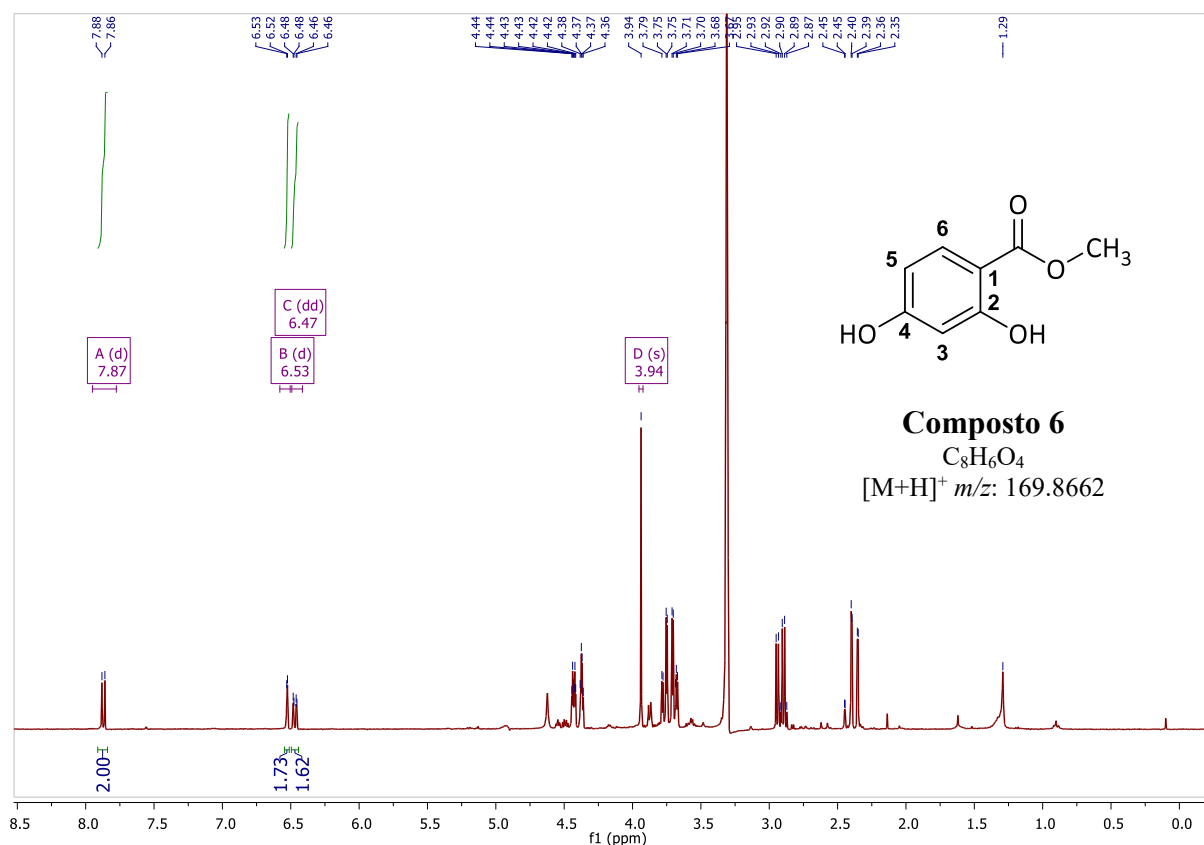
**Figura 18** - Espectro de hidrogênio do composto 5 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 6 foi isolado como um sólido amorfo, com fórmula molecular  $C_8H_6O_4$ , determinada por HRMS ( $m/z = 169,8662 [M + H]^+$ ), apresentando um índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a 5.

O espectro de RMN de  $^1H$  revelou sinais em  $\delta H$  7.88; 6,53; 6,48; atribuídos aos hidrogênios dos carbonos H-3, H-5 e H-6. Esses deslocamentos químicos indicam a presença de grupos hidroxilados em diferentes ambientes eletrônicos destacando a posição com acoplamento meta e orto para esses hidrogênios. Também foi observado o sinal com  $\delta H$  3,94 compatível com um grupo metoxila ( $-OCH_3$ ).

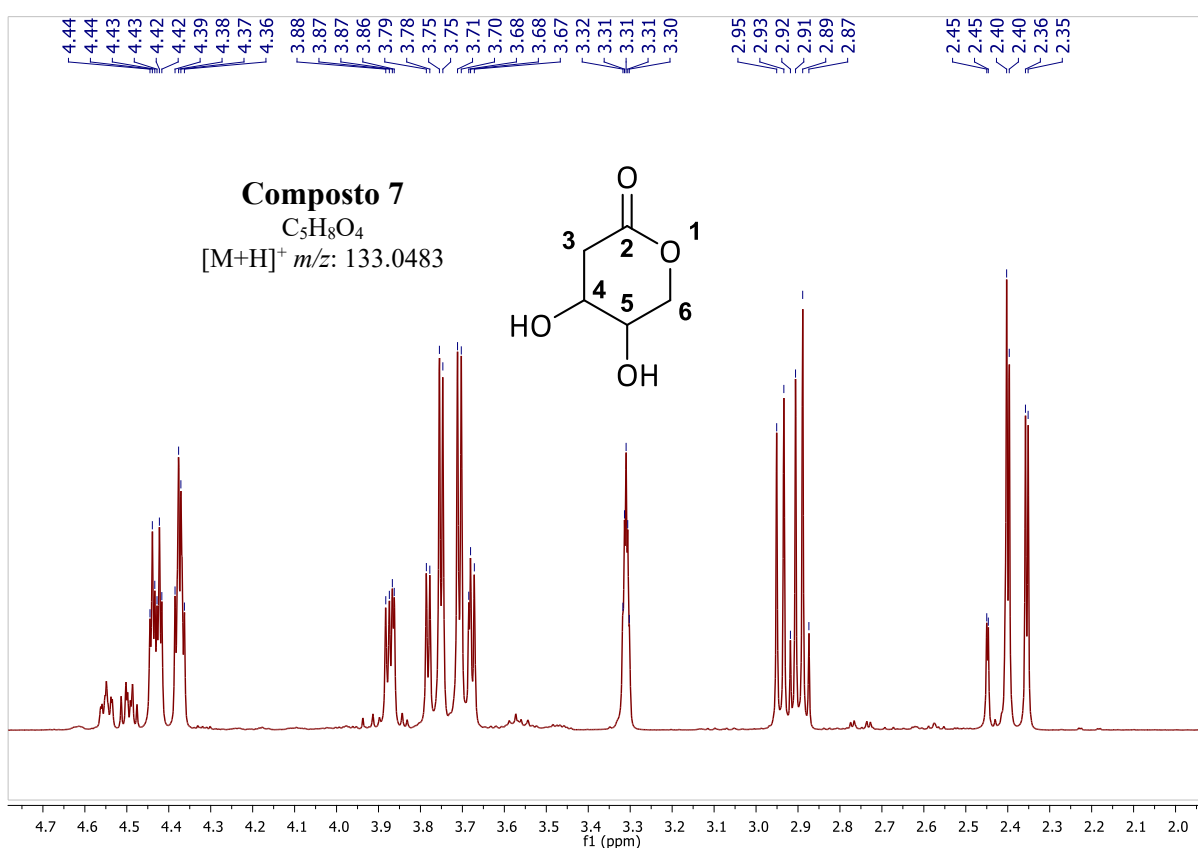
Entretanto, observou-se a presença de sinais adicionais que não se ajustam a uma única estrutura, sugerindo que o composto 6 encontra-se associado a uma provável mistura com outro metabólito.



**Figura 19** - Espectro de hidrogênio do composto 6 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O composto 7 também foi obtido como sólido amorfo, e sua fórmula molecular  $C_5H_8O_4$  foi determinada com base nos dados de HRMS ( $m/z = 133,0483 [M + H]^+$ ), com IDH igual a 2. O espectro de RMN de  $^1H$  do composto 6 revelou sinais característicos que puderam ser destacados e atribuídos aos diferentes hidrogênios da molécula. O deslocamento em  $\delta H$  4,44 foram relacionados ao hidrogênio H-4, correspondente a um metínico ligado a oxigênio. Na região de  $\delta H$  4.38 observou-se o sinal atribuído ao hidrogênio H-5, também associado a um hidrogenio metínico. Já os sinais em  $\delta H$  2,89 e 2,40 foram designados aos hidrogênios H-3 e H-6, referentes ao grupo metilénico adjacente ao carbono carbonílico, sendo diastereotópicos. Dessa forma, os dados de  $^1H$  corroboram a presença dos hidrogênios H-3, H-4, H-5 e H-6 como principais marcadores estruturais.

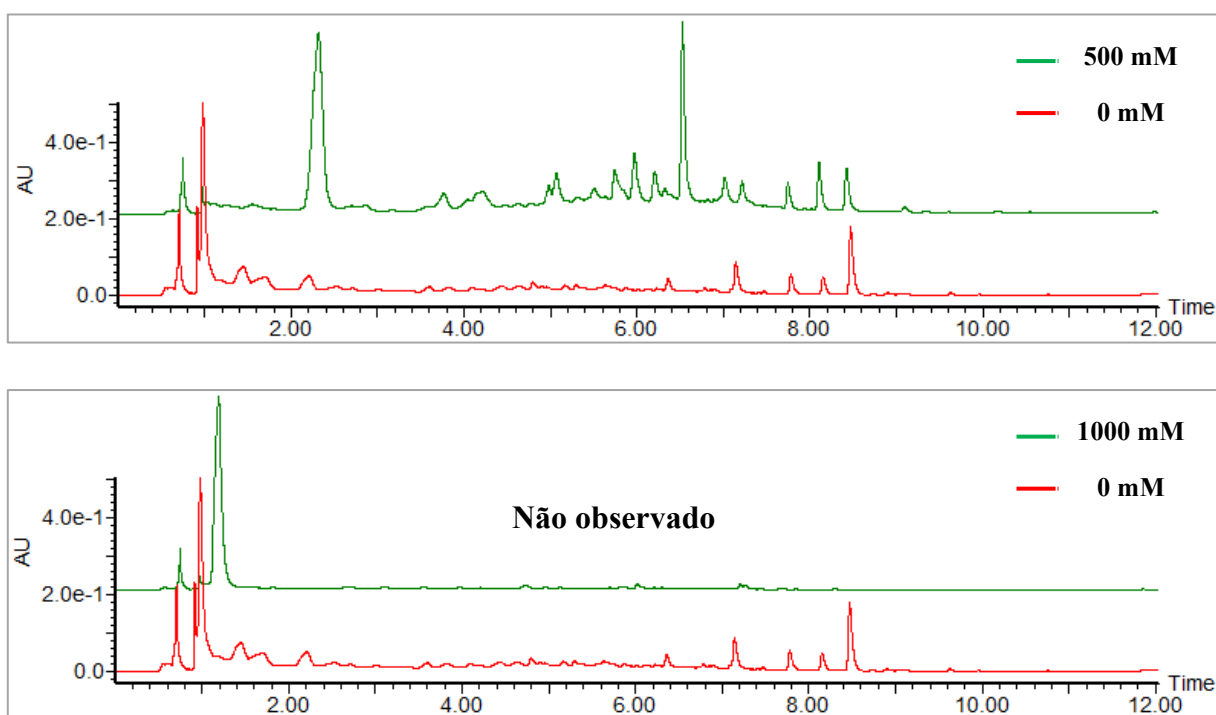


**Figura 20** - Espectro de hidrogênio do composto 7 (400 MHz, MeOD).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Esses compostos foram avaliados quanto aos seus perfis metabólicos e apresentaram impacto no metabolismo com base em seus genes ou inibição nas condições experimentais utilizadas, resultando em um padrão metabólico diferenciado ou alterado em comparação às condições normais de crescimento.

Em diversos estudos que investigam a remoção de manganês por micro-organismos, foi relatado que a ocorrência desses processos depende do nível de pH do meio. Isso se deve à presença de vários grupos químicos ácidos ou básicos, como ácidos carboxílicos, ésteres, aminoácidos e amidas, presentes na parede celular dos micro-organismos. Esses grupos funcionais tornam-se desprotonados quando há mudança no ambiente redox, aumentando a carga negativa na superfície celular e facilitando as interações químicas entre a parede celular e os cátions presentes em solução (HASAN et al., 2012; YU & LEADBETTER, 2020; KEHRES & MAGUIRE, 2003; DAS et al., 2008; MENDIL et al., 2008; PARVATHI et al., 2007). Isto demonstra que a adição do manganês pode aumentar ou diversificar a produção desses compostos. Esse aumento pode estar relacionado à ativação de enzimas específicas envolvidas na biossíntese desses metabólitos, bem como ao controle da expressão gênica associada à sua produção (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016; PÉREZ SILVA et al., 2009; HASAN et al., 2012; YU & LEADBETTER, 2020; KEHRES & MAGUIRE, 2003; DAS et al., 2008; MENDIL et al., 2008; PARVATHI et al., 2007; ZHAI et al., 2015; HE et al., 2014). Esse comportamento não foi observado nas concentrações maiores de 500 e 1000 mM, devido ao elevado nível de toxicidade nestas condições (Figura 21).



**Figura 21** - Cromatogramas do fungo *Talaromyces* sp em 254 nm (0 mM, controle e 500 e 1000 mM, experimento com  $Mn^{2+}$ ).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

#### **4.7.4. Análise geral dos dados: análise de componentes principais do fungo *Talaromyces* sp.**

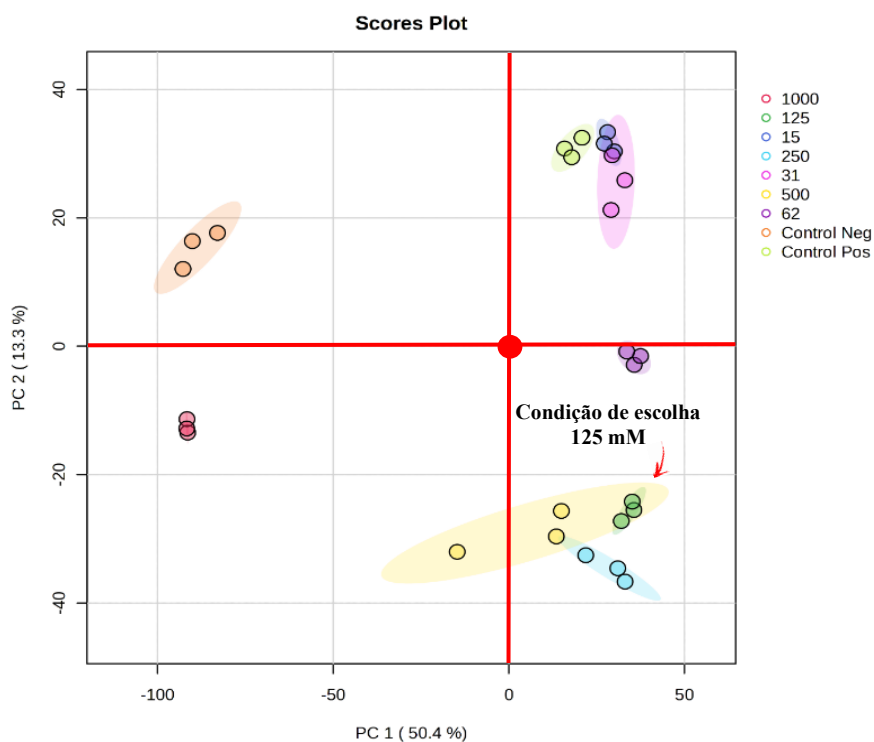
A aquisição de inúmeros compostos é tipicamente estudada com o objetivo de melhorar as condições de acesso a uma variedade de compostos com diferentes adutos. Isso se relaciona à busca por novas moléculas, o que envolve a compreensão de como elas são formadas, considerando suas rotações, catalisadores, precursores e condições físicas e químicas. Esforços numerosos para descobrir novos metabólitos secundários estão sendo realizados e, em muitos casos, esses esforços têm sido bem-sucedidos graças a abordagens moleculares ou relacionadas ao cultivo (SI et al., 2018; WANG et al., 2018).

Essa característica agora é vista como um método útil para acessar os produtos metabólicos secundários encontrados em uma variedade de microrganismos, incluindo aqueles do gênero *Talaromyces*. Um dos principais fatores estudados é a composição do meio de cultivo, pois afeta diretamente a produção dos metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos (TSUKADA et al., 2020; SKELLAM, 2019; YU e LEADBETTER, 2020). Nesse sentido, os efeitos de várias suplementações de manganês (0, 15, 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 mM) na produção desses produtos metabólicos foram avaliados em comparação com as condições de cultivo típicas no meio czapek.

O objetivo foi induzir ou inibir a produção desses metabólitos geneticamente codificados. Os dados obtidos por UPLC-HRMS foram submetidos a uma análise multivariada utilizando o software MetaboAnalyst 6.0, com as amostras normalizadas pela mediana, transformação dos dados utilizando escala logarítmica de base 10 e escalonamento dos dados centrado na mediana e dividido pelo desvio padrão de cada variável (ZARINS-TUTT et al., 2016; SOYER et al., 2014). Essa análise foi realizada para investigar os agrupamentos desses conjuntos de dados com base nos principais metabólitos afetados pelo nível de toxicidade do manganês. Há uma separação clara entre concentrações com níveis mínimos e máximos de toxicidade (Figura 22), presente na análise de componentes principais (PCA). As amostras foram divididas em quatro grupos principais: um composto pelas amostras de 0, 15 e 31 mM; outro composto pelas amostras de 62, 125 e 250 mM; outro composto pelo controle negativo e 1000 mM; e outro composto pelas amostras de 500 mM. Essa variação pode ser influenciada pela presença do metal, uma vez que as principais substâncias isoladas apresentaram variação no comportamento químico, conforme observado nos cromatogramas no intervalo de tempo de retenção que varia de 1 a 5 minutos e de 6 a 10 minutos (Figuras 13).

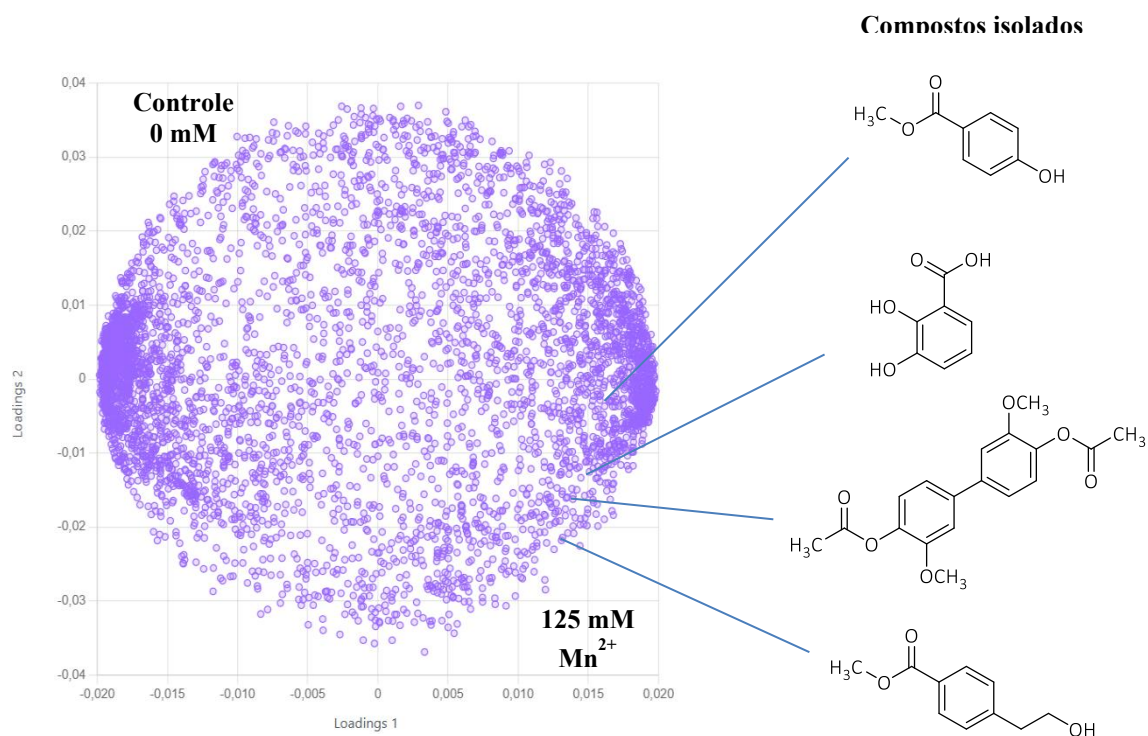
Vale destacar que esses metabólitos isolados são responsáveis pela biossíntese de diferentes produtos naturais, que podem utilizar uma unidade policetídica como cofator para sua formação, como os meroterpenoides. Essa interconexão entre policetídeos e meroterpenoides é considerada importante, pois permite a formação de compostos com amplas características estruturais, possibilitando a descoberta de novas moléculas com alto potencial biológico (ZARINS-TUTT et al., 2016; SOYER et al., 2014; ZHAI et al., 2016; PÉREZ SILVA et al., 2009; KHALILNEZHAD et al., 2014; HASAN et al., 2012; YU e LEADBETTER, 2020; KEHRES e MAGUIRE, 2003; DAS et al., 2008; MENDIL et al., 2008). A variação no conteúdo desses policetídeos de acordo com a variação na concentração de manganês pode explicar essa diferença. É importante observar que o indicador de previsibilidade do modelo utilizado indicou  $R^2$  de 0,992 e  $Q^2$  de 0,601.

O gráfico de PCA e loadings demonstrou como esses metabólitos produzidos pelo fungo *Talaromyces* sp. se comportaram neste cenário experimental. Esses achados indicam que o estresse causado pela variação da concentração de manganês resultou em alterações no perfil metabólico, levando a diferenças detectáveis pela PCA e que foram observadas no gráfico de loadings indicado pela distribuição (Figura 23). Essa relação sugere um potencial para o isolamento dessas substâncias.



**Figura 22** - Análise de componentes principais (PCA) de 27 amostras em triplicata com área de confiança de 95%.

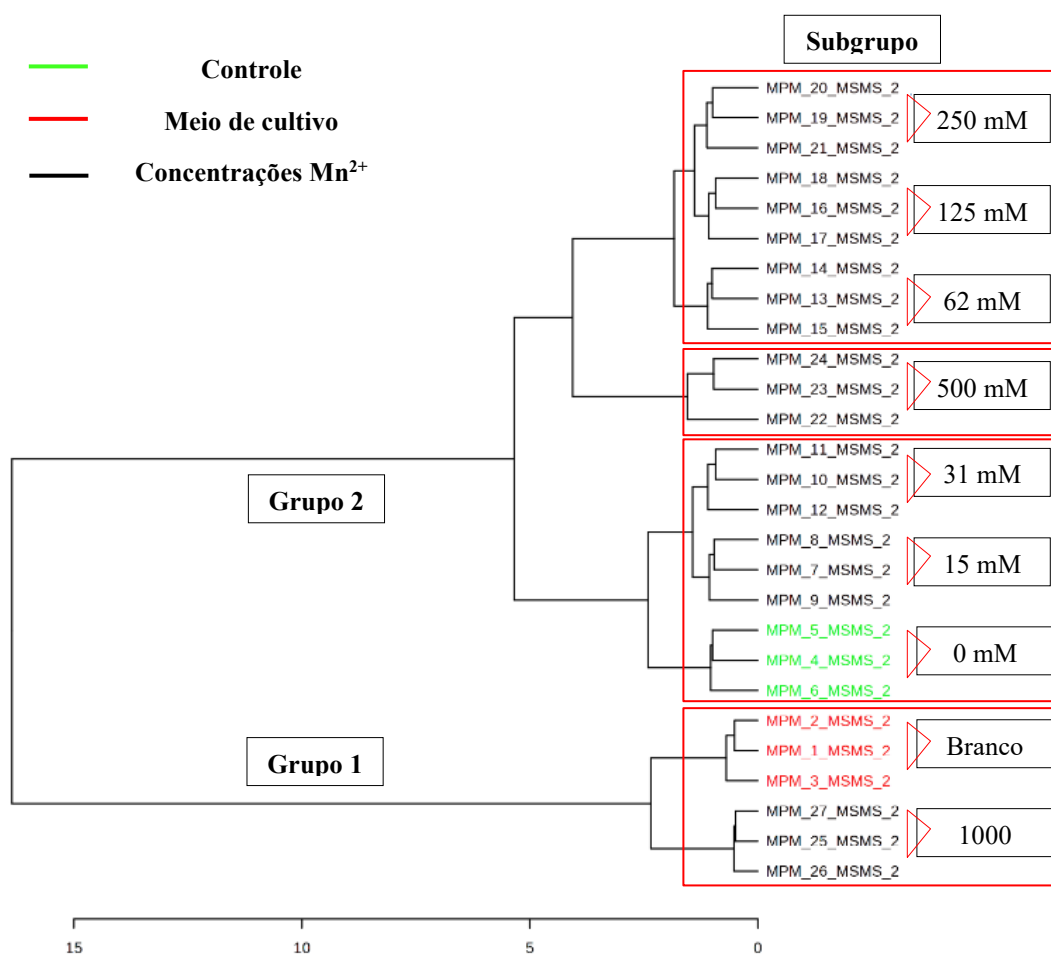
**Fonte** - Elaborado pelo autor - Metaboanalyst 6.0.



**Figura 23** - Gráfico de loadings das amostras analisadas, indicando os compostos isolados.

**Fonte** - Elaborado pelo autor - Metaboanalyst 6.0.

Seguindo os mesmos critérios de tratamento de dados utilizados na análise multivariada para a construção do gráfico de PCA, foi criado um dendrograma para visualizar a similaridade entre os grupos de amostras (Figura 24). Foi possível determinar quais grupos eram mais semelhantes entre si e se precisavam ser agrupados ou não, analisando os clusters encontrados entre os metabólitos presentes em cada amostra. Cada nó do dendrograma representa um grupo de amostras com características semelhantes, e os ramos mostram as distâncias entre eles. Ramos mais curtos representam grupos mais semelhantes, enquanto ramos mais longos representam grupos menos semelhantes. Com base nas condições experimentais, foi possível definir as distâncias euclidianas das amostras.



**Figura 24** - Dendrograma das amostras nos níveis de concentração de manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – Metaboanalyst 6.0.

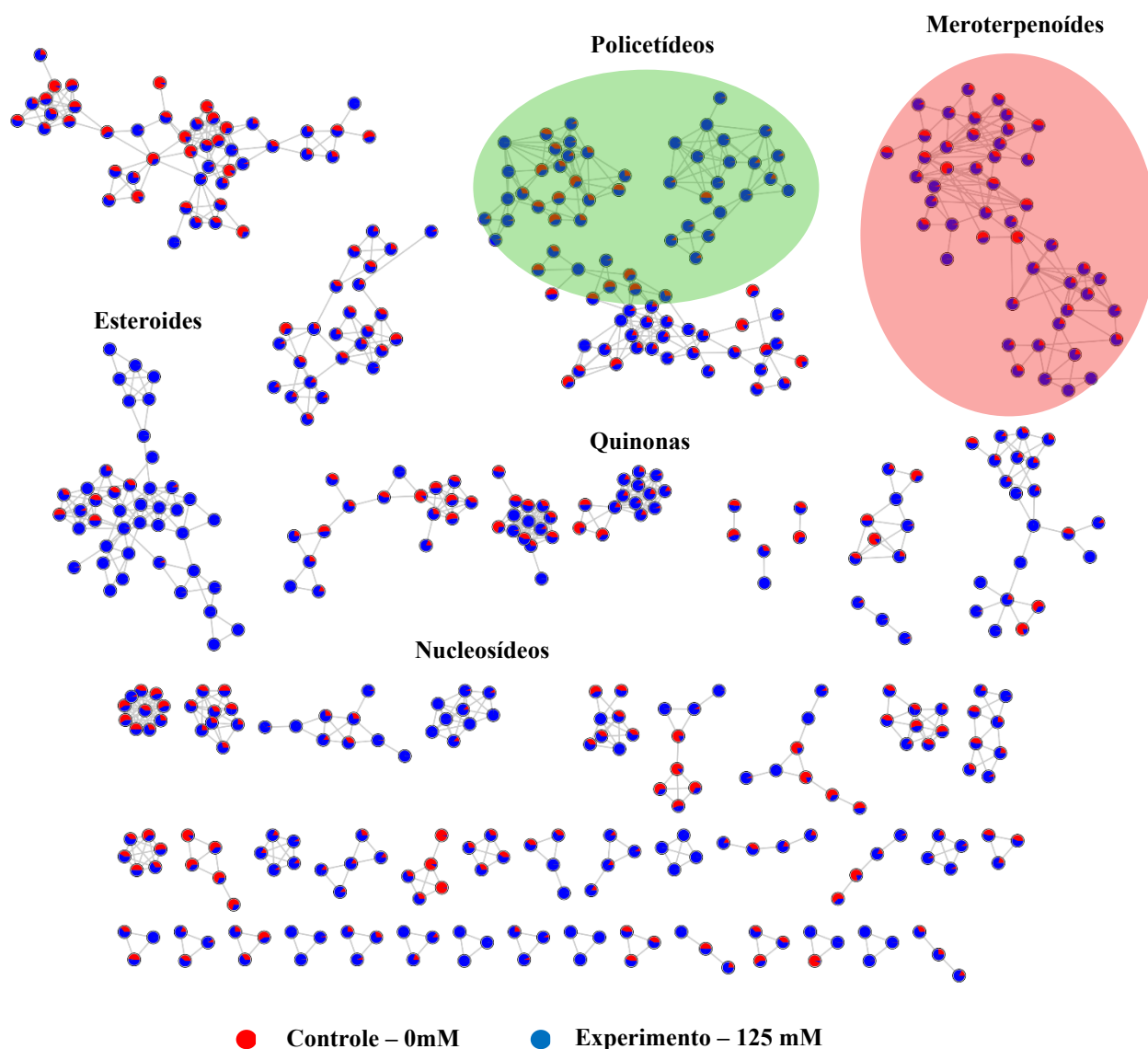
O dendrograma mostrou a existência de dois grupos principais organizados em quatro agrupamentos. No agrupamento presente no grupo 1, observa-se a equivalência de metabólitos secundários presentes no nível mais alto de concentração (1000 mM) quando comparado ao meio de cultivo, que apresenta apenas as características do meio de cultura com concentração de manganês (0 mM). No grupo 2, observou-se a presença de três grupos organizados de acordo com a distribuição dos metabólitos secundários presentes em cada nível de concentração. O dendrograma mostrou que as concentrações agrupadas foram (0, 15, 31 mM), (62, 125, 250 mM) e (500 mM). Essas relações refletem o nível de similaridade observado na análise de componentes principais e no loadings (Figura 22, 23).

A variação na concentração de manganês no meio de cultura indicou que o perfil químico desse fungo sofreu alterações distintas, que poderiam ser usadas para determinar se as amostras estão mais relacionadas a uma determinada condição experimental ou para identificar grupos de amostras comparáveis em termos de expressão metabólica. É importante enfatizar que o uso de diversos fatores, incluindo mudanças no meio de cultura, temperatura, agitação, ausência de luz, indutores metálicos, causa estresse no ambiente de crescimento do micro-organismo e pode impactar sua organização, desenvolvimento e produção de diferentes metabólitos secundários.

#### **4.7.5. Abordagem dos metabólitos produzidos pelo fungo *Talaromyces* sp. por redes moleculares**

A análise dos extratos obtidos nas concentrações experimentais utilizadas foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-HRMS), seguida da construção de redes moleculares por meio da plataforma GNPS 2 (Global Natural Products Social Molecular Networking). Os dados espectrais foram comparados com diversas bibliotecas especializadas, como NIST, NPAtlas, MoNA, MassBank e METLIN, além de ferramentas preditivas de fragmentação como SIRIUS e MS-FINDER.

Foram investigados a partir dos agrupamentos diversos metabólitos secundários, com ênfase para os policetideos e os meroterpenoides que foram isolados e anotados (Figura 25). Destaca-se a formação dos cluster contendo os compostos com policetidico marcado em verde e um cluster referente aos meroterpenoides marcado de vermelho, cujos íons precursores estão destacados na figura 26 e 27. A similaridade espectral entre os fragmentos desses íons permitiu sua organização como uma família molecular coesa. Todos os nós dentro desse grupo exibiram maior similaridade espectral entre os íons filhos, sendo, portanto, agrupados. Com essa abordagem, outros íons pertencentes ao mesmo cluster também foram anotados.

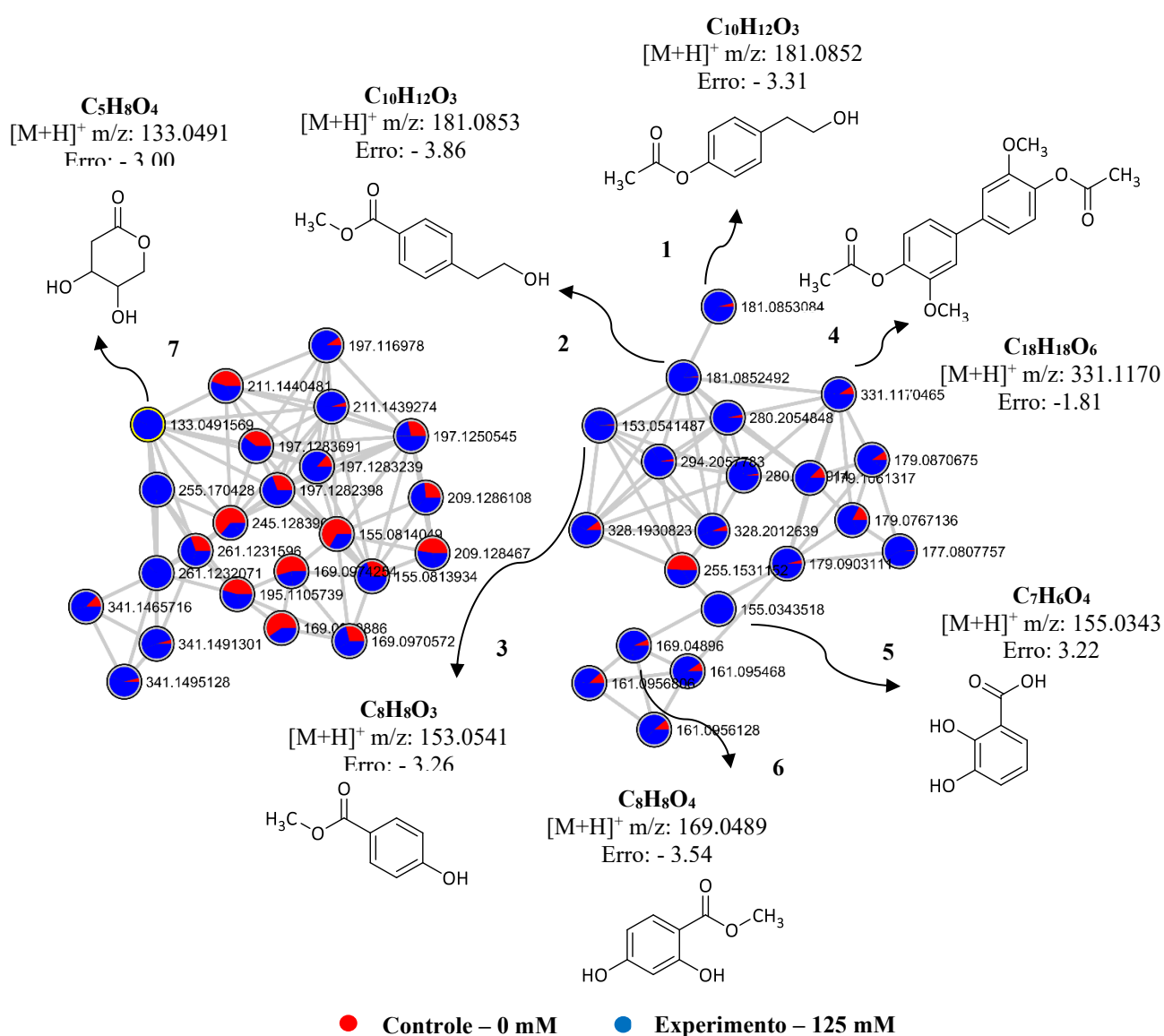


**Figura 25** - Rede molecular obtida a partir do extrato fúngico das concentrações de 0 mM (nós de cor vermelha) e 125 mM (nós de cor azul) do fungo *Talaromyces* sp., agrupada pelo software Cytoscape 3.10.2, com destaque para as principais anotações.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

A avaliação do agrupamento dos poliketideos com base no perfil espectral de MS/MS e suas semelhanças entre si (rede molecular) vinculados aos compostos isolados demonstrou ser uma boa ferramenta para a análise da distribuição, anotação e, por vezes, identificação de diferentes metabólitos que podem estar envolvidos nos processos de adaptação e desenvolvimento de diversos microrganismos. Nossos resultados indicaram a presença dos compostos isolados. Os compostos de 1 a 7, foram identificados com ótimas correspondências e são relatados na literatura como moléculas identificadas por dados de RMN, sugerindo que suas estruturas moleculares estão corretamente atribuídas.

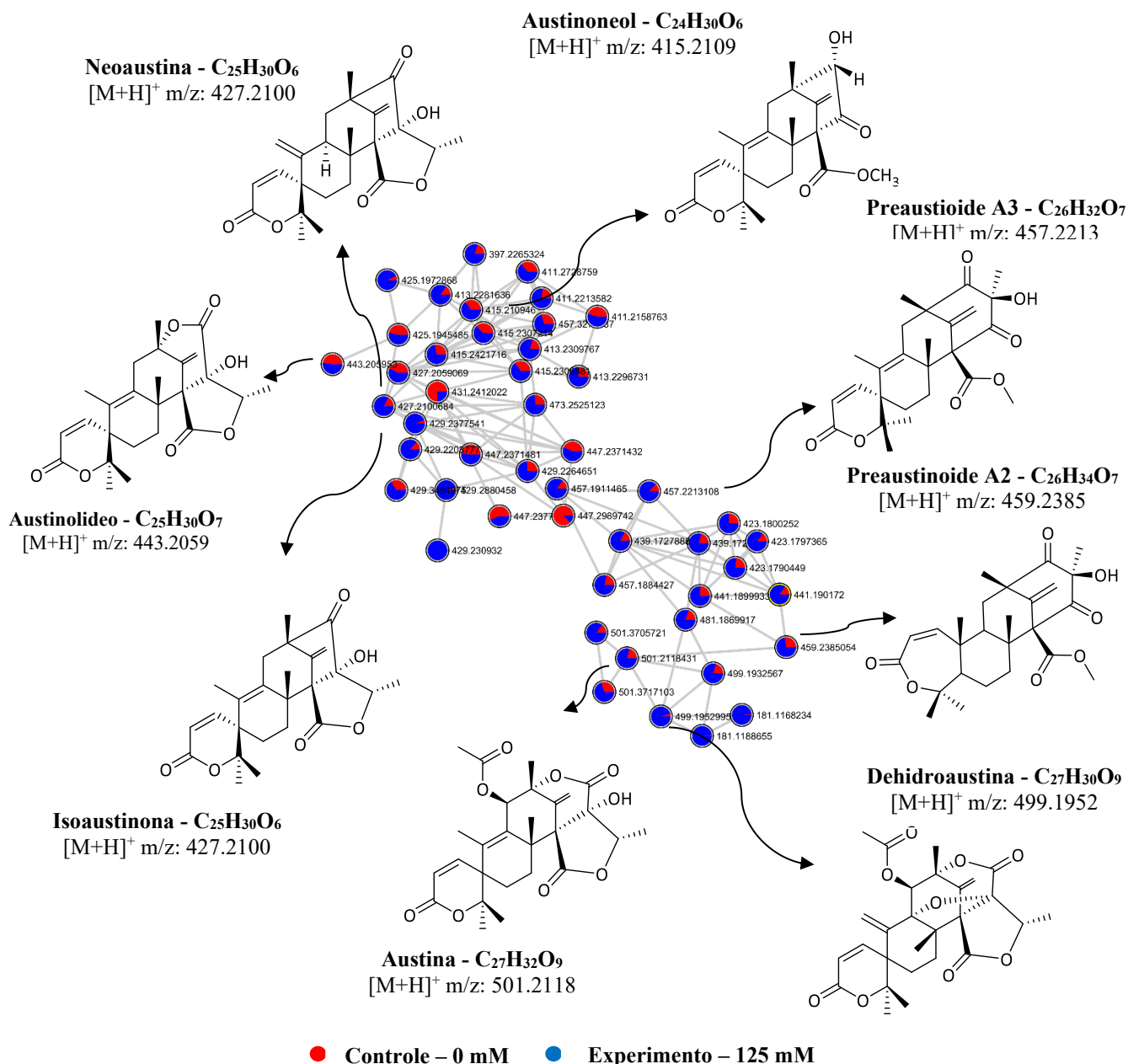
Os íons com massas nominais indicadas na rede molecular apresentaram espectros de MS/MS anotados como: 1 - Acetato de 4-(2-hidroxi-etil) fenila com fórmula molecular ( $C_{10}H_{12}O_3$ ) e m/z 181.0852, 2 - Benzoato de metila 4-(2-hidroxi-etil) com fórmula molecular ( $C_{10}H_{12}O_3$ ) e m/z 181.0853, 3 - Metil 4-hidroxibenzoato com fórmula molecular ( $C_8H_8O_3$ ) e m/z 153.0541, 4 - Diacetato de 3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4,4'-dileno com fórmula molecular ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) e m/z 331.1170, 5 - Ácido 2,3-diidroxi-benzoico com fórmula molecular ( $C_7H_6O_4$ ) e m/z 155.0343, 6 - Metil 2,4-diidroxi-benzoato com fórmula molecular ( $C_8H_8O_4$ ) e m/z 169.0489 e 7 - 4,5-diidroxitetrahydro-2H-piran-2-ona com fórmula molecular ( $C_5H_8O_4$ ) e m/z 133.0491.



**Figura 26** - Agrupamento dos policetideos isolados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo *Talaromyces* sp.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

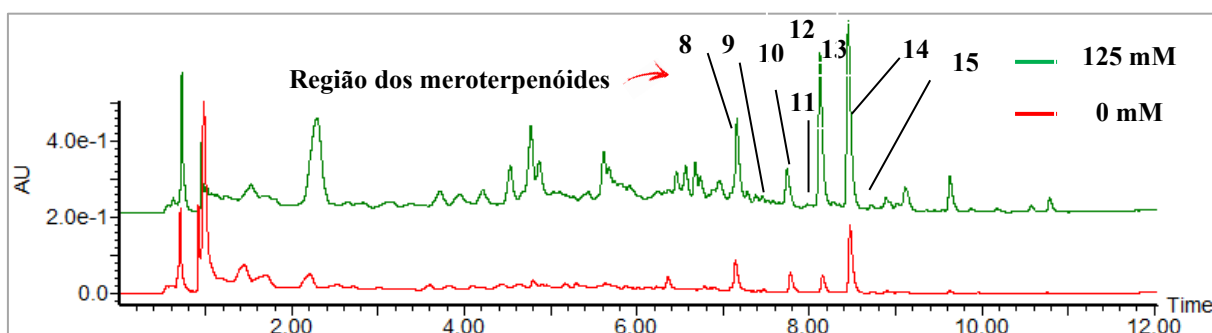
Dentre os grupos de compostos anotados, os meroterpenoides se destacaram por sua complexidade estrutural e origem biossintética mista. Esses metabólitos derivam da combinação de unidades policetílicas e terpenoides, formadas, respectivamente, pelas vias do ácido acetil-CoA e do isopreno. A integração dessas rotas metabólicas, comum em fungos do gênero *Talaromyces*, resulta em moléculas híbridas com propriedades químicas e biológicas únicas, frequentemente associadas a atividades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas.



**Figura 27** - Agrupamento dos meroterpenoides anotados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo *Talaromyces* sp.

Fonte - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

A anotação preliminar dos meroterpenoides no extrato (Figura 28) foi possibilitada pela análise dos espectros MS/MS e pela observação de padrões de fragmentação compatíveis com essa classe de compostos (Tabela 1).



**Figura 28** - Cromatograma do fungo *Talaromyces* sp. com indicação dos meroterpenoides isolados.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

A abordagem por redes moleculares permitiu a anotação de desses compostos com maior facilidade a partir do processo de deresplicação. Além disso, os policetídeos isolados também foram posicionados em clusters distintos, reforçando a eficácia da técnica na separação e agrupamento de famílias estruturais relacionadas.

Nome molecular	Tempo retenção (min)	Fórmula química	[M]	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS Modo positivo	Erro massa (ppm)
<b>Austina</b>	7.67	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	500.2040	501.2118	501.2118, 485.2169, 459.2376, 443.2063, 427.2115, 409.2010	0.00
<b>Dehidroaustina</b>	7.78	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	498.1884	499.1952	499.1952, 481.1854, 457.1852, 451.2951, 429.2271, 369.1331	- 2.00
<b>Neoaustina/ isoaustina</b>	8.11	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	426.2036	427.2100	427.2100, 409.2007, 391.1902, 369.1331, 311.1640, 281.2949	- 3.51
<b>Austinólídeo</b>	8.28	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	442.1986	443.2059	443.2059, 426.2850, 411.1802, 379.1904, 321.1485, 239.2005	- 1.12
<b>Austinoneol</b>	8.33	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	414.2036	415.2109	415.2109, 409.2009, 391.1902, 369.1331, 329.1744, 285.1595	- 1.44
<b>Preaustinoide A2</b>	7.91	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	458.2299	459.2385	459.2385, 441.2274, 427.2117, 409.2012, 391.1907, 369.1335	1.74
<b>Preaustinoide A3</b>	7.97	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	456.2142	457.2213	457.2213, 443.2063, 423.1803, 389.1747, 369.1332, 279.2794	- 1.53

**Tabela 1** - Tabela dos meroterpenoides desreplicados na rede molecular.

**Fonte** – Elaborado pelo autor.

Com isto, a aplicação integrada de UPLC-HRMS, bibliotecas espectrais, ferramentas de predição estrutural e a construção de redes moleculares revelou-se fundamental para a elucidação do perfil químico do fungo *Talaromyces* sp., destacando a diversidade de metabólitos secundários e a presença de classes promissoras como os meroterpenoides. A adição das estruturas isoladas no presente estudo contribui ainda mais para a validação dessa abordagem e para o entendimento da química de fungos extremófilos.

#### **4.8. Conclusões**

Com base nos achados deste estudo, pode-se afirmar que o fungo *Talaromyces* sp. é capaz de se adaptar a diversas concentrações de manganês com o intuito de controlar os níveis de alta toxicidade. É importante enfatizar que essa adaptação não se deu devido a um processo de degradação enzimática em níveis muito elevados.

É crucial destacar que esse fungo foi capaz de tolerar altas concentrações de manganês (até 500 mM), indicando que também pode ser utilizado em processos biotecnológicos voltados à remoção desse metal de áreas contaminadas. Essa característica foi evidenciada por uma mudança na coloração da biomassa formada, indicando que o óxido de manganês presente na solução foi incorporado à biomassa. Esse mecanismo é estabelecido pela produção de diversas enzimas, como a MnP, que podem auxiliar o microrganismo em ambientes com alta toxicidade por manganês.

Apesar de *Talaromyces* sp. ter demonstrado grande capacidade de adaptação aos diferentes níveis de concentração aos quais foi exposto, sempre haverá uma concentração capaz de comprometer sua maquinaria biológica, impedindo-o de se adaptar a condições desfavoráveis. Isso é intrigante, pois a indução ou repressão de diversas enzimas pode impactar diretamente a biossíntese de produtos naturais produzidos por esse fungo.

Como complemento, o uso do processo de dereplicação dos dados gerados por espectrometria, utilizando ferramentas que auxiliam na busca por diferentes metabólitos envolvidos na dinâmica experimental, torna-se necessário para proporcionar maior facilidade no rastreamento desses diferentes metabólitos.

## 5. Capítulo 2 – O impacto do Mn<sup>2+</sup> na atividade antioxidante dos metabólitos produzidos por *Talaromyces* sp. avaliado por um método adaptado de DPPH-UPLC e análise por GC-MS

---

### 5.1. Introdução

Durante a última década, diversos estudos na literatura têm proposto estratégias para mitigar o desafio contínuo de obter compostos produzidos por microrganismos, visando a descoberta de novos produtos naturais bioativos. A ideia geral é induzir a expressão de clusters de genes biossintéticos que não estão ativos em condições padrão de cultivo. Compreender os efeitos de cada nutriente adicionado ao meio de cultivo no metabolismo e na fisiologia microbiana pode ampliar o conhecimento sobre o processo biossintético de metabólitos secundários e aumentar a diversidade de compostos com diferentes propriedades biológicas para aplicações biotecnológicas. Diversos trabalhos têm mostrado, por exemplo, a forte atividade antioxidante apresentada por compostos fenólicos, os quais podem ser eficazes na prevenção da formação de radicais livres associados ao estresse oxidativo (JIN *et al.*, 2023; ARRUDA *et al.*, 2022; DANTAS *et al.*, 2022).

O crescimento e o metabolismo dos fungos são significativamente influenciados pelas condições ambientais às quais estão expostos. Interações bióticas com outros microrganismos, por exemplo, podem ativar diferentes genes biossintéticos que promovem a produção de novos metabólitos secundários. Embora essa estratégia seja empírica, tem demonstrado resultados promissores (Conde-Martínez *et al.*, 2019).

Tipicamente, a composição do meio de cultura e fatores abióticos, como a presença de metais, variações de temperatura, umidade e luz, são os principais fatores de influência. Por exemplo, acredita-se que a presença de metais durante o crescimento fúngico interaja com proteínas da membrana celular, resultando em desnaturação enzimática, interrupção da proliferação celular, morte da população microbiana e alterações na produção metabólica, embora o mecanismo exato ainda não seja bem compreendido. De qualquer forma, para resistir a esses desafios causados pelos metais, os microrganismos desenvolvem diferentes estratégias para garantir sua sobrevivência. Essas adaptações geralmente estão acompanhadas de modificações fisiológicas e, possivelmente, da regulação genética para novas vias metabólicas.

Os metabólitos secundários fúngicos têm recebido grande atenção da comunidade científica voltada para produtos naturais devido aos seus profundos impactos na

saúde humana e no bem-estar. Embora algumas substâncias fúngicas possam afetar negativamente os animais ao atuarem como toxinas, outras têm potencial para tratar doenças graves, como câncer e imunossupressão. Alguns produtos naturais fúngicos apresentam atividade antioxidante, ajudando a proteger contra os danos causados pelos radicais livres, que são espécies químicas instáveis capazes de levar ao estresse oxidativo, causando danos às células e tecidos (Jin et al., 2023; Arruda et al., 2022; Dantas et al., 2022).

Nosso grupo recentemente iniciou um programa para investigar o potencial de fungos coletados em minas de metais no estado do Pará, Brasil, para a produção de importantes produtos naturais bioativos. Entre os fungos coletados, encontramos espécies do gênero *Talaromyces*. Esse gênero inclui espécies que produzem diversos metabólitos secundários com atividades biológicas, como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes.

Nossa contribuição com este estudo foi a avaliação da influência dos cátions de manganês na produção de compostos fenólicos. Nossa hipótese era que o  $Mn^{2+}$  poderia alterar significativamente o sistema de oxirredução do fungo, resultando na diferenciação da produção de fenólicos. Além disso, nossa abordagem explorou a adaptação e padronização de um método utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos fúngicos contra o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (Kumara et al., 2018; Kedare e Singh, 2011; Flieger e Flieger, 2020; Oliveira, 2015; Vek et al., 2023; Xiao et al., 2020; Baliyan et al., 2022; Tatarczak-Michalewska e Flieger, 2022).

A composição dos extratos foi estudada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), com auxílio de redes moleculares sugeridas pela plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) (Nothias et al., 2020; Pilon et al., 2021; Watrous et al., 2012; Aksenov et al., 2017; Chacon et al., 2021; Conde-Martínez et al., 2019).

## 5.2. Procedimentos experimentais gerais

A cromatografia em escala analítica foi realizada utilizando um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC) da Waters, modelo Acquity M-Class, equipado com uma coluna CSH (C18 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 100 mm) e um Detector de Arranjo de Diodos (DAD). A fase móvel consistiu em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O modo de eluição utilizado foi isocrático, com uma proporção de 35%A / 75%B, tempo de análise de 6 minutos, fluxo de 0,4 mL/min, volume de injeção de 5,0  $\mu$ L, temperatura da coluna de 25°C e detecção a 330 nm.

Para as análises de GC-MS, cada extrato fúngico passou por um procedimento de derivatização. Resumidamente, 200 µL de clorotrimetilsilano foram adicionados a 1 mg de cada extrato (Controle, HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH), juntamente com 300 µL de hexametildisilazano, e deixados por 30 minutos a 60°C em banho ultrassônico. Após o resfriamento, foram adicionados 1 mL de ciclohexano e 1 mL de água Milli-Q. A fase hexânica foi transferida para um frasco contendo sulfato de sódio para remover qualquer resíduo de água. A alíquota final foi então transferida para os frascos de injeção.

Os extratos fúngicos, obtidos com e sem a adição do cátion manganês, foram derivatizados e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (QP-2010-plus, Shimadzu). O volume de injeção foi de 1 µL, no modo splitless. O forno cromatográfico estava equipado com uma coluna de sílica fundida Restek-Rxi-5ms (J&W Scientific, 10 m x 0,10 mm x 0,10 µm). Hélio foi utilizado como gás de arraste, com uma velocidade linear de 42 cm/s. A temperatura do injetor foi ajustada para 250°C. Inicialmente, a coluna foi mantida a 70°C por 1 minuto, seguida por um aumento de temperatura de 20°C/min até 320°C, sendo mantida nesse valor por 2 minutos. O tempo total de análise foi de 15 minutos. O espectrômetro de massas operou com temperaturas da fonte de íons e da interface ajustadas para 240 e 250°C, respectivamente; os íons positivos foram escaneados na faixa de 70 a 670 m/z após 3 minutos da injeção.

Os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol eram de grau analítico e foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil) ou Quimis (Indaiatuba, SP, Brasil). Para as separações por UPLC, a água e a acetonitrila eram de grau cromatográfico (Panreac, Barcelona, Espanha), sendo que a água foi purificada em um sistema Milli-Q (Elga) antes do uso.

Para o crescimento fúngico em placas de Petri, utilizou-se meio batata-dextrose-ágar (BDA, da Acumedia, Phillipsburg, New Jersey, EUA). O meio de cultura Czapek, composto por dextrose (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> (1,0 g/L), MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L) e FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (0,01 g/L), foi utilizado como meio de cultivo de referência, ao qual foram adicionadas diferentes concentrações de MnCl<sub>2</sub>. Os frascos utilizados foram esterilizados em uma autoclave vertical Phoenix a uma pressão de 1 atm e temperatura constante de 121°C por 15 minutos. O fungo foi cultivado sob agitação a 120 rpm, 25°C, em uma incubadora refrigerada Tecnal - TE - 421. Todo o experimento foi conduzido sob condições assépticas em uma cabine de segurança biológica classe II A1 da Filterflux. Os extratos foram obtidos utilizando um banho ultrassônico da marca Unique - USC1650.

Todos os demais reagentes químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical, Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil), Neogen (Lansing, Michigan, EUA), J. T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA) e Synth (Diadema, SP, Brasil), e foram utilizados sem purificação adicional.

### **5.3. Isolamento do micro-organismo**

O fungo *Talaromyces* sp. foi isolado do solo coletado a 150 metros da geleira Collins (62° 09.794'S 58° 55.560'W) na Ilha King George, Antártica. Após o isolamento, o fungo foi preservado em água esterilizada e depositado no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), Instituto de Ciências Biológicas, sob o código LAMAI2549, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, Brasil. Também está depositado no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Brasil (código LaBioMMi834). O fungo foi identificado com base no sequenciamento de ITS (Internal Transcribed Spacer 1 - ITS 1, 5.8S e ITS 2).

### **5.4. Crescimento do micro-organismo, adição de $Mn^{2+}$ cultivado e extração**

Para o crescimento do fungo *Talaromyces* sp., placas de Petri contendo o meio BDA foram preparadas e esterilizadas em uma autoclave vertical. Após a esterilização, as placas foram resfriadas até a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Em seguida, fragmentos do microrganismo, com cerca de 5 mm de tamanho, foram usados para inocular as placas sob uma cabine de fluxo laminar. As placas foram incubadas por um período de 10 dias. Essas placas foram utilizadas para preparar suspensões de esporos para experimentos subsequentes.

A preparação da suspensão de esporos foi realizada usando um laço de platina, onde uma certa quantidade de células fúngicas foi retirada das placas e transferida para um tubo Falcon (50 mL) contendo cerca de 30 mL de água destilada autoclavada e misturada utilizando um vortex. A contagem de esporos foi determinada usando uma câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de  $10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC).

Para avaliar a influência do cátion manganês no metabolismo deste fungo, o meio Czapek foi modificado substituindo a quantidade de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  por  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , estabelecendo uma concentração de 125 mM deste cátion. Após a preparação, as soluções foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL, com um volume total de 70 mL por frasco. Os frascos foram esterilizados em uma autoclave vertical Phoenix a uma pressão de 1 atm e

temperatura constante de 121°C por 15 minutos, e então inoculados sob condições assépticas por um período de 15 dias.

Após o período de crescimento, as séries em triplicata foram estabelecidas de acordo com o pH ajustado no procedimento de extração quimicamente ativa. Na Série 1, o método de extração envolveu o uso de uma solução de HCl 1,0 M. Essa solução foi utilizada para reduzir o pH do extrato para a faixa de 4,5 a 5,0. Na Série 2, a extração foi realizada utilizando uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 M. Na Série 3, uma solução de KOH 1,0 M foi empregada. Essas soluções foram utilizadas para aumentar o pH dos extratos para a faixa de 7,5 a 8,0. Em seguida, 100 mL de acetato de etila foram adicionados a cada frasco e deixados em um banho ultrasônico por 30 minutos. Esta etapa de extração foi repetida três vezes e as soluções de acetato de etila foram combinadas para cada replicado.

O conteúdo total dos frascos foi filtrado através de um funil de Büchner; a camada superior (solução de acetato de etila) foi então removida e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> antes de ser evaporada sob pressão reduzida. Após a obtenção dos extratos, o conteúdo total foi dividido em quantidades iguais para análise por cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

## **5.5. Construção da rede molecular**

Os dados de GC-MS foram inicialmente avaliados usando o software GCsolution (Shimadzu). Redes moleculares de dados espectrais de massa foram criadas utilizando a plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Como os dados de massa dos experimentos usaram uma fonte de ionização por impacto eletrônico (EI), os resultados não incluíram a seleção de íons precursor. Portanto, a desconvolução espectral foi necessária. Para isso, os dados de GC-MS foram analisados e processados utilizando o pacote Mzmine 2.53.

A detecção de massa foi avaliada de 3,0 a 15 minutos no modo centróide com nível de ruído de  $1,0 \times 10^3$ . A detecção de picos foi determinada usando o método ADAP Chromatogram Builder, com os seguintes parâmetros: tamanho mínimo do grupo de 5 varreduras, limite de intensidade do grupo de  $1,0 \times 10^3$ , intensidade mínima mais alta de  $1,0 \times 10^3$  e tolerância de m/z de 0,75 m/z. A desconvolução do cromatograma usou o algoritmo Wavelets (ADAP) com um limite de S/N de 7, estimador de S/N na janela de intensidade SN, altura mínima da característica de 1, limiar de coeficiente/área de 30, duração do pico de 1,00, intervalo da onda RT de 0,15 e cálculo do centro de m/z na mediana.

A deconvolução espectral empregada foi a resolução multivariada de curvas com largura da janela de desconvolução (min) de 0,15, tolerância de tempo de retenção (min) de

0,02 e número mínimo de picos definido como 1. O alinhamento foi realizado pelo alinhador ADAP (GC) com confiança mínima (0 a 1) de 0,05, tolerância de tempo de retenção de 0,1, tolerância de m/z de 0,1, limiar de pontuação (0 a 1) de 0,75, peso da pontuação (0 a 1) de 0,1 e similaridade de tempo de retenção com correlação cruzada. A avaliação dos picos ausentes foi definida utilizando o módulo Gap Filling no Peak Finder Multithreaded com tolerância de intensidade de 0,1%, tolerância de m/z de 0,2 m/z e tolerância de tempo de retenção de 0,1 minutos.

Os arquivos foram processados utilizando o algoritmo de rede espectral (GNPS) em um arquivo MGF dos espectros desconvoluídos pelo mzMine 2.53, uma tabela de quantificação dos picos gerados nesse processamento e uma tabela de metadados com informações sobre as amostras, como tipo de amostra, tipo de indução e método de extração. No GNPS, os dados foram ajustados da seguinte forma: tolerância de massa dos íons fragmentados de 0,5 Da; picos correspondentes mínimos de 5; limiar de pontuação de 0,5. As opções de pesquisa avançada incluíam: classe da biblioteca bronze; histórico superior por espectro de 1; e uso da biblioteca espectral (GNPS). Nas opções avançadas da rede: pares mínimos de cosseno de 0,6 e rede TopK de 10. A visualização e formação da rede foram realizadas utilizando o software Cytoscape v.3.10.2.

## **5.6. Capacidade de avaliação dos radicais livres (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila - DPPH) por UPLC-DAD**

A quantificação do padrão de varredura do radical DPP• foi realizada utilizando o método da curva analítica linear com uma solução de DPPH variando de 0,0125 a 0,20 mM. A seguinte equação foi utilizada para a avaliação  $[DPPH/DPP•, mM] = AP (DPPH/DPP•, DC) - b/\delta$ , onde AP (DPPH/DPP•, DC) é a área do pico do radical DPPH ou sua forma reduzida (DPPH) em diferentes concentrações, (b) é a interseção e ( $\delta$ ) é a inclinação da curva analítica. Além disso, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados com base na razão entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, utilizando as seguintes equações:  $LD = (3,3 \times \sigma/S)$  e  $LQ = (10 \times \sigma/S)$ , onde o desvio padrão da resposta ( $\sigma$ ) é determinado a partir do desvio padrão da interseção da linha de regressão (a interseção da equação), enquanto (S) representa a inclinação da curva de calibração (a inclinação da curva analítica). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## **5.7. Teste de atividade dos radicais livres (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila – DPPH)**

Para este estudo, uma solução padrão de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi preparada dissolvendo 7,89 mg em 100 mL de metanol analítico (0,20 mM) em um frasco volumétrico. A solução final foi transferida para uma garrafa âmbar e armazenada a 5°C. Soluções metanólicas de rutina, ácido gálico e ácido ascórbico a 1,0 mg/mL foram usadas como padrões antioxidantes. Soluções dos extratos fúngicos obtidos quimicamente com HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH (todos a 1,0 M) foram utilizadas para comparação com os padrões de referência. A concentração dos extratos foi de 5,0 mg/mL.

Após preparar a solução padrão de DPPH, uma alíquota de 9,375 mL foi retirada para preparar a solução de trabalho. Esta solução foi preparada em um frasco volumétrico de 25 mL, resultando em uma concentração molar final de 0,075 mM. Esta solução foi preparada e utilizada somente no dia da análise. A atividade de varredura de radicais foi determinada após adicionar 100 µL dos extratos de teste a 1000 µL da solução de trabalho de DPPH. As medições foram feitas após 30 minutos de reação em ambiente escuro, a uma temperatura controlada de 25°C.

## **5.8. Resultados e discussões**

### **5.8.1. Efeito do cátion manganês no crescimento do fungo *Talaromyces* sp.**

Em estudos anteriores, a tolerância de *Talaromyces* sp. a diferentes concentrações de manganês foi avaliada, com concentrações variando de 0 a 1000 mM. Essa avaliação foi necessária para determinar a faixa de concentração que melhor representava variações metabólicas em comparação à sua biomassa. Observou-se que as variações foram mais bem representadas na concentração de 125 mM, quando comparadas à concentração de referência de 0 mM. Notou-se que, nessa concentração, o fungo desenvolve mecanismos de adaptação para reduzir os níveis de toxicidade apresentados por esse cátion. Certos mecanismos de proteção envolvem enzimas utilizadas para lidar com o excesso de manganês; entretanto, em concentrações acima de 125 mM, essas enzimas perdem sua capacidade de desintoxicação, e o fungo deixa de expressar crescimento.

É importante destacar que essa evolução foi definida pela observação da biomassa seca em comparação aos perfis químicos apresentados em cada condição experimental. Foi possível observar que o aumento da concentração de manganês até 62 mM resultou em um aumento de 15% na biomassa fúngica em comparação à condição de referência.

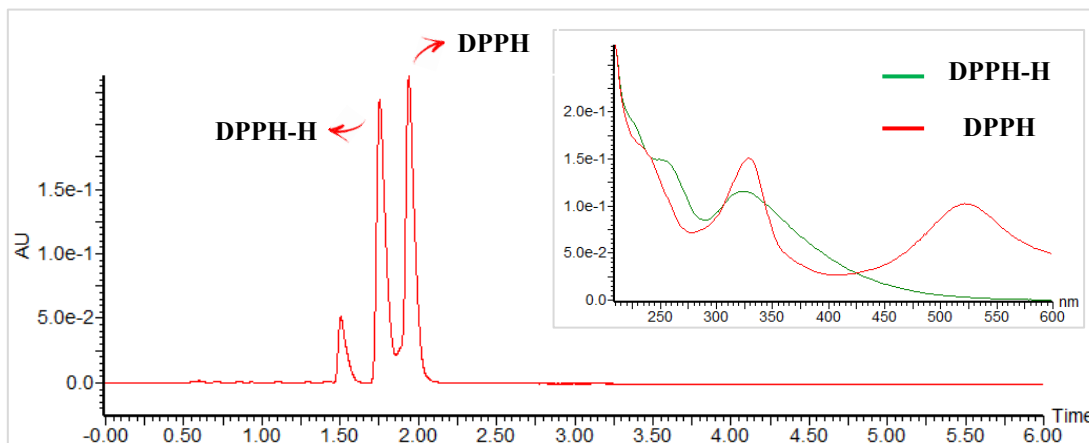
Essa tendência é revertida em concentrações superiores a 125 mM, apresentando uma redução de até 40% na produção de biomassa.

Essa inibição do crescimento fúngico em relação ao manganês depende de inúmeros fatores, como a presença de outros cátions, umidade e temperatura adequadas, além de níveis de pH aceitáveis. Embora haja uma variabilidade considerável nos níveis de tolerância ao manganês, diversos estudos na literatura indicam que sempre haverá uma concentração mínima capaz de comprometer o sistema biológico desses microrganismos. Isso é relevante para o nosso trabalho, uma vez que a inibição ou indução de novas enzimas pode impactar a biossíntese de diferentes compostos produzidos por esse fungo.

### **5.8.2. Avaliação de um método cromatográfico para análise dos radicais livres de DPPH por UPLC**

Embora o método espectrofotométrico para avaliação dos radicais DPPH seja amplamente utilizado para aferir a atividade antioxidante, ele pode apresentar limitações, especialmente quando aplicado a matrizes coloridas. Por exemplo, pigmentos presentes em alimentos, plantas e materiais biológicos podem interferir na leitura precisa dos radicais, dificultando a análise da atividade antioxidante nas amostras utilizadas. Portanto, um método analítico mais específico e sensível é necessário para avaliar a atividade sequestrante dos radicais livres DPPH. Foi desenvolvido um método cromatográfico para realizar o rastreamento do teste de avaliação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O método utilizou uma coluna C18 e uma fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila e água, com um tempo de corrida de 6 minutos. A fase móvel foi extensivamente otimizada para melhorar os níveis de resolução dos picos do radical e de sua forma reduzida.

De acordo com as condições de análise definidas, a solução de DPPH foi avaliada (Figura 29). Os picos foram bem separados, com boa resolução e sem a presença de interferências que pudessem dificultar a interpretação dos resultados. Observou-se que a forma reduzida (DPPH-H) é sempre eluída mais rapidamente em comparação à forma de radical livre. Ambas as formas do DPPH podem ser identificadas por meio de espectros UV-Vis na faixa de 200 a 600 nm, devido à influência do detector de arranjo de diodos (DAD). Essa avaliação foi útil para selecionar um comprimento de onda ótimo para o método. Para a análise final do teste, foi escolhido o comprimento de onda de 330 nm, pois ambas as formas apresentaram absorvância equivalente nessa faixa.

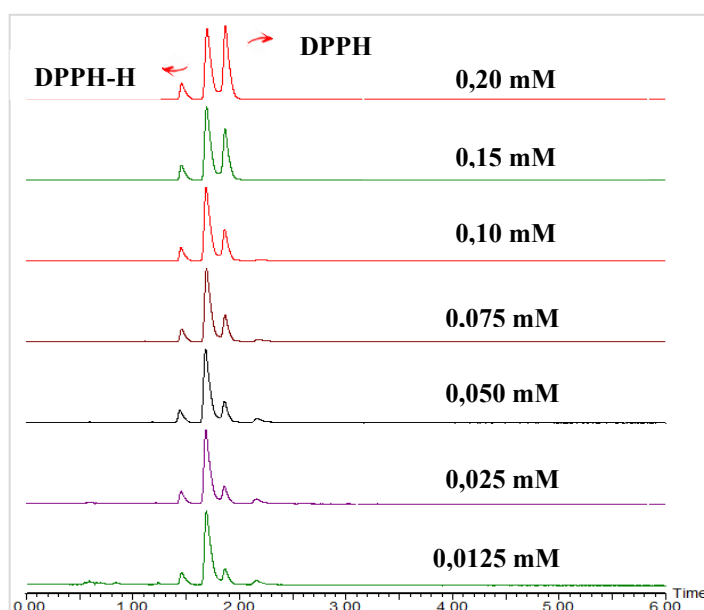


**Figura 29** - Cromatograma de DPPH obtido por eluição isocrática com 70% de ACN / 30% de água em 6 minutos (detecção,  $\lambda = 330$  nm), (DPPH-H, verde) e (DPPH, vermelho).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Os dados mostraram que as áreas dos picos variaram de acordo com o nível de concentração estudado. A área do pico do radical DPPH apresentou uma diminuição mais acentuada com a redução de sua concentração, enquanto a área do pico de sua forma reduzida (DPPH-H) apresentou o efeito oposto com a diminuição da concentração.

A análise cromatográfica mostrou que os picos do par (DPPH/DPPH-H) estavam presentes nas diferentes concentrações que estabeleceram a curva analítica (Figura 30). Assim, a avaliação do DPPH nessas condições foi realizada para determinar a quantidade a ser utilizada nos testes antes e depois da combinação com os padrões de referência e os extratos estudados.



**Figura 30** - Curva analítica na faixa linear de 0,0125 a 0,20 mM.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A calibração da curva padrão considerou a determinação das áreas dos picos para o par (DPPH/DPPH-H) em 7 pontos com concentrações variando de 0,0125 a 0,20 mM. As áreas foram determinadas a partir da avaliação das amostras em triplicata. Além disso, os ajustes obtidos a partir da curva de calibração (Tabela 2) apresentaram linearidade satisfatória na faixa de trabalho, com bons limites de detecção e quantificação.

Pico	Equação da curva	R <sup>2</sup>	*LD	*LQ	Faixa (mM)
DPPH	$Y = 77168x - 1470,8$	0,993	0,06290	0,19060	0,0125 – 0,20
DPPH-H	$Y = 87230x + 898,02$	0,997	0,03397	0,10295	0,0125 – 0,20

\*LD – limite de detecção e \*LQ – limite de quantificação

**Tabela 2** - Ajustes obtidos na curva de calibração.

Vale ressaltar que a utilização de um método cromatográfico com a maior parte da composição constituída por solvente orgânico garante um nível de estabilidade para esse radical. Outros fatores, como maior teor de água na fase móvel, adição de ácido à fase móvel e a concentração inicial dos radicais DPPH, também são considerados fatores que podem influenciar a estabilidade desse radical (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022).

### **5.8.3. Avaliação das áreas dos picos do par DPPH/DPPH-H e cálculo da atividade antioxidante**

Para o estudo comparativo, dois controles foram utilizados. O primeiro controle foi denominado (controle negativo), consistindo apenas do padrão de DPPH em metanol, e o segundo controle foi denominado (controle positivo), composto por substâncias com alto potencial antioxidante: rutina, ácido gálico e ácido ascórbico. Todos foram preparados individualmente. Os extratos utilizados foram obtidos a partir de uma extração quimicamente ativa que utilizou ácido clorídrico (HCl), carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e hidróxido de potássio (KOH), visando os compostos fenólicos produzidos pelo fungo *Talaromyces* sp. Essa característica foi importante para avaliar a influência do indutor metálico (manganês) presente no meio de cultivo desse fungo em relação à produção ou inibição desses compostos.

Para o teste antioxidante, foi necessário estabelecer uma concentração inicial para os padrões e extratos. Uma concentração inicial de 1,0 mg/mL foi definida para os padrões e 5,0 mg/mL para os extratos. Para o estudo da eficiência antioxidante, foi definida uma concentração de 0,075 mM de DPPH, que representa a concentração intermediária entre os pontos mais alto e mais baixo da curva de calibração. A atividade de eliminação dos radicais livres do DPPH foi avaliada utilizando a seguinte equação:

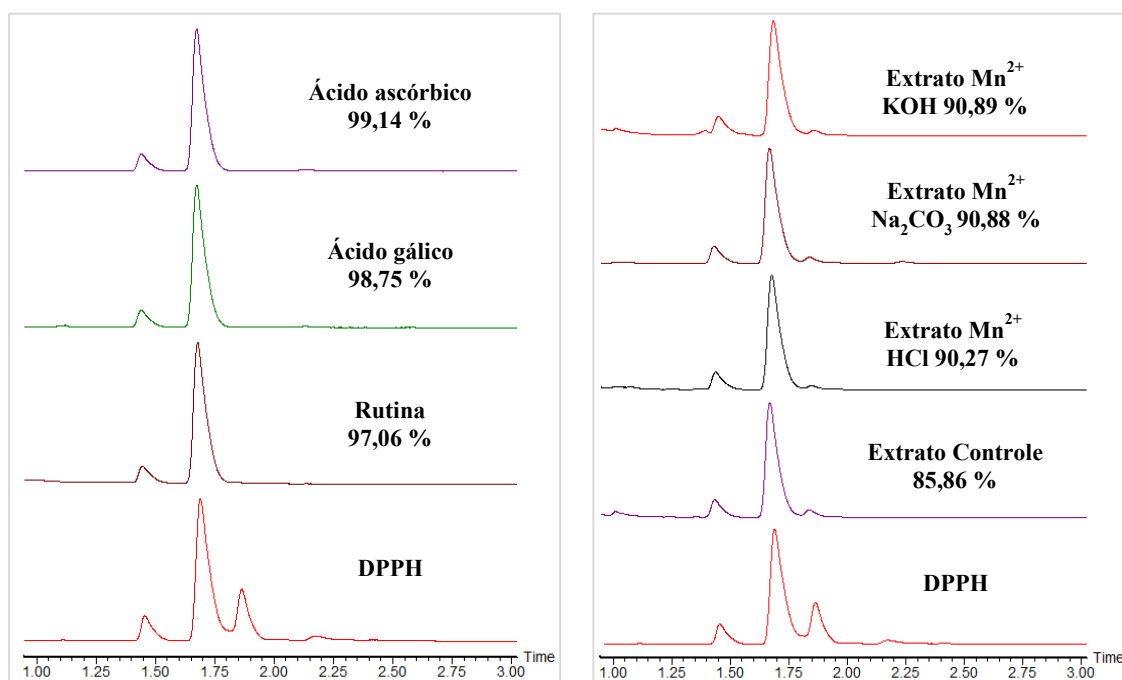
$$\% \text{ de redução da área do pico de DPPH ou DPPH-H} = \frac{(Aaa - Ada)}{(Aaa)} \times 100$$

Onde: Aaa = área do pico de DPPH / DPPH-H antes da adição do antioxidante e Ada = área do pico de DPPH / DPPH-H após a adição do antioxidante (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022).

O método utilizando o radical DPPH envolve a avaliação das propriedades antioxidantes de diversas substâncias químicas capazes de sequestrar essa espécie radicalar. O radical DPPH possui coloração violeta, com absorção em comprimento de onda máximo de 517 nm. Ele é geralmente utilizado para identificar doadores de hidrogênio em diferentes matrizes químicas. Após reagir com um antioxidante, o radical DPPH é reduzido, formando o 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH-H), que possui coloração amarela. (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022). Assim, o consumo do radical DPPH pode ser monitorado pela diminuição da área do pico desde o início da reação (Figura 32).

As medições indicaram que a área do pico do radical DPPH é significativamente afetada quando esse radical é combinado com uma substância de alto potencial antioxidante (Figura 31 a). Em comparação com os três padrões, observa-se um maior potencial para o ácido ascórbico (99,14%) e o ácido gálico (98,75%), seguidos da rutina (97,06%). Quando essa relação experimental é associada aos extratos obtidos a partir de uma extração quimicamente ativa, observa-se um efeito menos eficaz em comparação aos padrões (Figura 31 b).

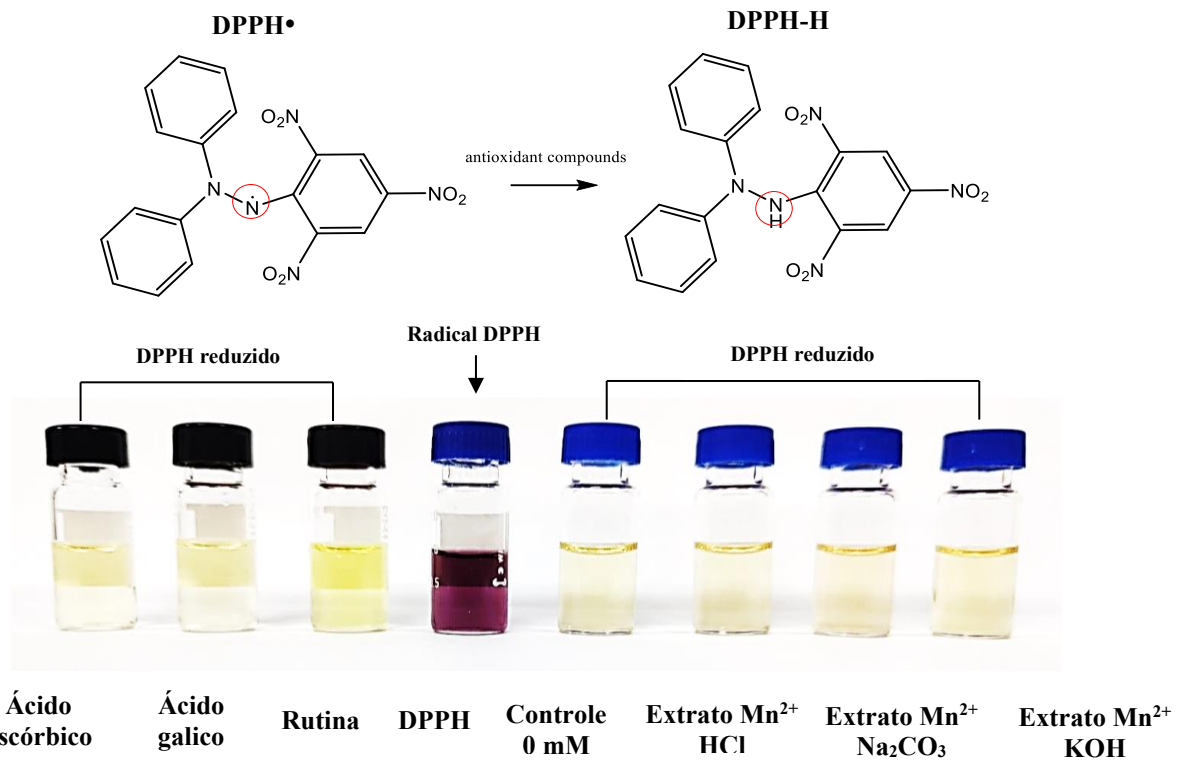
No entanto, o percentual de sequestro do radical DPPH por esses extratos é considerado elevado para a concentração aplicada do radical DPPH (0,075 mM). O extrato controle apresentou um percentual de inibição do radical DPPH de 85,86%, enquanto os extratos de HCl (90,27%), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (90,88%) e KOH (90,89%) atingiram, respectivamente, 90,27%, 90,88% e 90,89%.



**Figura 31** - Cromatogramas obtidos dos padrões de ácido ascórbico, ácido gálico e rutina e extratos com e sem a adição do cátion manganês por eluição isocrática com fase móvel composta por ACN/água na proporção v:v 70/30 após 30 minutos de reação entre as amostras e o radical DPPH em uma concentração molar de 0,075 mM.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Ao correlacionar os cromatogramas obtidos e seus respectivos percentuais de eliminação do radical DPPH com a variação de cor observada nos frascos de reação devido à aplicação de diferentes compostos antioxidantes, verificou-se que há uma relação com o método aplicado, justificando os resultados observados (Figura 31 e 32). Os resultados obtidos neste experimento mostraram que os extratos induzidos pelo cátion manganês demonstraram um potencial superior na eliminação de radicais livres DPPH em comparação ao extrato controle. Essa característica pode estar associada ao modo de indução experimental, que pode resultar em alterações metabólicas, ou ao método de extração aplicado. Portanto, é necessário realizar investigações utilizando diferentes métodos para identificar os compostos responsáveis por essa bioatividade.



**Figura 32** - Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), por meio da ação de diferentes compostos antioxidantes após um tempo de reação de 30 minutos no escuro à temperatura ambiente (25 °C).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

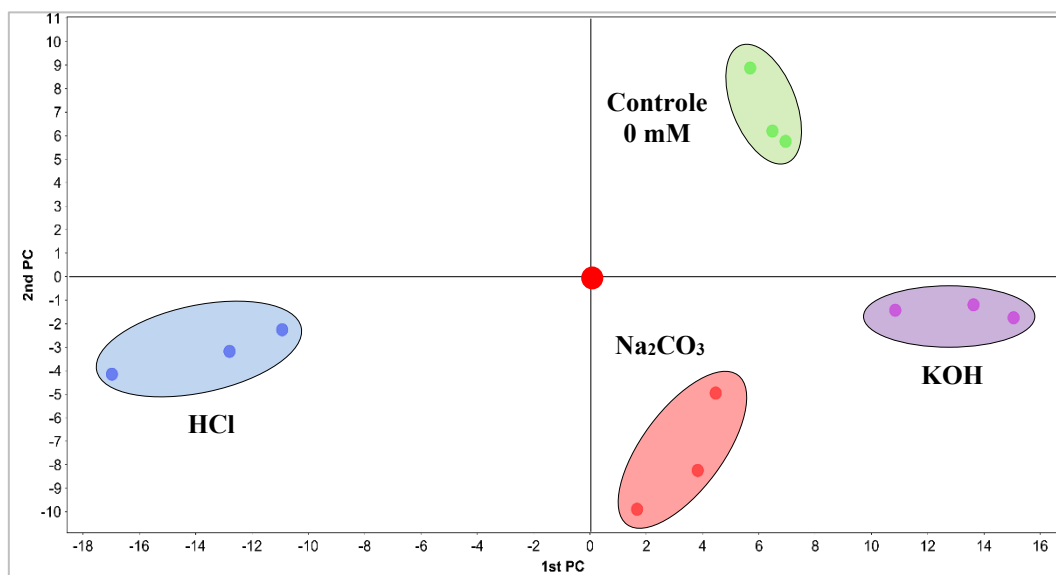
#### 5.8.4. Classificação qualitativa do modo de extração dos extratos fúngicos

Os resultados da visualização gráfica da PCA dos extratos fúngicos obtidos por extração quimicamente ativa são apresentados na (Figura 5). Os primeiro e segundo componentes principais mostraram, respectivamente, que os escores das cores vermelha e violeta estavam posicionados na parte inferior direita do gráfico com relativa proximidade entre si, indicando que os extratos obtidos com os reagentes (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e (KOH) apresentaram um perfil metabólico relativamente semelhante.

Em contraste, os pontos azuis, associados ao método de extração com (HCl), estavam claramente separados dos grupos extraídos com as bases, indicando relações químicas distintas. Essa característica está relacionada ao método de extração, já que os pontos azuis foram extraídos de forma diferente dos grupos que apresentaram pontos vermelhos e violetas.

Observa-se que os pontos verdes, correspondentes ao controle do experimento que não foi induzido pelo cátion manganês, estavam isolados na parte superior. Esse

comportamento indica que a eficiência na produção de compostos que podem ser influenciados pela presença do indutor manganês foram predominantemente afetadas. De forma geral, os quatro grupos de amostras foram claramente separados entre si pelo método de extração ou pela associação com o modo de indução por cátion manganês (Figura 33).



**Figura 33** - Análise de componentes principais (PCA) de 12 amostras em triplicata com área sombreada de 95%.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – Metaboanalyst 6.0.

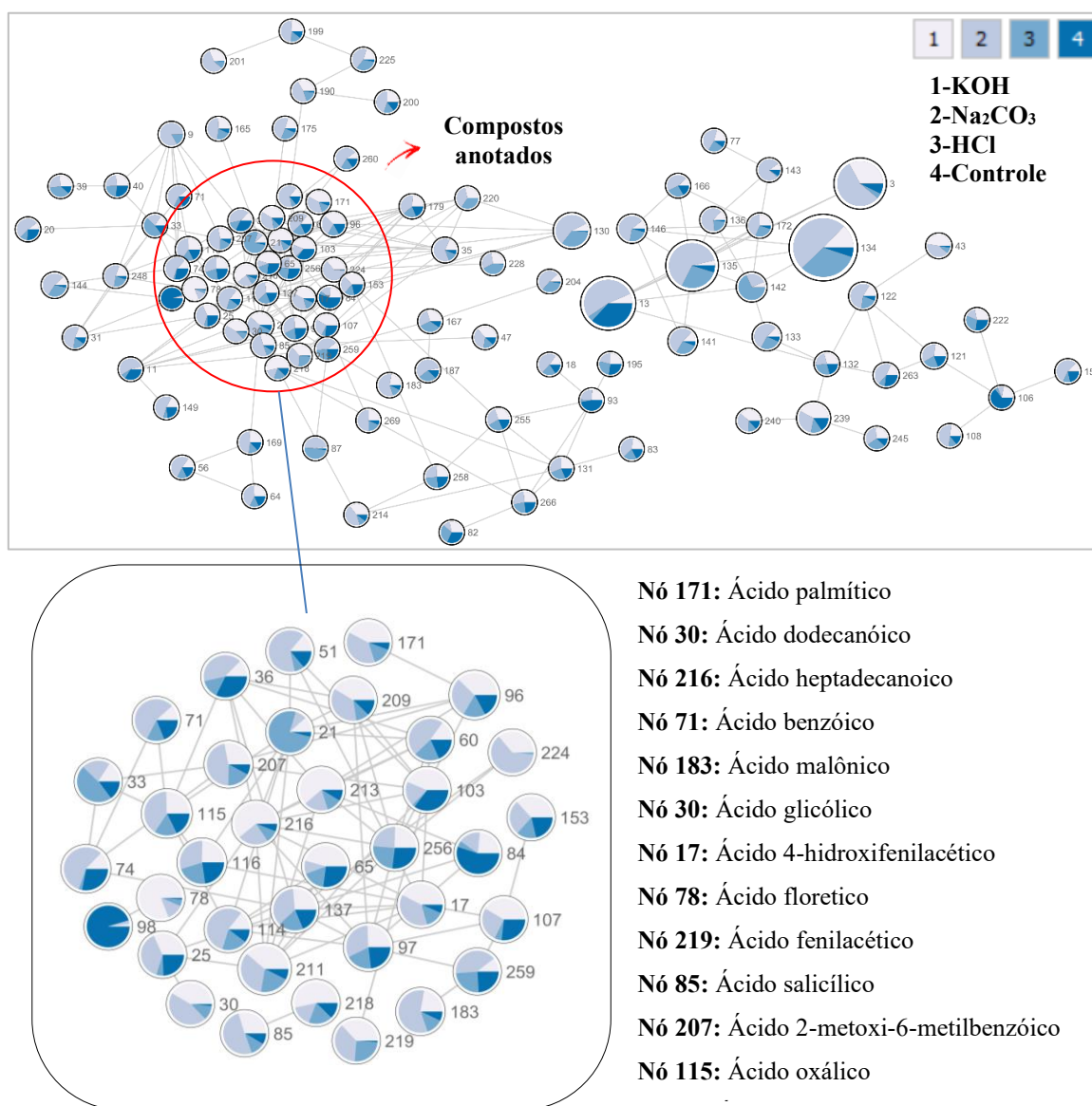
Com base no gráfico, podemos identificar as relações químicas observadas neste experimento. Essa característica indica que a presença do cátion manganês é um fator chave no processo de indução ou inibição de diferentes compostos. Além disso, esses resultados contribuem para a compreensão da biodiversidade molecular do fungo *Talaromyces* e do potencial de aplicação desses compostos como agentes antioxidantes.

### **5.8.5. Avaliação das redes moleculares dos extratos fúngicos com e sem a adição do cátion manganês**

Para documentar e agilizar o processo de descoberta de metabólitos com potencial antioxidante, aplicamos uma abordagem de rede molecular utilizando os dados experimentais de GC-MS ajustados no arquivo de metadados, incluindo o método de extração, a inserção do indutor metálico e o tipo de amostra.

A rede molecular foi formada com 12 extratos replicados com base no método de extração ou de indução e resultou em 102 nós conectados por 206 arestas, os quais foram agrupados em um grande cluster, conforme mostrado (Figura 34). Uma das vantagens de criar

redes moleculares é a possibilidade de aplicar filtros aos nós e arestas para entender como os metabólitos estão distribuídos dentro de um conjunto de dados. Nesse sentido, cores diferentes foram atribuídas aos nós com base no método de extração ou indução aplicado, considerando o tempo de retenção (de 6,90 a 9,0 minutos) para a avaliação dos principais compostos, conforme observado nos cromatogramas de GC-MS. Vale ressaltar que a análise por GC-MS complementa os resultados observados nas redes moleculares. Essas informações são cruciais para entender como esses compostos estão distribuídos de acordo com o desenvolvimento de cada experimento.



**Figura 34** - Rede molecular obtida a partir dos extratos (Controle, HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH) agrupados pelo software Cytoscape 3.10.2, destacando as principais anotações obtidas a partir da biblioteca GNPS.

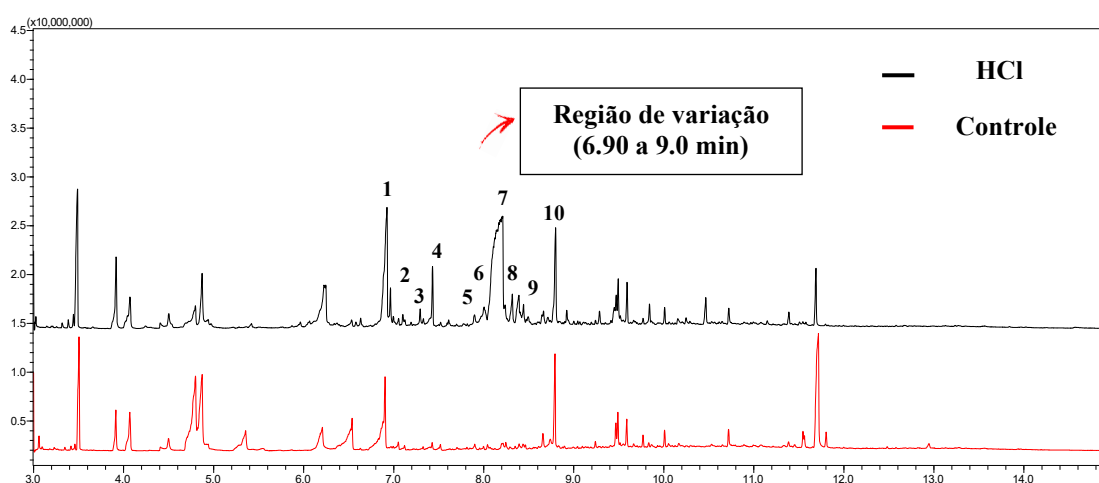
**Fonte** - Elaborado pelo autor – Metaboanalyst 6.0.

A distribuição dos gradientes de cores indicou que diferentes metabólitos devem ser agrupados de forma distinta. Na região destacada na Figura 34, observa-se um cluster com os principais metabólitos anotados. Além disso, a maioria dos metabólitos que apresentaram diferenças entre os grupos indicados no gráfico de PCA foram eluídos entre 6,90 e 9,0 minutos, o que pode denotar certas classes metabólicas e, conseqüentemente, auxiliar no processo de anotação.

Observou-se que a produção de compostos antioxidantes pode ser alterada pelo método de cultivo do fungo. Esses achados contribuem para o entendimento de como ocorre o processo de adaptação e desenvolvimento desse microrganismo. Adicionalmente, a aplicação de cátions de manganês em combinação com o método de cultivo pode contribuir para a produção de substâncias com atividade biológica, promovendo assim o processo de desenvolvimento biotecnológico.

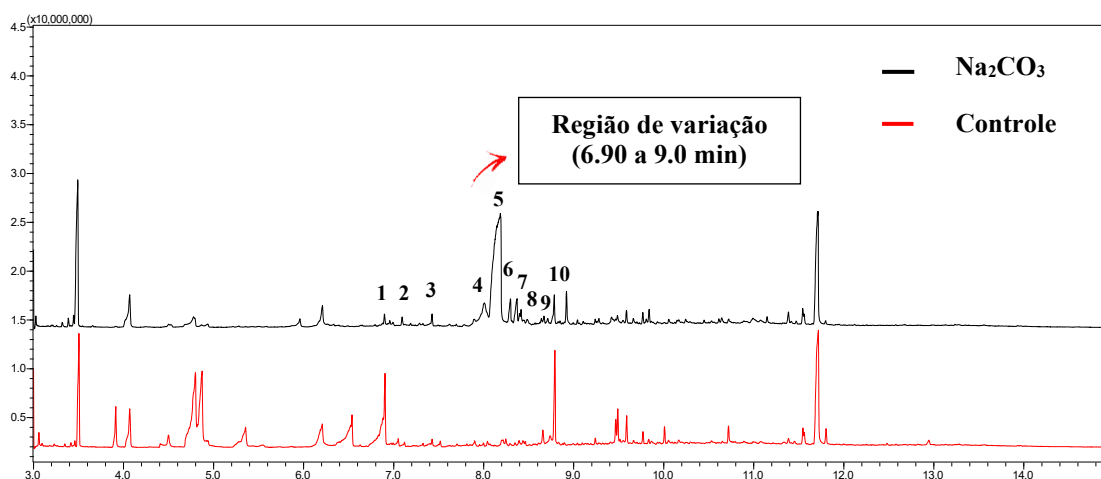
### 5.8.6. Avaliação dos cromatogramas dos extratos fúngicos com e sem a adição do cátion manganês

A análise por cromatografia gasosa considerou a avaliação dos principais picos presentes nos extratos que foram induzidos com o cátion manganês em comparação com seu controle. Entre os extratos induzidos, observou-se que o tempo de retenção entre 6,90 e 9,0 minutos apresentou diferenças quando comparado à mesma região do extrato controle (Figuras 35, 36 e 37). Essa diferença foi avaliada utilizando a biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) presente no software do GC-MS.



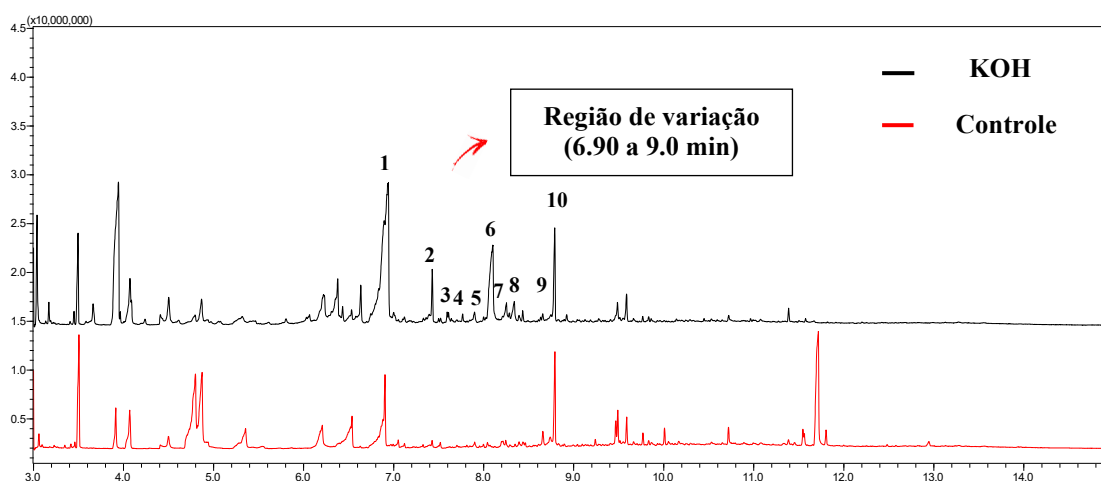
**Figura 35** - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento com HCl (Preto).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 36** - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento *com* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Preto).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 37** - Comparação do controle (Vermelho) com o experimento com KOH (Preto).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

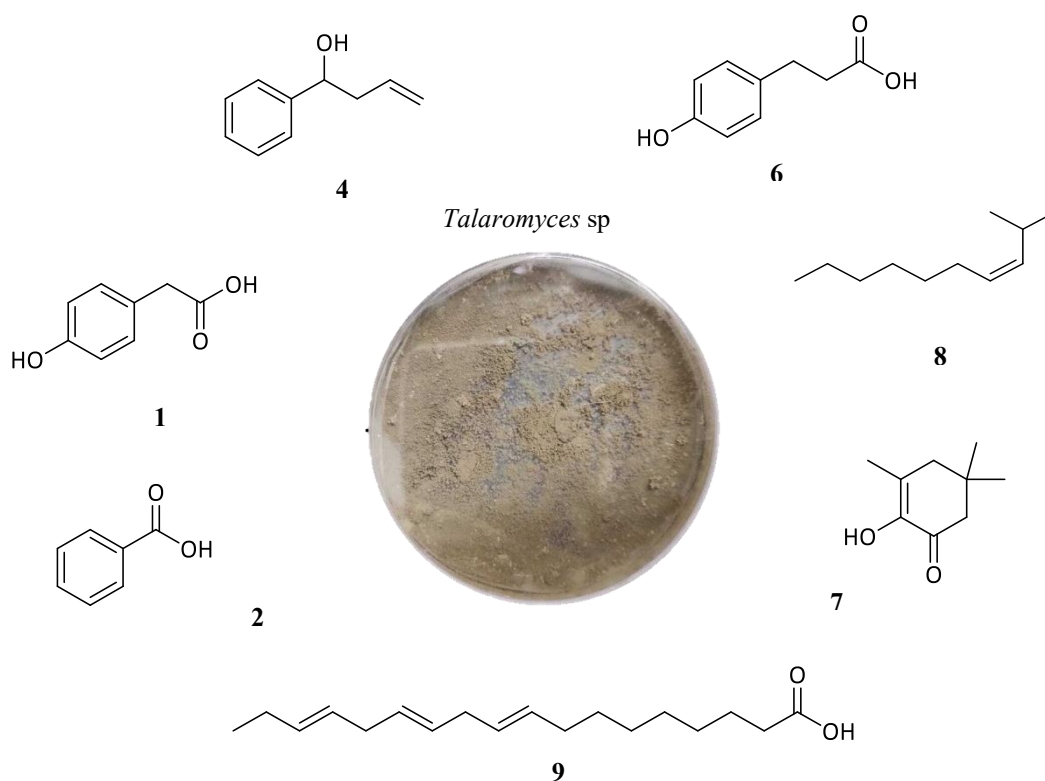
Os extratos fúngicos foram submetidos à avaliação dos principais constituintes nessa faixa de tempo de retenção. As investigações revelaram uma predominância de compostos fenólicos e ácidos graxos observados nessa região (Tabela 3) e (Figura 38). Observa-se que a indução utilizando o cátion manganês foi capaz de produzir esses compostos, os quais podem ter potencial para eliminar ou reduzir os radicais livres DPPH. Esses resultados são consistentes com as porcentagens obtidas dos extratos induzidos em comparação com o extrato controle.

Diversos estudos têm sido realizados para investigar a atividade antioxidante de compostos fenólicos em várias fontes, como plantas, alimentos e matrizes biológicas. Esses estudos demonstraram que os compostos fenólicos podem apresentar forte atividade antioxidante e podem ser eficazes na prevenção da formação de radicais livres associados a

diferentes tipos de estresse oxidativo (JIN et al., 2023; ARRUDA et al., 2022; DANTAS et al., 2022).

Pico	Tempo de retenção	Composto	m/z	Fórmula molecular
1	6.932	Ácido 4-hidroxibenzenoacético	152	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
2	7.428	Ácido benzóico	122	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
3	7.592	Ácido acético	60	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
4	7.765	1-Fenil-3-buten-1-ol	148	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O
5	7.897	Ácido tetradecanoico	228	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
6	8.095	Ácido 4-hidroxifenilbutírico	180	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
7	8.250	2-Hidroxiisoforona	154	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
8	8.335	3-Metil-2-decen	154	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub>
9	8.653	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	278	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
10	8.787	Ácido hexadecanoico	256	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>

**Tabela 3** - Substâncias anotadas pela biblioteca NIST na região de (6,90 a 9,0 minutos) que não foram observadas no extrato controle.



**Figura 38** - Principais estruturas químicas identificadas na biblioteca NIST observadas nos cromatogramas com variação no tempo de retenção entre 6,90 a 9,0 minutos.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

## 5.9. Conclusões

Os resultados apresentados no estudo deste artigo demonstraram que a presença do cátion manganês tem um impacto significativo na atividade antioxidante dos extratos produzidos pelo fungo *Talaromyces* sp. Utilizando um método adaptado para a avaliação de radicais DPPH por cromatografia de ultra performance, foi possível observar que a atividade antioxidante dos extratos aumentou consideravelmente na presença do manganês. Essa característica apresentou vantagens, pois incluiu a possibilidade de avaliar a atividade antioxidante juntamente com a identificação de padrões e diferentes compostos.

Além disso, a análise por GC-MS, associada à avaliação de redes moleculares, revelou alterações no perfil químico dos extratos, sugerindo que o manganês pode influenciar a produção de compostos bioativos específicos com propriedades antioxidantes. Esses resultados indicam que a suplementação com manganês pode ser uma estratégia eficaz para potencializar a atividade antioxidante em microrganismos, abrindo novas possibilidades para o uso desses extratos em aplicações biotecnológicas e na indústria farmacêutica.

Estudos complementares são necessários para compreender os mecanismos moleculares associados a essa influência e explorar a aplicabilidade prática dos extratos enriquecidos com manganês em diferentes contextos experimentais.

## **6. Capítulo 3 – Esteróides poliênicos do fungo *Talaromyces fuscoviridis* derivado de solo de mina de cobre: estruturas, aumento da produção e atividade antioxidante**

---

### **6.1. Introdução**

Embora os fungos, em geral, apresentem metabolismos secundários prolíficos, fornecendo muitas moléculas importantes e úteis em aplicações biotecnológicas voltadas ao bem-estar humano (BILLS e GLOER, 2016; SHI et al., 2024; YOUSSEF e SINGAB, 2021), o que temos observado é que a diversidade fúngica nem sempre acompanha a diversidade de produtos naturais produzidos por fungos. Isso provavelmente se deve ao fato de que, embora os microrganismos, em geral, possuam um grande número de diferentes clusters gênicos biossintéticos registrados em seu genoma, a expressão dessa maquinaria genética relacionada ao metabolismo secundário depende de inúmeros fatores externos, que na maioria das vezes são desconhecidos ou difíceis de determinar (LIND et al., 2017; CACHO, TANG e CHOOI, 2014; REEN et al., 2015; KELLER, 2015). Isso significa que os estudos químicos frequentemente resultam no reisolamento de produtos naturais fúngicos já conhecidos por pesquisadores ao redor do mundo.

Esse fato levou muitos químicos de produtos naturais, juntamente com biólogos moleculares, a propor a teoria de que microrganismos que vivem em ambientes extremos podem ativar diferentes genes biossintéticos como forma de se adaptarem a substratos inóspitos (SAYED et al., 2020; LI et al., 2022). Assim, a biosfera fúngica presente em ambientes potencialmente hostis tem recebido atenção especial da comunidade científica, que investiga os mecanismos desenvolvidos por esses microrganismos para se adaptarem a condições desafiadoras e como isso afeta seu metabolismo. De fato, esses estudos têm representado uma valiosa contribuição para a descoberta de novos alvos para o desenvolvimento e aplicação biotecnológica (HUI et al., 2021; KISS et al., 2023; RADDADI et al., 2015).

Com essas ideias em mente, pesquisadores têm explorado vulcões (MARTIRENA-RAMÍREZ et al., 2024; DU et al., 2008), diferentes tipos de cavernas (RANGSEEKAEW e PATHOM-AREE, 2019; TAVARES et al., 2018; SUETRONG et al., 2023), lagos altamente salinos (GEORGIEVA et al., 2023), o oceano profundo (DU et al., 2010), entre outros, como fontes de microrganismos para estudos químicos e bioprospecção. No Brasil, existem muitos desses ambientes que podem representar substratos desafiadores para o crescimento de microrganismos, e, com isso, estabelecemos um programa para investigar a química desses extremófilos, explorando seu potencial para fornecer moléculas com

bioatividades interessantes.

Em uma expedição recente, algumas das diversas minas de metais existentes no estado do Pará foram amostradas em busca de fungos viáveis. Durante uma dessas coletas, realizada em solo descartado de uma mina de cobre, foi encontrado um pequeno conjunto de isolados interessantes, os quais foram inicialmente identificados por morfologia observada em microscopia óptica e, posteriormente, por sequenciamento de genes taxonômicos.

Neste trabalho, relatamos o estudo químico e a atividade antioxidante de um desses fungos, que apresenta pigmentação semelhante à de soluções aquosas contendo cobre cátionico e foi identificado como *Talaromyces fuscoviridis*. Os estudos com os extratos da biomassa do fungo cultivado em arroz esterilizado resultaram no isolamento de dois esteroides majoritários com atividades antioxidantes comparáveis à do composto lipofílico de referência, o  $\beta$ -caroteno. Também é relatado aqui o aumento na produção de esteroides quando o meio de cultivo é suplementado com  $MnCl_2$ .

## 6.2. Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de  $^1H$  e  $^{13}C$  RMN foram adquiridos em solução de  $CDCl_3$ , com tetrametilsilano (TMS) como sinal de referência, utilizando um instrumento Bruker AVANCE III, 9,4 Tesla, equipado com um autoamostrador, uma cabeça de sonda ATMA® BFO de 5 mm e um gradiente de campo no eixo Z, operando a 400 e 100 MHz para  $^1H$  e  $^{13}C$ , respectivamente. Os dados de espectrometria de massas de alta resolução foram adquiridos em um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF MS, Impac II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), acoplado a um UHPLC (Shimadzu Nexera X2, Tóquio, Japão), utilizando uma coluna reversa C-18 de 135 Å de porosidade e tamanho de partícula de 1,7  $\mu m$  (Waters, Billerica, MA, EUA), 2,1×100 mm. As análises de GC/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas QP-2010-plus (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a uma cromatografia gasosa GC-17A equipada com uma coluna de sílica fundida Restek-Rxi-5ms (J&W Scientific, 10 m x 0,10 mm x 0,10  $\mu m$ ). A cromatografia preparativa de média pressão (MPLC) foi realizada utilizando um sistema Teledyne-Isco Combiflash RF 200, com colunas empacotadas com sílica gel RediSep gold. A TLC foi realizada em placas de sílica gel GF254 pré-revestidas com suporte de alumínio; as manchas foram visualizadas sob luz UV ou por pulverização com ácido sulfúrico a 10% em EtOH seguido de aquecimento. Os ensaios para atividade antioxidante utilizaram uma cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC-Acquity M-Class) da Waters (Manchester, Reino Unido) equipada com uma coluna C-18 (1,7  $\mu m$ , 2,1 x 100 mm). Os dados de difração de raios-X foram coletados a 100 K em um

difratômetro Rigaku XtaLAB Synergy-S Dualflex equipado com um detector Hypix-6000 HE, utilizando radiação CuK $\alpha$  (1,54184 Å). O sequenciamento genético para identificação fúngica foi realizado com um sequenciador automático ABI 3500XL Series (Applied Biosystems).

Os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol foram de grau analítico e adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil) e Quimis (Indaiatuba, SP, Brasil). Para separações HPLC, foram utilizados acetonitrilo e metanol de grau cromatográfico (Panreac, Barcelona, Espanha). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical e utilizados sem purificação adicional.

### **6.3. Isolamento do micro-organismo**

A amostra de solo foi coletada da bacia de resíduos de mineração de uma mina de cobre no estado do Pará, Brasil (posição global: -6.429729, -50.081160). A cepa isolada foi obtida de solo a uma profundidade de 0 a 10 cm. Aliquotas de aproximadamente 50  $\mu$ L de uma suspensão de solo preparada com 25 g em 225 mL de água desionizada esterilizada contendo cloranfenicol e tetraciclina, ambos a uma concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, foram espalhadas em placas de Petri contendo BDA. As colônias em crescimento foram re-cultivadas em novas placas. Após o isolamento, os fungos foram preservados em água esterilizada e depositados na micoteca do laboratório multidisciplinar de biologia da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA. Posteriormente, foram compartilhados com a micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos - LaBioMMi, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos, Brasil. *Talaromyces fuscoviridis* foi codificado como P<sub>3</sub>W<sub>1</sub>M<sub>2</sub>.

### **6.4. Identificação do micro-organismo**

Para observações morfológicas, o fungo isolado foi cultivado em microescala utilizando a técnica de cultura em lâmina. Nesse método, uma suspensão de células do fungo foi inoculada em lâminas de microscopia contendo 40  $\mu$ L de meio de cultura BDA. A suspensão preparada foi transferida para o meio de cultura utilizando uma alça de platina previamente esterilizada em chama. Após a inoculação, uma lamínula foi cuidadosamente colocada sobre a superfície do meio de cultura. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril.

Para criar condições adequadas de cultivo, um pedaço de algodão umedecido foi adicionado à placa de Petri, garantindo que não entrasse em contato com a lâmina ou a lamínula. A placa de cultura foi então selada e incubada a 27 °C por 6 dias em um incubador do tipo BOD. Após o período de incubação, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de

campo claro, permitindo a visualização dos aspectos morfológicos das estruturas fúngicas observadas.

O sequenciamento de DNA genômico (Bt2/Bt2b) também foi utilizado para confirmar a identificação do fungo. Uma suspensão celular do fungo foi transferida para um meio de cultura apropriado e incubada a 28 °C. O DNA genômico desse microrganismo foi purificado utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol. A amplificação do marcador foi realizada por metodologia de PCR, utilizando o DNA extraído como molde. O primer (oligonucleotídeos sintéticos) usado na reação de PCR foi Bt2/Bt2b, complementar à região de  $\beta$ -Tubulina. O produto da amplificação foi purificado em uma coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento em um sequenciador automático da série ABI 3500XL. O primer utilizado para o sequenciamento foi Bt2a/Bt2b.

As sequências genéticas parciais obtidas com o primer foram montadas em uma sequência consenso única (uma sequência consenso combinada com diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com sequências de organismos representados nos bancos de dados Genbank e CBS. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o software CLUSTAL X, associado ao BioEdit 7.2.6. Análises de distância foram realizadas utilizando o software MEGA v.11.0. A matriz de distância foi calculada com base no modelo de KIMURA (1980) e a construção do dendrograma de distância genética foi realizada pelo método Neighbor-Joining, com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 reamostragens.

## **6.5. Produção dos extratos e fracionamento**

O isolado fúngico foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA (batata, dextrose e agar), que foram esterilizadas em um autoclave vertical Phoenix sob 1 atm a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, as placas foram resfriadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro do isolado de *Talaromyces fuscoviridis* foram usados para inocular as placas em um ambiente de fluxo laminar. As placas foram incubadas por um período de 10 dias.

Uma suspensão de esporos foi preparada usando um laço de platina para transferir células fúngicas das placas para um tubo Falcon contendo cerca de 30 mL de água destilada autoclave. A suspensão foi agitada em um vortex. O número de esporos foi contado em uma câmara de Neubauer e ajustado para  $1 \times 10^5$  células por mL. Esta suspensão foi distribuída em dez frascos Erlenmeyer de 1000 mL, cada um contendo cerca de 200 gramas de arroz previamente autoclave duas vezes a 121°C sob 1 atm por 15 minutos. Eles foram então

incubados a 28°C por 30 dias. Após a incubação, as culturas foram extraídas com cerca de 200 mL de etanol por frasco Erlenmeyer. A biomassa foi macerada com uma barra de vidro para otimizar a extração, seguida de sonicação por 20 minutos em um banho ultrassônico. A extração também foi realizada utilizando acetato de etila. O extrato final foi filtrado sob vácuo, e a fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo para evaporação do solvente. Este procedimento foi repetido três vezes. Uma alíquota deste extrato foi utilizada para análise do perfil metabolômico em um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker QToF) acoplado à cromatografia líquida.

O extrato foi fracionado em uma coluna seca de cromatografia a vácuo, utilizando uma coluna de 30 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro, embalada com gel de sílica 60 (malha 70-230). Seis frações foram coletadas com eluentes compostos de hexano, acetato de etila e metanol em proporções de polaridade crescente (respectivamente 95:5:0 – Fr1; 70:30:0 – Fr2; 0:100:0 – Fr3; 0:90:10 – Fr4; 0:70:30 – Fr5; 0:0:100 – Fr6). A fração Fr3 foi submetida a uma purificação adicional usando uma cromatografia de média pressão em uma coluna de gel de sílica montada no sistema Combiflash RF 200, eluída com gradiente de hexano e acetato de etila, resultando nos esteroides puros 1, como um sólido branco amorfo, e 2, como agulhas brancas.

## **6.6. Análise dos extratos fúngicos por UHPLC-MS/MS**

A análise do perfil metabolômico dos extratos brutos foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (QToF, Bruker). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 (da Waters). A fase móvel consistiu de água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B). Foi aplicada uma eluição em gradiente, começando com 95% A e 5% B por 1 minuto, passando para 30% A e 70% B aos 12 minutos, alcançando 2% A e 98% B aos 20 minutos e retornando às condições iniciais entre 20 e 25 minutos, garantindo a reequilibração da coluna. A taxa de fluxo foi mantida em 0,25 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna a 40°C.

Antes da análise, o espectrômetro de massas foi calibrado usando uma solução de formiato de sódio (10 mmol.L<sup>-1</sup>; isopropanol:água, 1:1 v/v) com adição de 50 µL de ácido fórmico concentrado. Durante a operação, a fonte de íons ESI foi configurada no modo de ionização positiva, com uma voltagem de capilar de 4500 V e um desvio de placa final de -500 V. O gás seco foi mantido a 8 L.min<sup>-1</sup>, a 180°C, e o gás nebulizador foi ajustado para 4 bar. A aquisição de dados variou de m/z 50 a 1800 com uma taxa de 5 Hz. Para análise MS/MS em

tandem, foi realizada uma fragmentação automática de varredura MS/MS com foco nos cinco íons mais intensos de cada pico cromatográfico, otimizando a qualidade dos dados e os padrões de fragmentação específicos de íons para identificação subsequente dos metabolitos.

A rede molecular baseada nos dados espectrais de massas foi estabelecida usando a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Dados MS de alta resolução das amostras foram adquiridos utilizando uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), que normalmente fornece íons precursores proeminentes. Em seguida, os dados de LC-MS/MS foram analisados e processados usando o software MS-DIAL versão 4.24, com a detecção de massas avaliada dentro de um intervalo de tempo de retenção de 0,3 a 25,0 minutos, utilizando detecção de massa centróide e um limite de nível de ruído de  $1,0 \times 10^4$ . Os parâmetros de tolerância para MS1 e MS2 foram ajustados de acordo com os padrões GNPS, com MS1 a 0,02 Da e MS2 a 0,02 Da. O intervalo de massas foi ajustado de m/z 50 a 1500. Os parâmetros de deconvolução incluíram uma janela de 0,5 e um corte de abundância MS/MS no nível de amplitude 30. O alinhamento foi baseado em dados de referência aplicados a uma amostra em branco, com uma tolerância de tempo de retenção de 0,5 minutos. O fator de retenção e o fator MS1 também usaram um valor de 0,5, aplicável dentro de um intervalo de referência de 0-1.

Os arquivos foram processados por meio do algoritmo de redes espectrais (GNPS) em três formatos: um arquivo mgf de espectros deconvoluídos pelo MS-DIAL 4.24, uma tabela de quantificação dos picos gerados nesse processo e uma tabela de metadados com informações da amostra, como tipo de amostra e modo experimental. No GNPS, a tolerância de massa para o íon precursor foi de 0,02 Da, a tolerância de massa para o íon fragmentado foi de 0,02 Da, foi usado um mínimo de 5 picos correspondentes e um limiar de pontuação de 0,7. As opções avançadas de busca incluíram uma classe de biblioteca com um histórico superior a 1 por espectro e o uso da biblioteca espectral GNPS. As opções avançadas da rede foram configuradas para um par de cosseno mínimo de 0,65 e uma rede TopK de 10. A visualização da rede foi realizada usando o software Cytoscape versão 3.10.2.

## **6.7. Cultivo do fungo na presença de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$**

Para avaliar a influência do cátion manganês na produção de metabólitos, o fungo *Talaromyces fuscoviridis* foi cultivado em arroz modificado, preparado com a adição de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em uma concentração final de 125 mmol/L. O cultivo foi realizado em triplicata sob as mesmas condições do meio controle (arroz hidratado apenas com água destilada), utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo aproximadamente 30 g de arroz e 60 mL da

solução correspondente. Após a esterilização e inoculação com uma suspensão de esporos ( $10^6$  UFC), os frascos foram incubados por 20 dias em condições estáticas à temperatura ambiente.

Ao final do período de cultivo, foram obtidos extratos etanólicos por maceração estática e concentrados utilizando um evaporador rotativo. Posteriormente, os extratos foram analisados por LC-MS/MS para comparação qualitativa e quantitativa dos metabólitos produzidos. A análise comparativa baseou-se em *molecular networking* (GNPS) e na quantificação relativa por meio da extração da área de pico dos compostos anotados.

## 6.8. Análise GC/MS

Um alíquota da substância isolada foi analisada por GC-MS rápido (Shimadzu QP-2010-plus) equipado com uma coluna de sílica fundida Restek-Rxi-5ms de 10 m x 0,10 mm x 0,10  $\mu$ m. O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma velocidade linear de 42  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . A temperatura do injetor foi ajustada para 250 °C. Inicialmente, a coluna foi mantida a 70 °C por 1 minuto, sendo então aumentada a uma taxa de 20 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  até 320 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 minutos. O tempo total de análise foi de 15 minutos, com um volume de injeção de 1  $\mu$ L em modo splitless. A temperatura da fonte de íons por EI foi fixada em 240 °C, e a temperatura da interface em 250 °C. A varredura de íons foi operada entre m/z 70 e 670, e os dados foram adquiridos no intervalo de 3 a 15 minutos. Este método foi desenvolvido especificamente para este estudo.

## 6.9. Difração de raios X por cristal único

A evaporação lenta de uma solução metanólica do esteroide 2 em condições ambiente resultou em cristais em forma de agulha, adequados para análise por SCXRD. Os dados de SCXRD foram coletados a 100 K em um difratômetro Dualflex usando radiação  $\text{CuK}\alpha$ . O programa CrysAlisPro foi utilizado para coleta de dados, refinamento da célula, redução e processamento dos dados. A estrutura foi resolvida pelo método de Fase Intrínseca utilizando o programa SHELXT. Todos os átomos não-hidrogênio foram localizados no mapa de Fourier e refinados posteriormente pelo método de minimização de mínimos quadrados não-lineares em  $F^2$  usando o programa SHELXL, considerando parâmetros anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio foram posicionados estereoquimicamente utilizando o modelo de "riding". O programa Olex2 foi usado para a solução e o refinamento da estrutura. As ilustrações gráficas foram obtidas usando o Mercury. O arquivo CIF do esteroide 2 foi depositado no Cambridge Structural Database com o número CCDC 2314479. Cópias dos dados podem ser obtidas gratuitamente em [www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk).

## 6.10. Ensaio do potencial antioxidante contra 2,2 Difenil-1-Picrilhidrazila (DPPH)

A atividade sequestrante de radicais dos compostos de referência, esteroides isolados e frações foi determinada medindo-se a razão DPPH/DPP• após misturar as amostras com uma solução de DPPH em metanol:acetona, a uma concentração de 0,075 mM, em frascos de vidro separados. A avaliação foi realizada após 30 minutos de reação em ambiente escuro, a 25°C. Soluções estoque dos compostos de referência e isolados foram preparadas em concentrações de (2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg·mL<sup>-1</sup>) em uma solução metanol:acetona (1:1, v/v), respectivamente. As soluções estoque foram armazenadas no escuro, a 5°C.

Para o teste antioxidante, utilizou-se β-caroteno de alta pureza analítica como composto de referência. A razão DPPH/DPP• foi medida por análise cromatográfica de fase reversa usando um UPLC (Waters – Acquity) com uma coluna C-18 eluída com uma fase móvel isocrática composta por 30% de água e 70% de acetonitrila, durante 6 minutos, a uma taxa de fluxo de 0,4 mL·min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 5,0 µL, coluna a 25°C e detecção a 330 nm. A atividade antioxidante das amostras foi calculada usando a seguinte equação (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022):

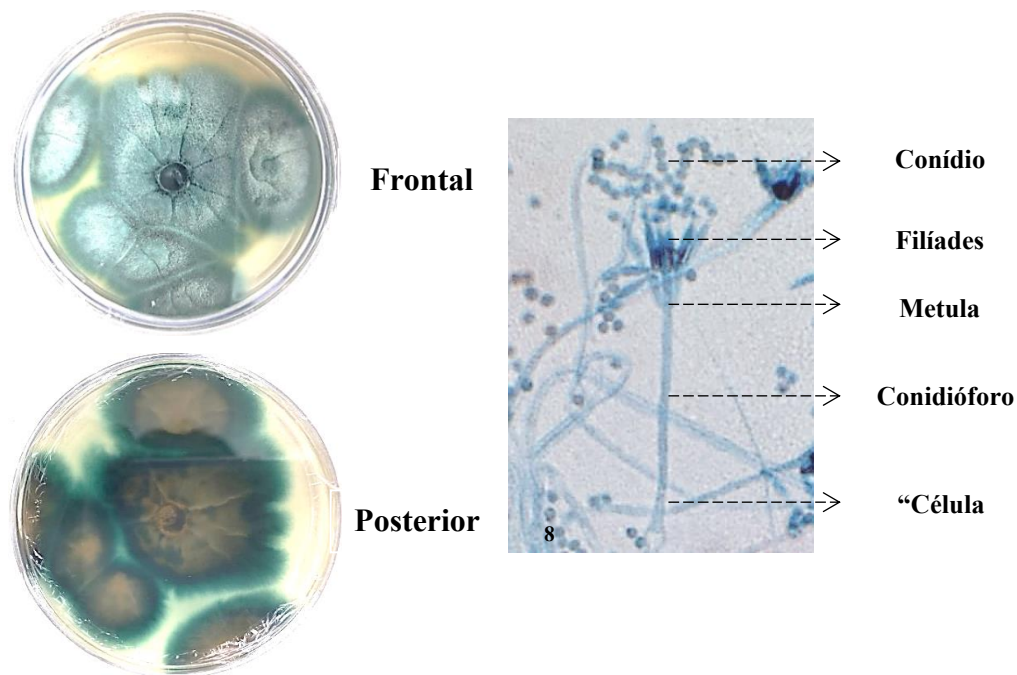
$$\% \text{ de redução da área do pico de DPPH ou DPP} \cdot \text{H} = \frac{(Aaa - Ada)}{(Aaa)} \times 100$$

Onde: **Aaa** = área do pico de DPPH ou DPP• antes da adição do antioxidante e **Ada** = área do pico de DPPH ou DPP• após a adição do antioxidante.

## 6.11. Resultados e discussões

### 6.11.1. Identificação do fungo *Talaromyces fuscoviridis*

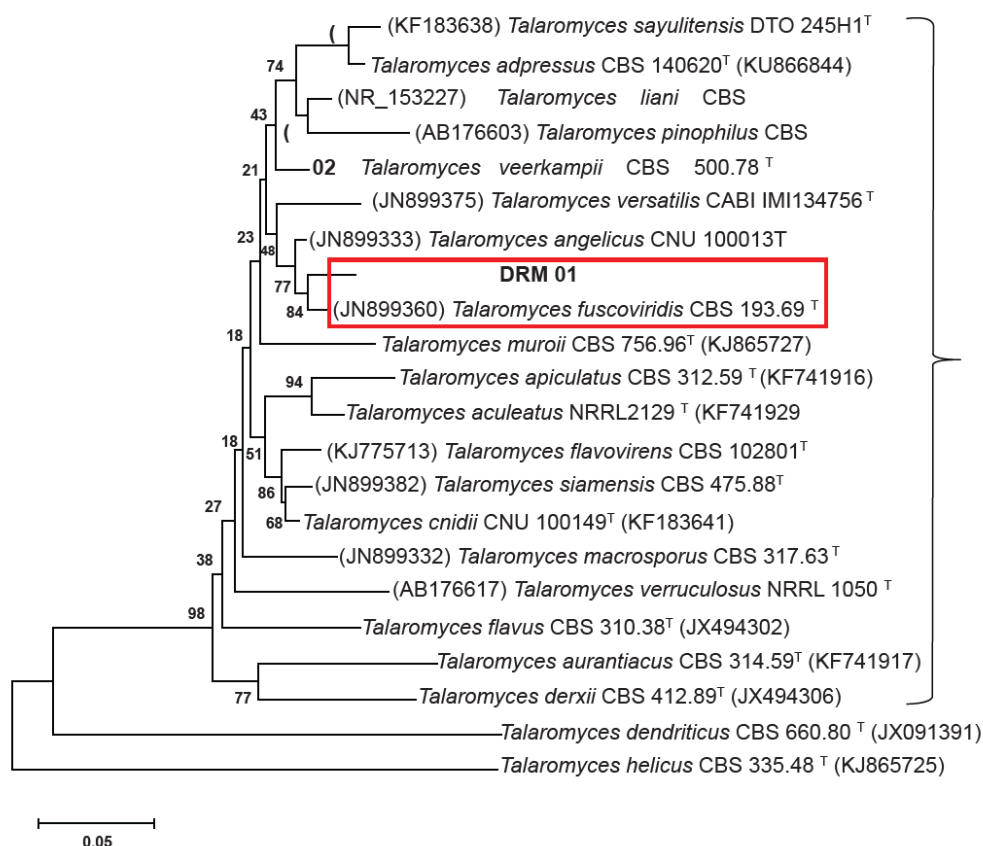
O fungo cresceu em placas de Petri com meio BDA, formando estruturas intensamente pigmentadas em azul-esverdeado visíveis na parte frontal da placa e amareladas na parte posterior. A micrografia (Figura 39) revelou conidióforos verticilados com a formação de fiálides, e os conídios estavam organizados em cadeias, com maior proporção nas áreas superiores. Na micrografia, foi possível observar que este fungo possui uma base em formato de "T" ou "L", comumente chamada de "célula basal" (célula pé). O conidióforo se estende a partir da célula basal, e as células conidiogênicas, metula e fiálides são formadas a partir dela. Essas características são altamente compatíveis com fungos do gênero *Talaromyces* (VISAGIE et al., 2015).



**Figura 39** - Morfologia do crescimento de *Talaromyces fuscoviridis* em placa de Petri e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio com lente de 40x.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Embora a identificação do gênero do fungo tenha sido clara por inspeção morfológica, a determinação da espécie foi realizada apenas por sequenciamento do DNA genômico. A sequência da região  $\beta$ -Tub da amostra apresentou 95-98% de similaridade com sequências da mesma região ribossômica de diferentes espécies dentro do gênero *Talaromyces*, conforme depositadas nos bancos de dados GenBank e CBS-Knaw. A análise da distância genética posicionou a amostra de fungo em um agrupamento dentro da seção *Talaromyces*, estando intimamente relacionada à cepa-tipo *Talaromyces fuscoviridis* CBS193.69. Conseqüentemente, os resultados das análises de banco de dados e filogenia sugeriram que a identificação final do fungo é *Talaromyces fuscoviridis* (Figura 40).



**Figura 40** - Dendrograma baseado na distância genética, utilizando o método neighbor-joining, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região  $\beta$ -Tub da amostra microbiana e as sequências de cepas de microrganismos relacionados presentes nos bancos de dados Mycobank (CBS Knaw, atualmente Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e GenBank.

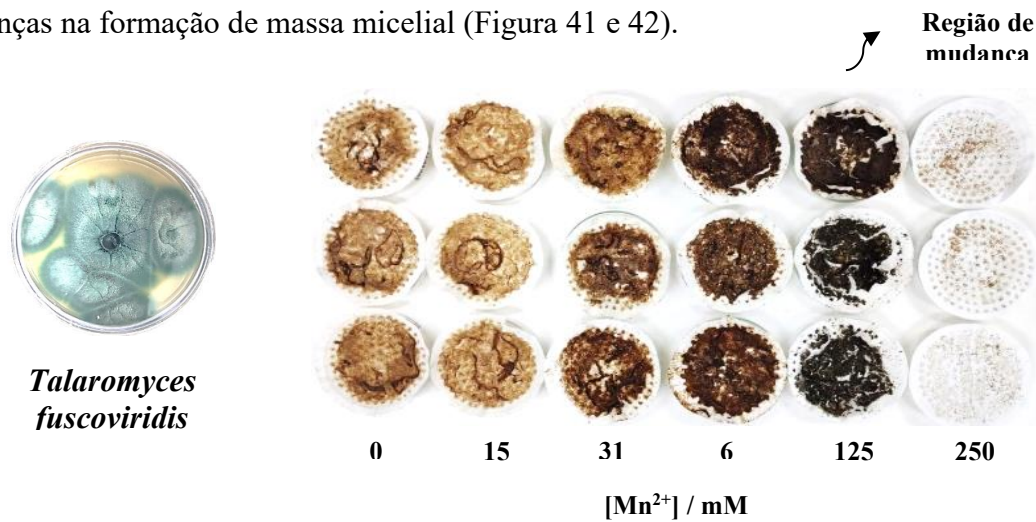
Fonte - Elaborado pelo autor.

### 6.11.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês

A tolerância do fungo ao  $Mn^{2+}$  foi avaliada usando concentrações de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  variando de 0 a 1000 mM em meio base de Czapek, onde fungos filamentosos geralmente crescem muito bem.

As réplicas da concentração 0 mM foram usadas como referência para o crescimento do fungo. Observou-se que, em concentrações iniciais (0 - 31 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ), o fungo mantém sua coloração e não apresenta mudanças morfológicas macroscópicas aparentes. Em concentrações acima de 31 mM, o micélio começa a escurecer, até a concentração de 250 mM, onde produz apenas pequenas quantidades de células. Concentrações de 500 e 1000 mM de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  inibem completamente o crescimento do fungo. Assim, a concentração máxima na qual ainda consegue crescer está entre 125 e 250 mM.

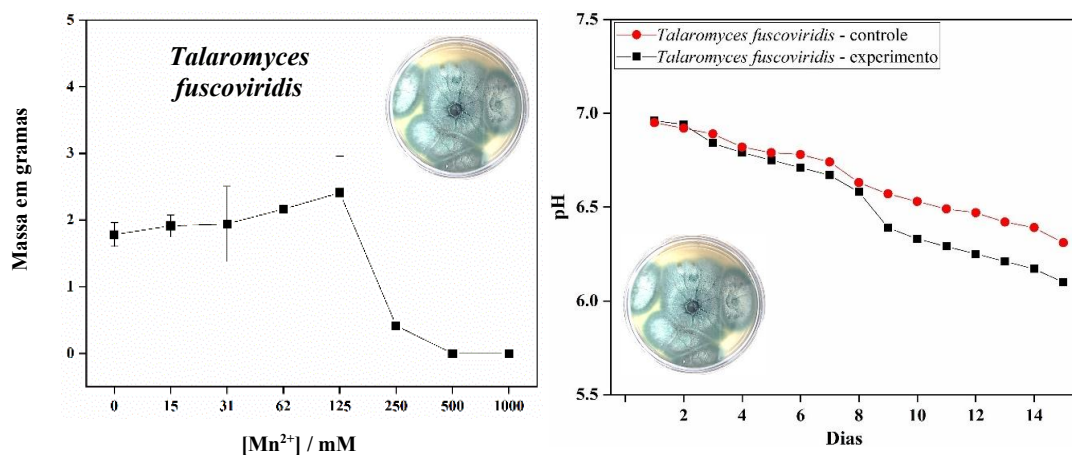
Essa mudança de cor de marrom para marrom-escuro provavelmente está relacionada ao acúmulo de dióxido de manganês ( $MnO_2$ ), um pó de cor preta a marrom, que é um produto da oxidação de  $Mn^{2+}$  pelas manganês peroxidases do fungo. Observou-se que os fungos utilizam essas peroxidases para lidar com o excesso de manganês. Após certa concentração, as peroxidases perdem sua capacidade de desintoxicação, e o fungo para de crescer (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016). Essa evolução de cor é acompanhada por mudanças na formação de massa micelial (Figura 41 e 42).



**Figura 41** - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês.

Fonte - Elaborado pelo autor.

A concentração de 15 mM  $Mn^{2+}$  promove um aumento de aproximadamente 15% na massa micelial, mas começa a retornar ao valor de controle em 31 e 62 mM, e então cai 40% nas concentrações de 125 e 250 mM  $Mn^{2+}$ .



**Figura 42** - Taxa de crescimento médio do fungo *Talaromyces fuscoviridis* em teste controle e em teste de toxicidade com diferentes concentrações de  $Mn^{2+}$  e a variação de pH nos dias de experimento.

Fonte - Elaborado pelo autor.

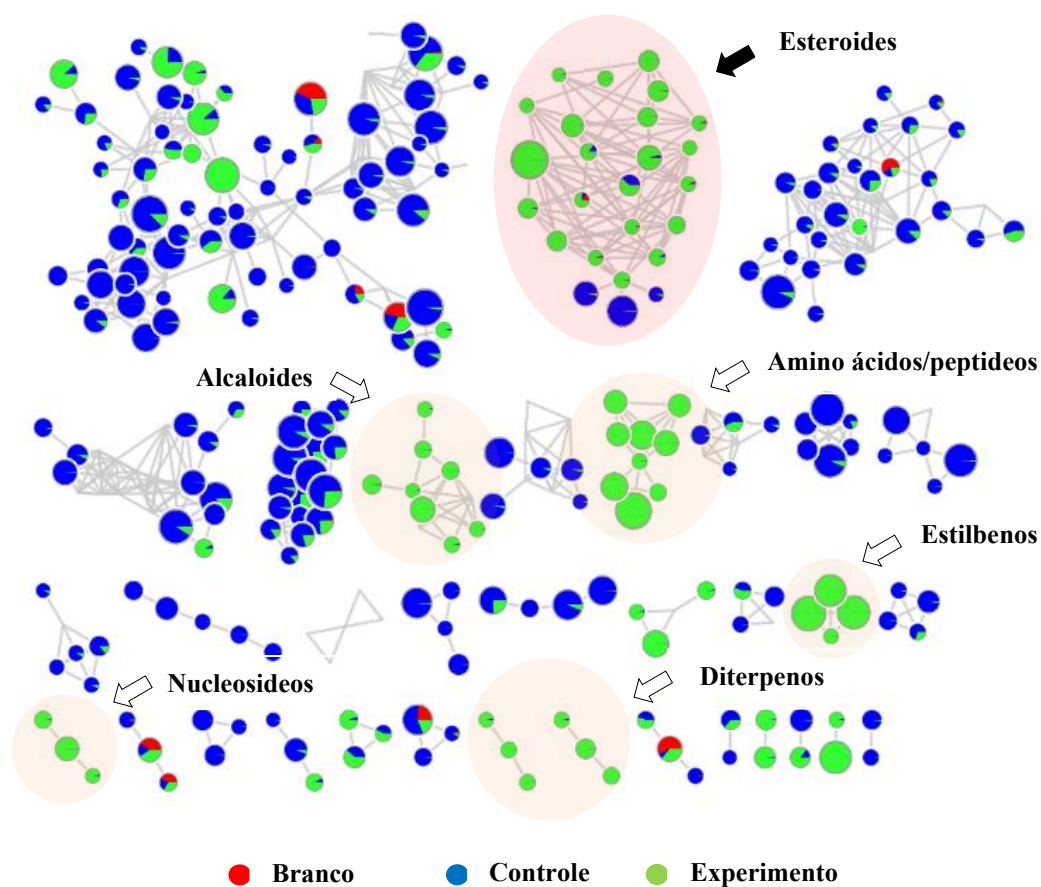
A toxicidade do  $Mn^{2+}$  inicia a atividade das peroxidases, ocorre em concentrações ligeiramente superiores a 62 mM. A inibição do crescimento microbiano por  $Mn^{2+}$  depende de muitos fatores, como pH e a presença de outros cátions, como o  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  conforme figura 42. Enquanto algumas leveduras são inibidas a 32 mM  $Mn^{2+}$ , algumas bactérias do gênero *Serratia* podem tolerar até 1200 mM  $MnSO_4$ , embora muitas outras bactérias apresentem concentração inibitória mínima (MIC) geralmente abaixo de 30 mM. O fungo *Cladosporium cladosporioides* cresceu bem em um meio contendo 60 mM  $Mn^{2+}$ , mas também conseguiu tolerar 1200 mM.

Enzimas peroxidases têm sido associadas à oxidação de manganês em várias espécies de microrganismos. Além disso, em certos fungos basidiomicetos, *Penicillium* e *Aspergillus*, a oxidação de manganês por enzimas peroxidases extracelulares também foi estudada. A enzima manganês peroxidase é capaz de promover a oxidação do íon manganês  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ , que é estabilizado por metabólitos derivados de ácidos orgânicos. O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao de outras peroxidases contendo heme, mas a manganês peroxidase exibe uma preferência por  $Mn^{2+}$  como doador de elétrons (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016).

Embora os microrganismos apresentem uma ampla diversidade de níveis de tolerância ao  $Mn^{2+}$ , os estudos encontrados na literatura indicam que sempre haverá uma concentração mínima que começa a perturbar sua maquinaria bioquímica para se adaptar às condições adversas. Isso é interessante para nosso propósito neste trabalho, uma vez que a inibição ou indução de novas enzimas pode impactar na biossíntese de produtos naturais pelo fungo.

### **6.11.3. Perfil de metabólitos de *Talaromyces fuscoviridis***

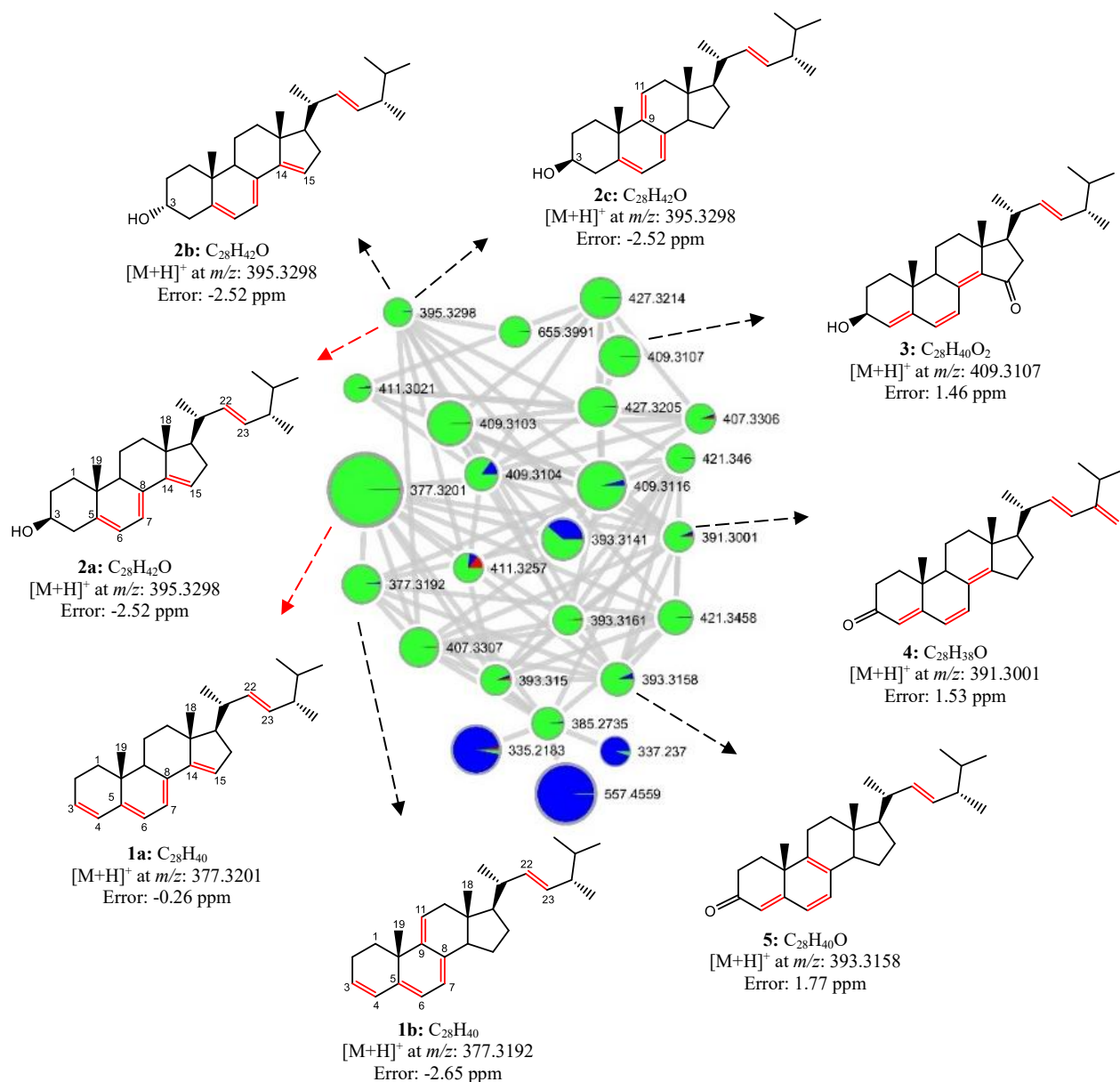
A abordagem de redes moleculares foi utilizada para traçar o perfil de metabólitos do extrato obtido do fungo *Talaromyces fuscoviridis*. Essa abordagem permitiu a comparação dos dados de MS/MS, sua organização em famílias de estruturas moleculares e sua visualização. Essas análises metabolômicas são baseadas em análises integradas por LC-MS/MS com diversas bibliotecas metabolômicas (NIST, NPATLAS, MONA, MassBank, METLIN) e com a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), além de algoritmos de fragmentação in silico, como SIRIUS e MS-FINDER (VAN SANTEN et al., 2019; WANG et al., 2016; RUTTKIES et al., 2016; COBLE e FRAGA, 2014; ALONSO, MARSAL e JULIÀ, 2015; YI et al., 2016; HORAI et al., 2010).



**Figura 43** - Rede molecular obtida a partir do extrato fúngico de *Talaromyces fuscoviridis*, agrupada pelo software Cytoscape 3.10.2, com destaque para as principais anotações. O agrupamento de esteroides está destacado em vermelho.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

A rede molecular obtida forneceu um total de 312 agrupamentos de nós interconectados por 752 arestas. Foi possível anotar diversas classes de metabólitos secundários que foram agrupadas em diferentes clusters, bem como metabólitos primários como aminoácidos e peptídeos (Figura 43). O grupo de compostos com esqueleto esteroidal é destacado em vermelho.



**Figura 44** - Agrupamento de esteroides anotados na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo *Talaromyces fuscoviridis*. Os nós em vermelho indicam o branco do solvente, os nós em azul indicam o (controle) e os nós em verde indicam o experimento associado ao fungo com o cátion manganês, destacando os esteroides isolados.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

As substâncias com esqueleto esteroidal foram agrupadas com base na comparação dos espectros de MS/MS de cinco íons precursores ([M+H]<sup>+</sup>) em m/z 395.3298, 409.3107, 391.3001, 393.3158 e 377.3192 (Figura 44). Todos os nós dentro desse grupo exibiram maior similaridade espectral entre os íons filhos, sendo, portanto, agrupados. Com essa abordagem, outros íons pertencentes ao mesmo cluster também foram anotados.

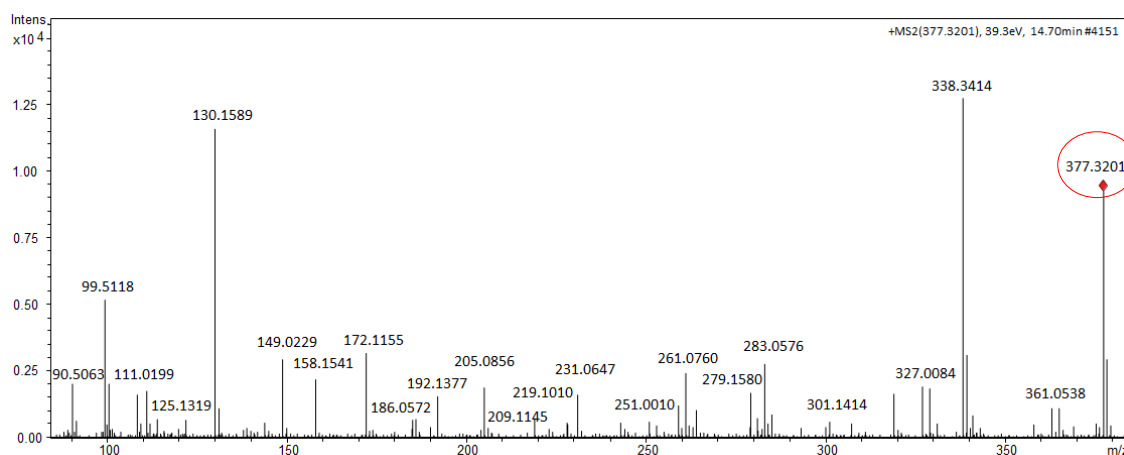
Os dois íons com massas nominais 377 apresentaram espectros de MS/MS anotados como dois esteroides poliênicos isoméricos: Ergosta-3(4),7,14,22-tetraeno (m/z 377,3201, 1a, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>) e Ergosta-3(4),7,9,22-tetraeno (m/z 377,3192, 1b, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>). Três anotações foram sugeridas para o espectro de MS/MS do íon precursor em m/z 395,3298, correspondendo aos compostos isoméricos Ergosta-5,7,14,22-tetraeno-3β-ol (2a), Ergosta-5,7,14,22-tetraeno-3α-ol (2b) e Ergosta-5,7,9,22-tetraeno-3β-ol (2c), todos com fórmula molecular calculada de C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O. Outros três esteroides poliênicos foram anotados com boas correspondências: Gymnasterona-C (3, m/z 409,3107, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>), Ergosta-4,6,8(14),22,24(28)-pentaeno-3-ona (4, m/z 391,3001, C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O) e Ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno-3-ona (5, m/z 393,3158, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O).

A avaliação do agrupamento de esteroides com base no perfil espectral de MS/MS e suas semelhanças entre si (rede molecular) demonstrou ser uma boa ferramenta para a análise da distribuição, anotação e, por vezes, identificação de diferentes metabólitos que podem estar envolvidos nos processos de adaptação e desenvolvimento de diversos microrganismos. No entanto, nossos resultados apresentados na Figura 44 representam um bom exemplo dos cuidados necessários para essas interpretações. Os esteroides 3, 4 e 5 foram anotados com ótimas correspondências e são relatados na literatura como moléculas identificadas por dados de RMN (AMAGATA et al., 2007; CHEN et al., 2008; CHOROT et al. 2009, respectivamente), sugerindo que suas estruturas moleculares estão corretamente atribuídas. Por outro lado, as estruturas anotadas para os esteroides 1 (a e b) e 2 (a, b e c) precisam de confirmação adicional. Esses esteroides diferem entre si apenas pela posição de uma das três duplas ligações C=C no sistema de anel tetracíclico, estando em Δ<sup>14,15</sup> para 1a, 2a e 2b, e em Δ<sup>9,11</sup> para 1b e 2c. A maioria dos relatos encontrados para esteroides Δ<sup>9,11</sup> descreve apenas dados espectrais de massa obtidos por GC-MS (NIETO e ÁVILA, 2008; RIVERA et al., 2008; DAVID COY e NIETO, 2009; HAGEMANN et al., 2008; SANTALOVA et al., 2004) e o composto Δ<sup>14,15</sup> 1a não possui dados espectroscópicos descritos. Assim, para confirmar essas anotações moleculares, os esteroides 1 e 2 foram selecionados para isolamento em escala preparativa por meio de procedimentos cromatográficos.

#### 6.11.4. Isolamento dos compostos e análise estrutural

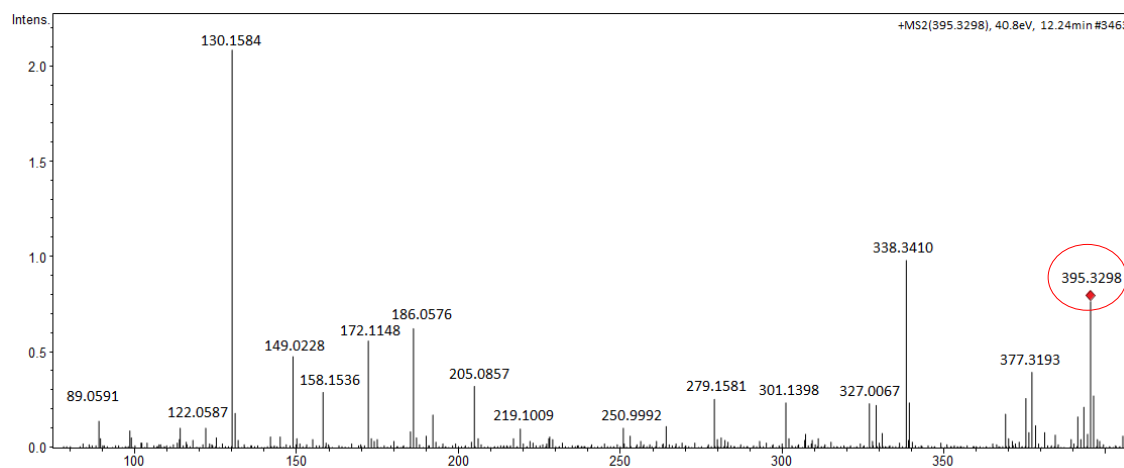
As frações ricas em esteroides polienos foram submetidas à separação em escala preparativa por HPLC, resultando em dois compostos majoritários. Suas estruturas foram sugeridas com base em dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D e HRMS.

O esteroide menos polar (1) teve sua fórmula molecular estabelecida como  $C_{28}H_{40}$  ( $[M+H]^+$  em  $m/z$  377,3201) (Figura 45), sendo um hidrocarboneto, enquanto o esteroide 2 era um álcool com fórmula calculada  $C_{28}H_{42}O$  ( $[M+H]^+$  em  $m/z$  395,3298) (Figura 46).



**Figura 45** - Espectro de massas do esteroide 1a (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI).

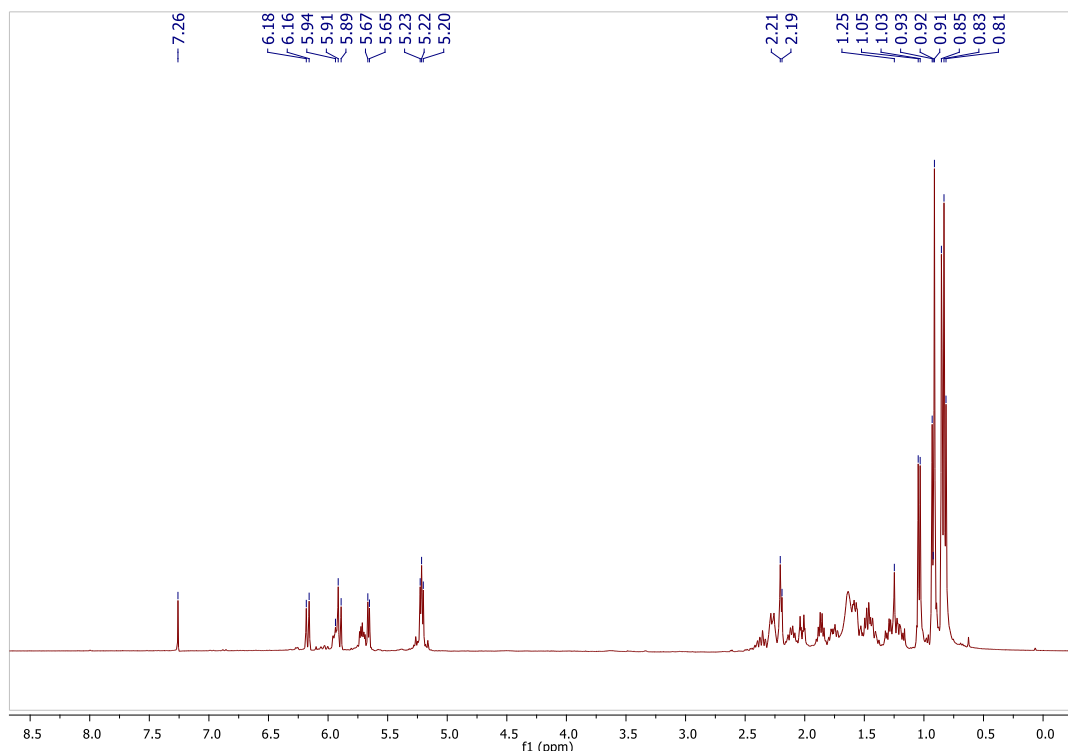
Fonte - Elaborado pelo autor.



**Figura 46** - Espectro de massas do esteroide 2a (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI).

Fonte - Elaborado pelo autor.

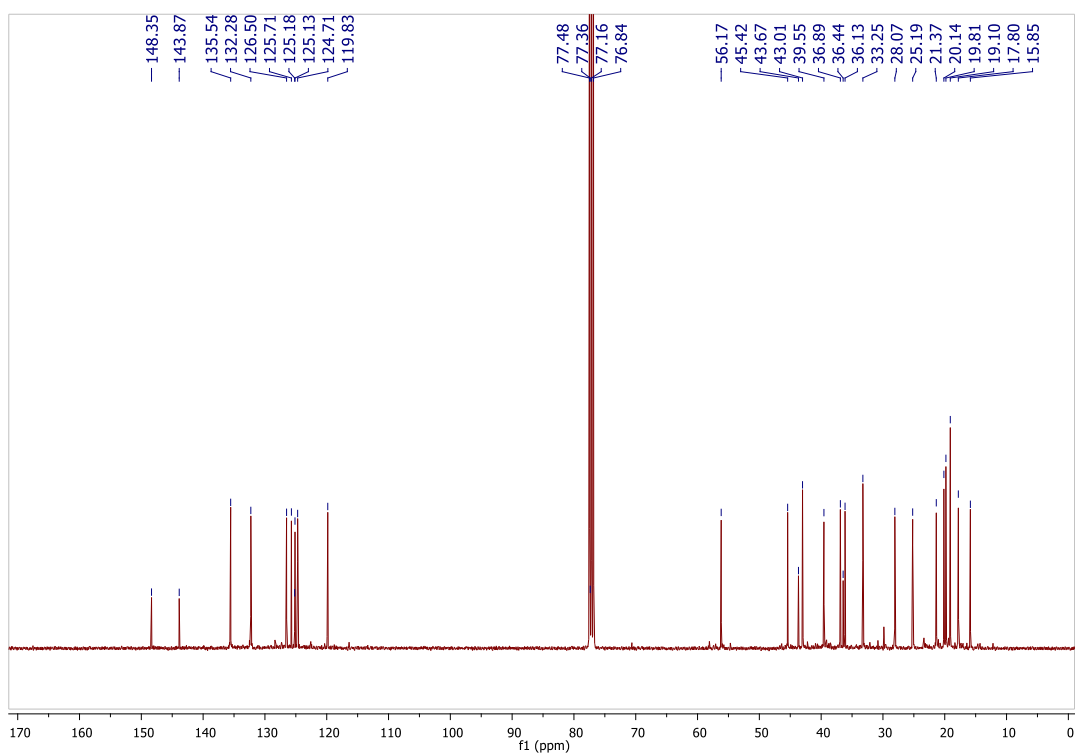
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o composto 1 (Figura 47) apresenta seis sinais para grupos metila em aproximadamente  $\delta$  0,70 – 1,15, sendo quatro dubletos e dois singletos, mostrando grande similaridade com alguns sinais presentes no espectro do ergosterol (YONGXIA et al., 2020), um esteroide comumente encontrado em fungos. O espectro também apresenta um múltiplo de 2H em  $\delta$  5,15 - 5,27, idêntico aos sinais observados para os hidrogênios H-22 e H-23 do ergosterol, além de outros cinco sinais olefinicos de  $^1\text{H}$  entre  $\delta$  5,60 - 6,20.



**Figura 47** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do esteroide 1a (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

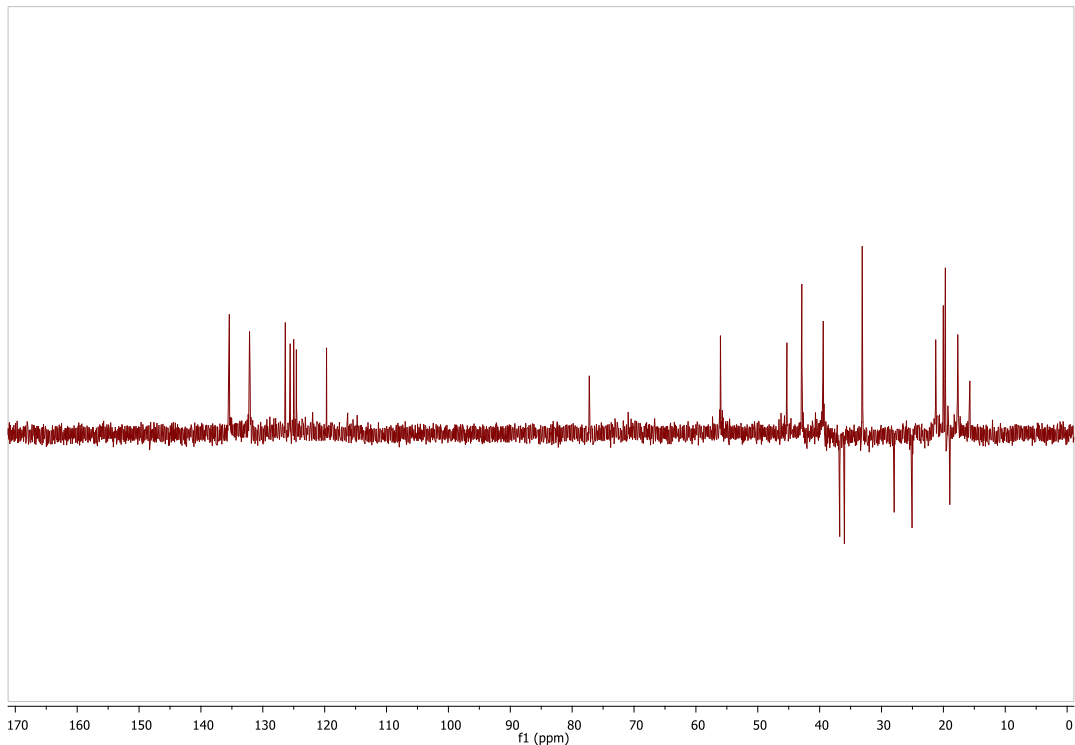
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado em banda larga (Figura 48) e DEPT135 (Figura 49) do composto 1 também corroboram a presença de um hidrocarboneto poli-insaturado com esqueleto ergostânico, mostrando sinais para dez átomos de carbono  $\text{sp}^2$  hibridizados, sendo três quaternários e sete metínicos (C-H). Além disso, não foi detectado nenhum sinal que pudesse ser atribuído a átomos de  $^{13}\text{C}$  ligados a oxigênio.



**Figura 48** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do esteroide 1a (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

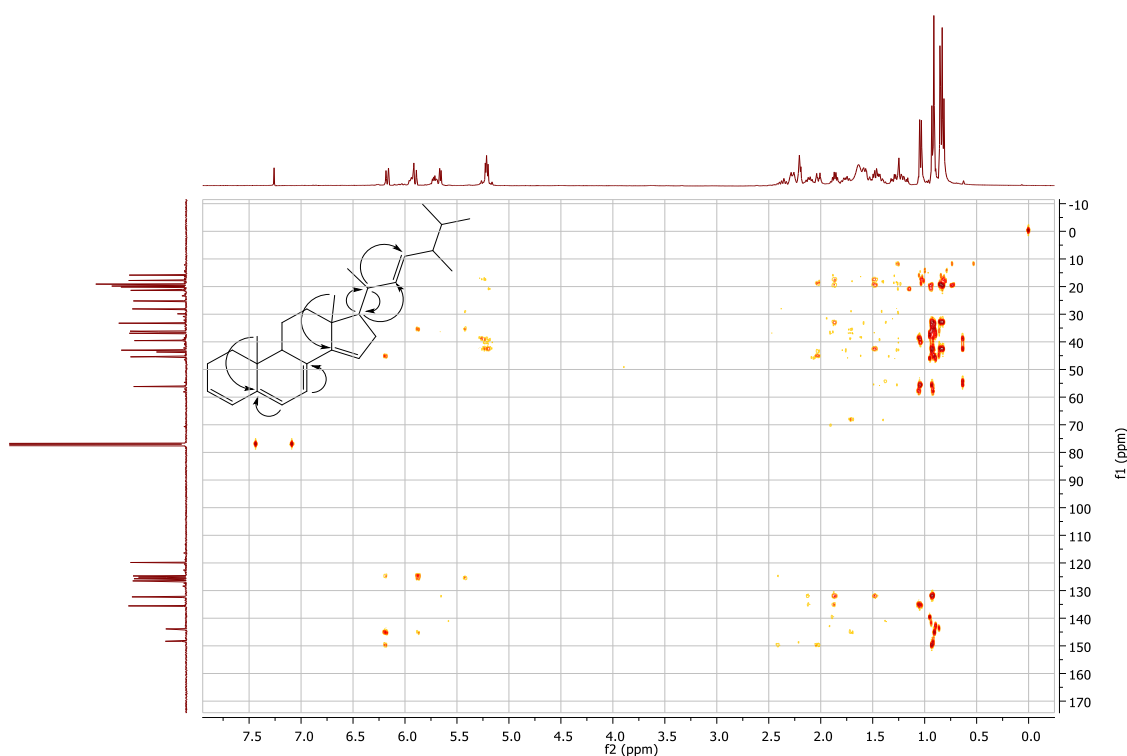
Fonte - Elaborado pelo autor.



**Figura 49** - Espectro de RMN DEPT-135 do esteroide 1a ( $\text{CDCl}_3$ ).

Fonte - Elaborado pelo autor.

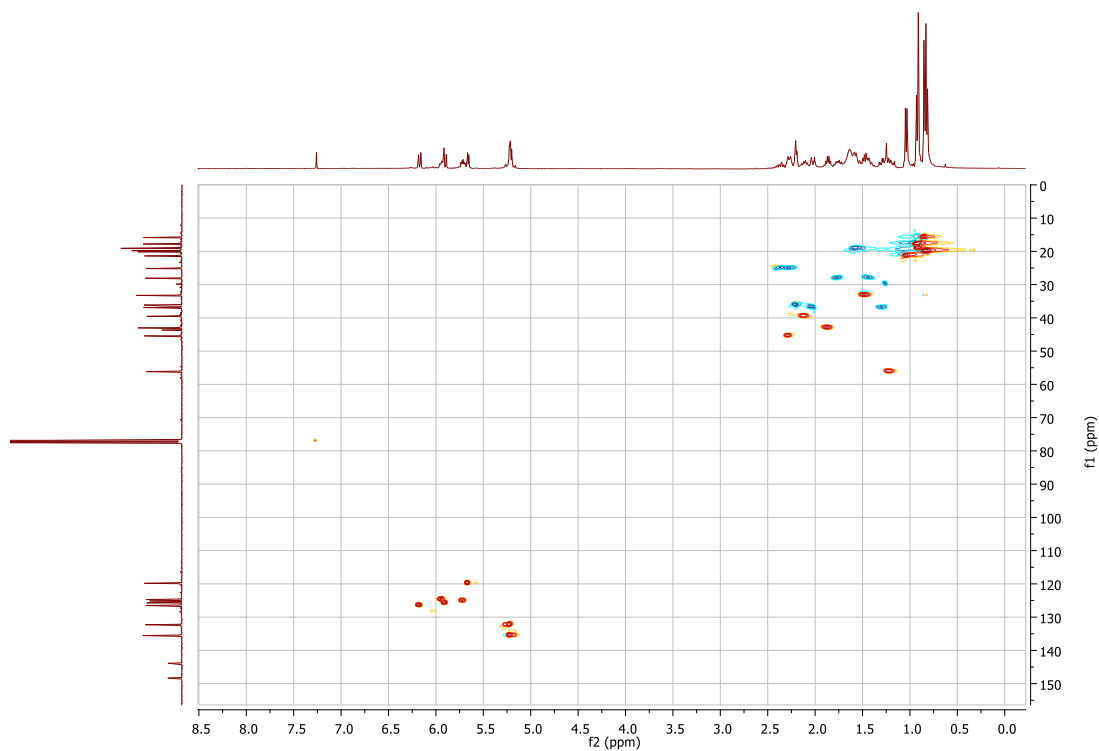
Entre os hidrogênios C-H olefinicos do composto 1, há um par de dupletos em  $\delta$  5,66 e 6,20 ( $J = 8$  Hz, acoplamento *cis*, H-3 e H-4) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que permitiu o posicionamento de uma ligação dupla C-C no anel A. O espectro de UV do esteroide 1 apresenta uma absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  319 nm (em MeOH). No ergosterol, o dieno em C-5 e C-7 produz uma absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  260 nm (SHAO et al., 2010). Portanto, o esteroide 1 provavelmente contém uma conjugação estendida das ligações duplas no sistema de anel tetracíclico. A quarta ligação dupla poderia estar posicionada em  $\Delta 14,15$  como em 1a ou em  $\Delta 9,11$  como em 1b. Há uma correlação no espectro 2D de HMBC (Figura 50) do composto 1 entre o grupo metila  $\text{CH}_3$ -19 ( $\delta$  0,92, s) e o carbono olefínico quaternário  $^{13}\text{C}$ -14 ( $\delta$  148,4, s), que permite posicionar essa ligação dupla C-C em  $\Delta 14,15$ .



**Figura 50** - Espectro de RMN HMBC do esteroide 1a ( $\text{CDCl}_3$ ).

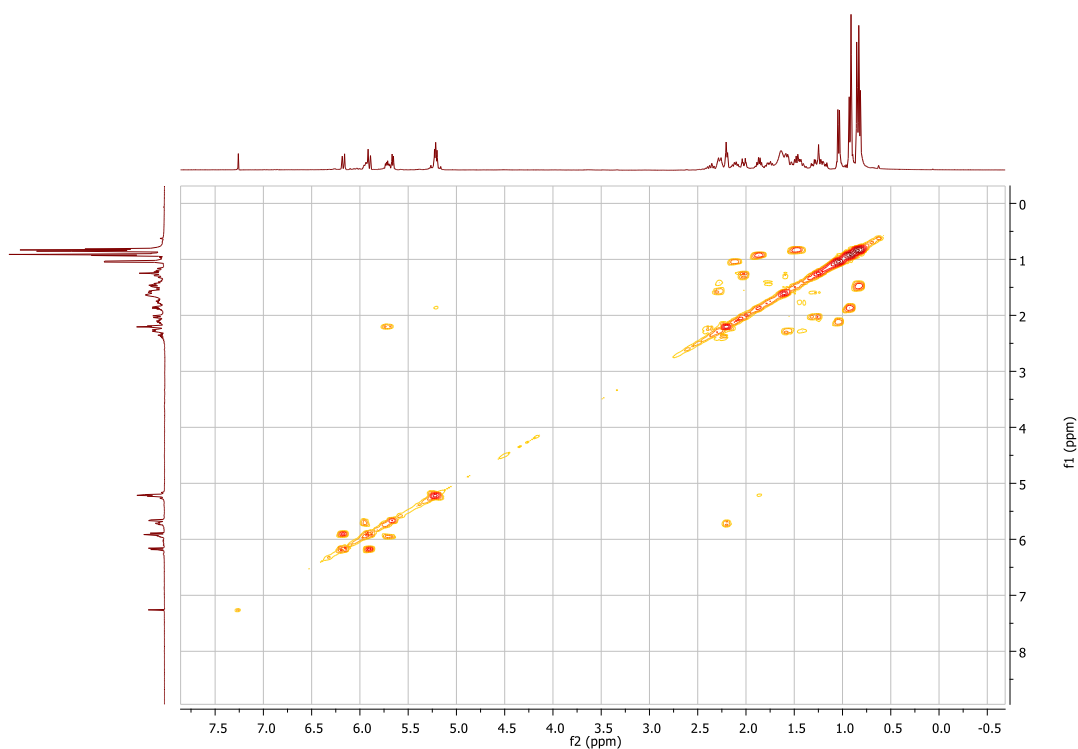
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Essa informação foi complementada pelos espectros de HSQC e COSY (Figuras 51 e 52). Portanto, a estrutura do composto 1 foi estabelecida como Ergosta-3(4),5(6),7(8),14(15),22(23)-pentaeno (1a).



**Figura 51** - Espectro de RMN HSQC do esteroide 1a (CDCl<sub>3</sub>).

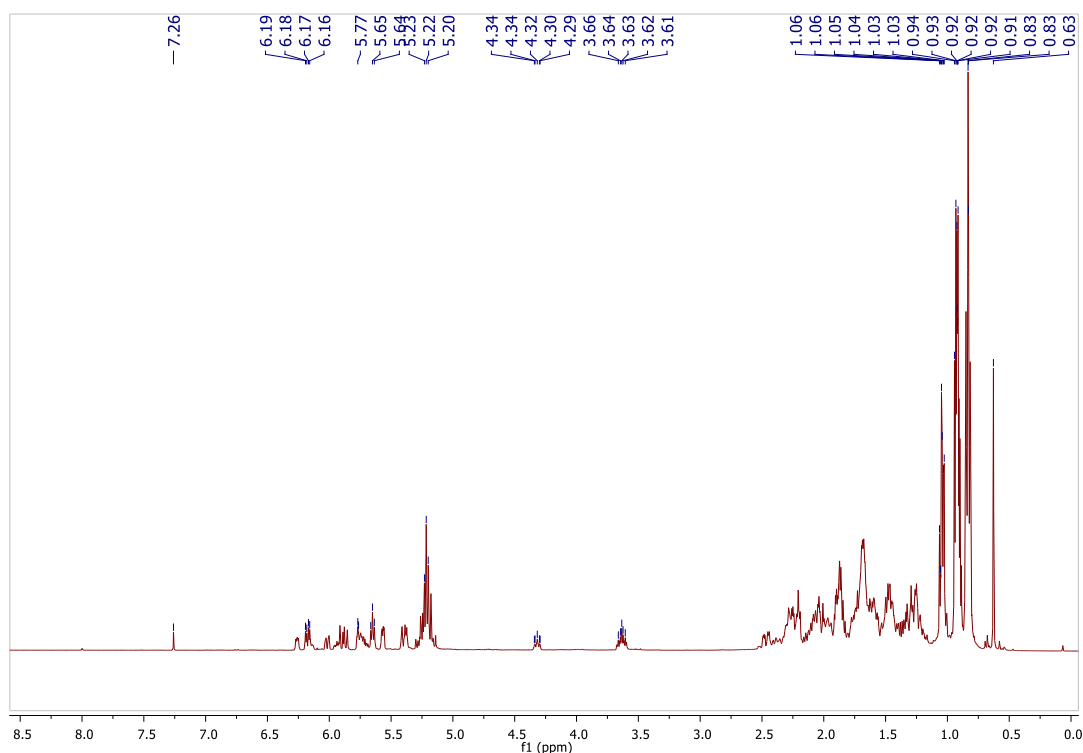
**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 52** - Espectro de RMN COSY do esteroide 1a (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A composição elementar dos esteroides 1 e 2 difere por dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio ( $C_{28}H_{42}O$  e  $C_{28}H_{40}$  para 2 e 1, respectivamente), o que equivale a uma molécula de água ( $H_2O$ ). O espectro de RMN de  $^1H$  do composto 2 (Figura 53) apresenta um múltiplo em  $\delta$  3,52 – 3,72, característico do H-3, um hidrogênio carbinólico, em esteroides do tipo ergostano. Assim, provavelmente o esteroide 2 é equivalente ao esteroide 1, cuja ligação dupla C-3(4) foi transformada em álcool por uma reação de adição de água, formando o esteroide Ergosta-5(6),7(8),14(15),22(23)-tetraeno-3-ol (2a). Todos os dados de RMN adquiridos para o 2a estão de acordo com os relatados na literatura (ANO et al., 2017) para o 14-deidroergosterol (14-DHE), incluindo a correlação HMBC entre os hidrogênios metílicos  $CH_3$ -19 com o carbono C-14, o que é um dado decisivo para atribuí-lo como um esteroide com dupla ligação em  $\Delta$ 14,15.

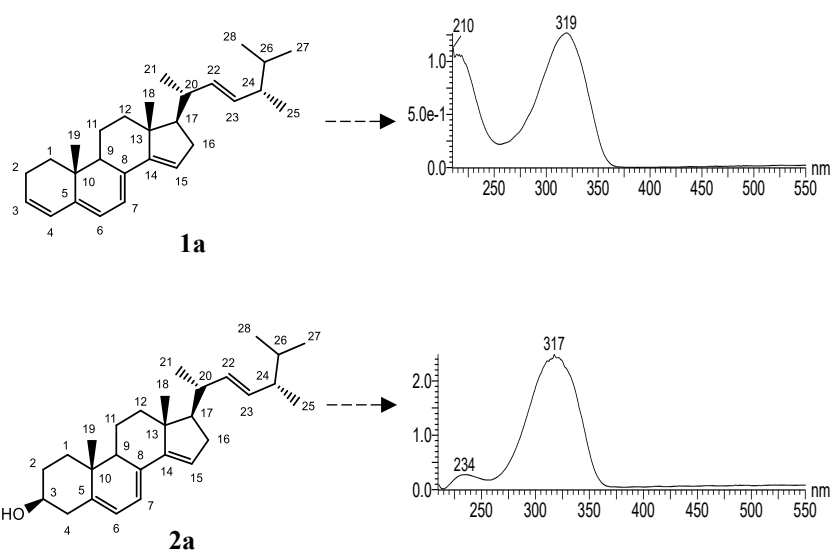


**Figura 53** - Espectro de RMN de  $^1H$  do esteroide 2a (400 MHz,  $CDCl_3$ ).

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Quando recém-isolado, o esteroide 2a é detectado como um pico único no cromatograma por UPLC e apresenta um espectro de absorção no UV muito semelhante ao do 1a, com  $\lambda_{max}$  em 317 nm (Figura 54). Esse foi considerado um dado inesperado, já que o esteroide 1a é um pentaeno conjugado, com  $\lambda_{max}$  em 319 nm, e o 2a contém uma ligação dupla a menos nesse sistema  $\pi$ , mas absorve em um  $\lambda_{max}$  muito similar (319 nm). Isso pode indicar que a ligação dupla  $\Delta$ 3,4 no esteroide 1a não participa efetivamente da conjugação estendida

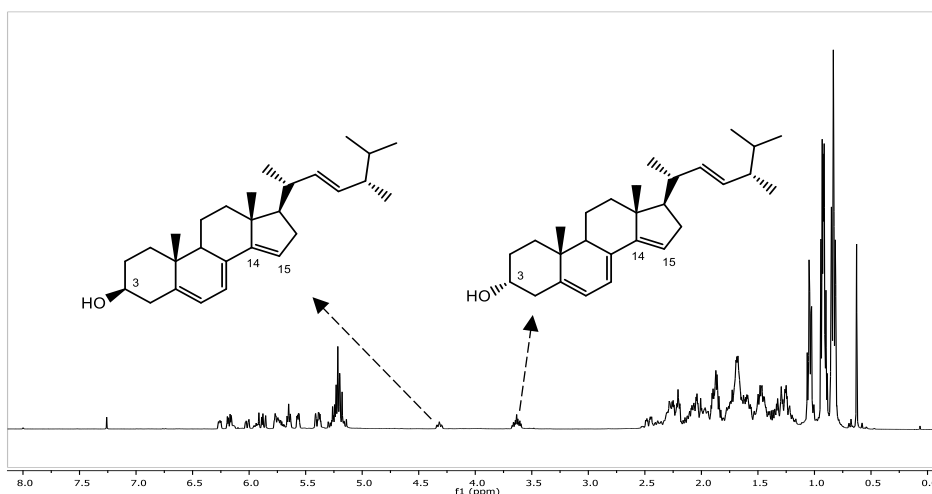
com os outros seis carbonos  $sp^2$  no sistema de anel tetracíclico e, de alguma forma, reage com a água, formando o 2a.



**Figura 54** - Estrutura química e absorção no ultravioleta dos esteroides 1a e 2a.

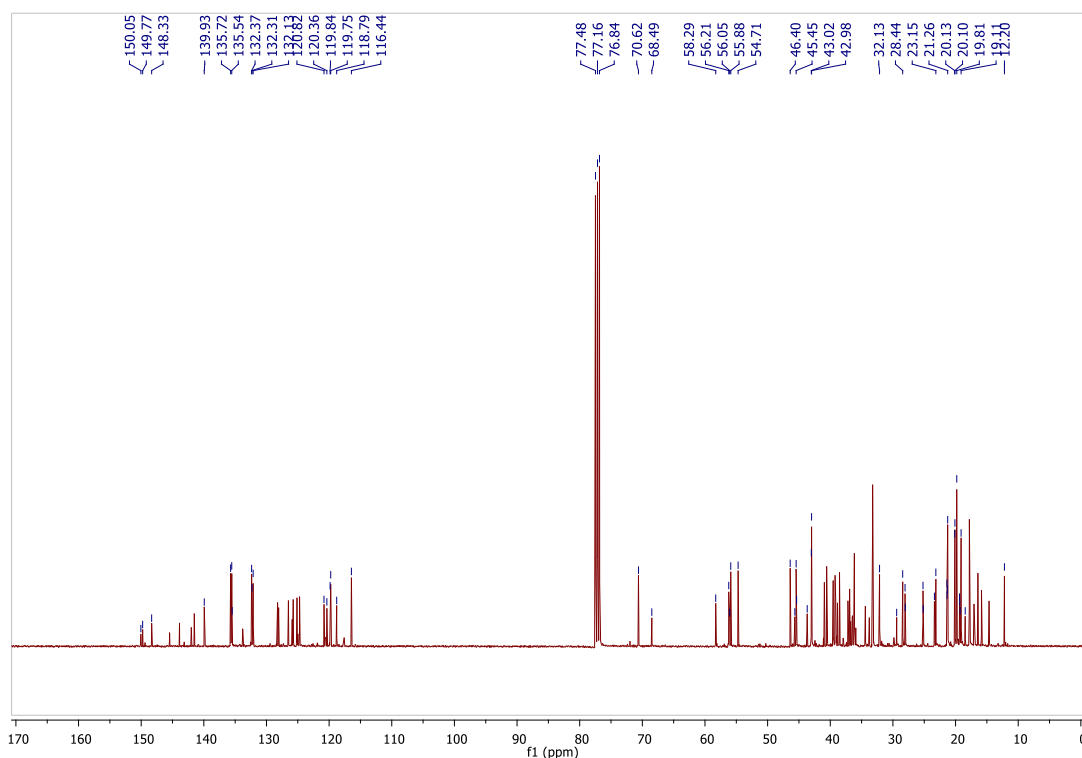
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Após algumas etapas de isolamento, o espectro de RMN de  $^1H$  do 2a (Figura 55) também mostra um múltiplo menos intenso em  $\delta$  4,25 – 4,38, muito semelhante ao sinal anteriormente mencionado para H-3 em ergostanos. O sinal principal de H-3 em  $\delta$  3,52 – 3,72 foi atribuído ao esteroide poliênico com  $3\beta$ -OH (2a), e o sinal menor ao isômero com  $3\alpha$ -OH (2b). Dois sinais para carbonos portadores de grupos hidroxila no espectro de RMN de  $^{13}C$  em  $\delta$  70,6 (CH) e 68,5 (CH) confirmam que o composto 2 é transformado em uma mistura epimérica de esteroides poliênicos 2a e 2b, sendo o principal o Ergosta-5(6),7(8),14(15),22(23)-tetraeno-3- $\beta$ -ol (2a).



**Figura 55** - Estrutura química e espectro de RMN de  $^1H$  do esteroide 2a.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

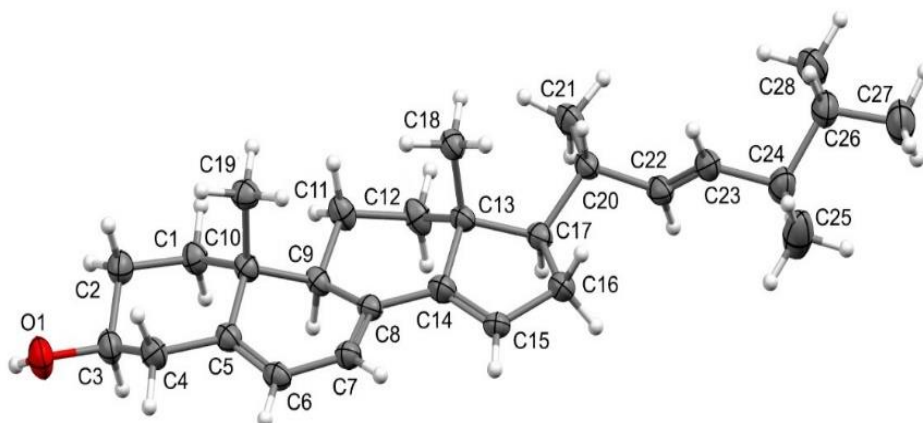


**Figura 56** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do esteroide 2a (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Fonte - Elaborado pelo autor.

### 6.11.5. Análise cristalográfica por raios X do esteroide 2a

O posicionamento da ligação dupla C-C em  $\Delta^{9,11}$  para o esteroide 2c (9-DHE) foi estabelecido por estudos cristalográficos relatados na literatura (DHANKHAR e HOODA, 2011). Embora o 14-DHE (2a) tenha sido estudado por espectroscopia de RMN 1D e 2D (ANO et al., 2017), não há análise por raios X publicada de sua estrutura cristalina.



**Figura 57** - Ilustração do tipo ORTEP da unidade assimétrica do esteroide 2a. Elipses térmicas representadas com 50% de probabilidade.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Descrição	Esteróide 2a
Fórmula química	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	394.61
Sistema cristalográfico	Monoclinic
Grupo especial	P2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	14.8904(3)
<i>b</i> (Å)	5.79970(10)
<i>c</i> (Å)	15.0162(3)
β (°)	111.711(2)
V (Å <sup>3</sup> )	1204.80(4)
Z	2
Densidade /g cm <sup>-3</sup>	1.088
θ <sub>min</sub> , θ <sub>max</sub> /°	6.336, 158.918
Faixas de índices	-18 ≤ <i>h</i> ≤ 18 -7 ≤ <i>k</i> ≤ 7 -18 ≤ <i>l</i> ≤ 14
F(000)	436.0
μ /mm <sup>-1</sup>	0.473
Correção de absorção	Multi-scan
Max./min. transmissão	1.000/0.781
Reflexões medidas	29309
Reflexões independentes / R <sub>int</sub>	5170/0.0486
Parâmetros refinados	270
Índices R finais [I ≥ 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0445/wR <sub>2</sub> = 0.1113
Índices R finais [all data]	R <sub>1</sub> = 0.0472/wR <sub>2</sub> = 0.1129
Goof	1.059
Maior pico ou vale (eÅ <sup>-3</sup> )	0.30/-0.19
Parâmetro Flack	0.2(5)

**Tabela 4** - Parâmetros cristalográficos do esteroide 2a.

Assim, tornou-se interessante confirmar a atribuição estrutural esteroidal obtida por RMN e investigar como o esteroide se organiza em forma cristalina. O esteroide 2a formou um sólido branco organizado, visível como finas agulhas após evaporação lenta de uma solução metanólica à temperatura ambiente. A estrutura desse esteroide polieno foi avaliada por difração de raios X de monocristal (Tabela 4), a qual revelou que ele cristalizou no grupo espacial

monoclínico não centrossimétrico  $P2_1$ , com uma molécula por unidade assimétrica. Um desenho ORTEP da estrutura resolvida é apresentado abaixo (Figura 57). Assim, confirma-se para o esteroide 2a o esqueleto esteroidal ergostano com um trieno no sistema de anéis tetracíclico, sendo uma das ligações duplas posicionada em  $\Delta_{14,15}$  e uma ligação dupla adicional na cadeia lateral.

A análise por difração de raios X em monocristal (SCXRD) mostrou a presença de um grupo hidroxila no carbono C-2 do esteroide 2a. Também foi observada a presença de quatro ligações duplas C-C na estrutura, com as ligações C-5–C-6, C-7–C-8, C-14–C-15 e C-22–C-23 apresentando comprimentos na faixa de 1,327 – 1,347 Å, conforme esperado para ligações duplas entre átomos de carbono. A Tabela 5 resume os comprimentos de ligações e ângulos selecionados para o esteroide 2a.

Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (°)	
C3–O1	1.432(3)	O1–C3–C4	106.9(2)
C5–C6	1.335(3)	C4–C5–C6	121.2(2)
C6–C7	1.450(3)	C7–C8–C14	121.7(2)
C7–C8	1.347(3)	C8–C14–C15	128.8(2)
C14–C15	1.344(3)	C8–C9–C11	114.2(2)
C22–C23	1.327(4)	C20–C22–C23	124.4(2)

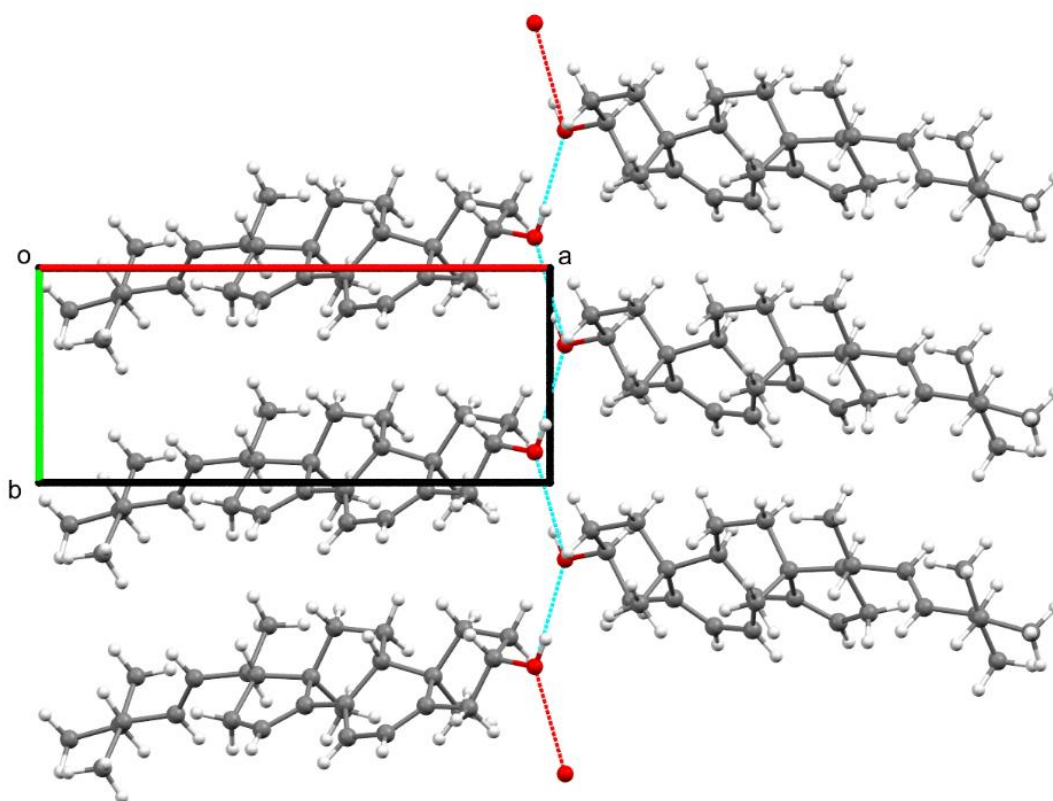
**Tabela 5** - Comprimentos de ligações e ângulos selecionados para o esteroide 2a.

Os parâmetros celulares foram reduzidos para  $a = 14,8904(3)$  Å,  $b = 5,79970(10)$  Å,  $c = 15,0162(3)$  Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 111,711(2)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ . A célula unitária deste esteroide apresentou um volume de  $1204,80(4)$  Å<sup>3</sup>, com uma densidade de  $1,088$  g/cm<sup>3</sup>, em conformidade com o valor calculado a partir da célula unitária que apresenta a fórmula C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O.

Comparando com a estrutura do esteroide 9-DHE (DHANKHAR e HOODA, 2011), que compartilha a mesma fórmula molecular do esteroide 2a, observa-se que os parâmetros da célula são significativamente reduzidos devido à mudança na posição da ligação dupla. Essa alteração provocaria variações na densidade eletrônica nas posições dos carbonos C-9 e C-11, influenciando as interações moleculares e, conseqüentemente, o empacotamento cristalino e as propriedades físico-químicas.

Esse esteroide possui sete centros estereogênicos, com o átomo C-3 na configuração S, enquanto os átomos C-9, C-10, C-13, C-17, C-20 e C-24 apresentam configuração R. Conforme verificado nas análises de RMN, o esteroide 2a não é estereoquimicamente puro, o que resultou em um cristal gêmeo por inversão com dois componentes em uma proporção de 4:1 e em um parâmetro de Flack de 0,2(5). Além disso, os dados obtidos por cristalografia de raios X estão de acordo com os resultados obtidos nas análises espectroscópicas.

A estrutura cristalina do esteroide 2a é estabilizada por ligações de hidrogênio O1–H1···O1' ( $d_{\text{H1}\cdots\text{O1}'} = 2,24 \text{ \AA}$  e  $\angle \text{O1–H1}\cdots\text{O1}' = 163,6^\circ$ ), o que permite a organização das unidades assimétricas em uma cadeia unidimensional ao longo da direção [010], conforme ilustrado na Figura 58.



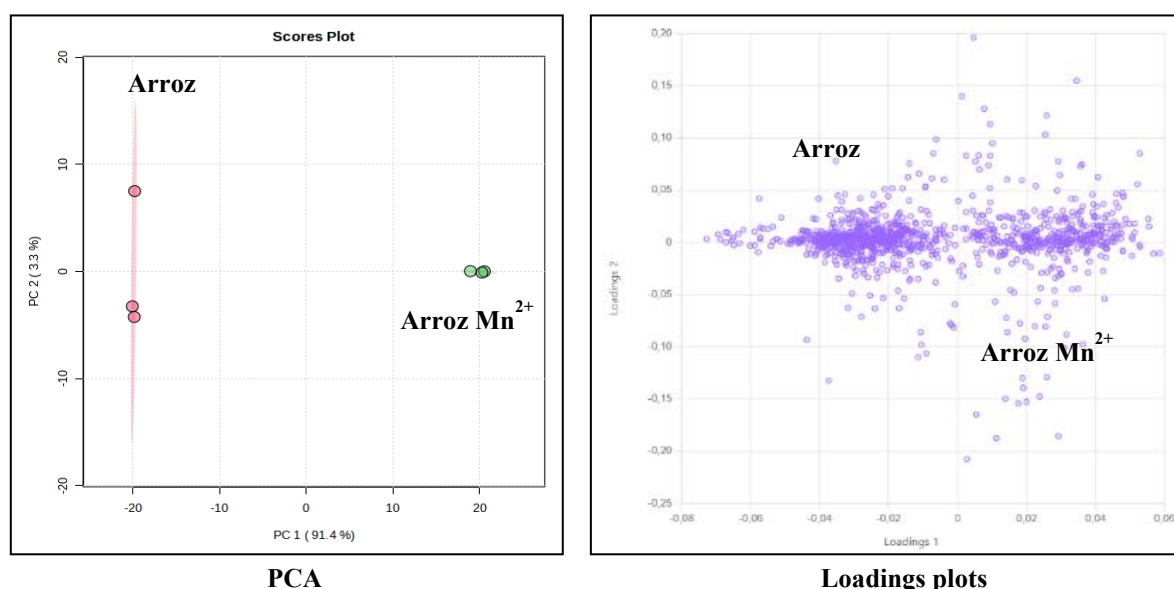
**Figura 58** - Cadeia unidimensional formada pelo esteroide 2a com as interações intermoleculares O1–H1···O1', visualizada no quadrante.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

### 6.11.6. Influência do cátion manganês na produção de esteroides poliênicos

Para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando o máximo de informações relevantes possível, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para avaliar a similaridade dos metabólitos isolados e identificados em experimentos conduzidos com e sem a adição do cátion manganês ao meio de cultivo. A aplicação da PCA permitiu explorar a distribuição das amostras, identificar padrões de agrupamento e compreender melhor a contribuição das variáveis para a variância total dos dados.

A análise revelou que a maior parte da variância total foi explicada por dois componentes principais (PCs). A Figura 59 apresenta o gráfico de escores da PCA e sua distribuição no gráfico de loadings no qual o primeiro (PC1) e o segundo (PC2) componentes principais juntos responderam por 94,7% da variabilidade dos dados. Foi observada uma alta correlação entre os experimentos, refletindo padrões distintos nos perfis metabólicos sob diferentes condições experimentais.



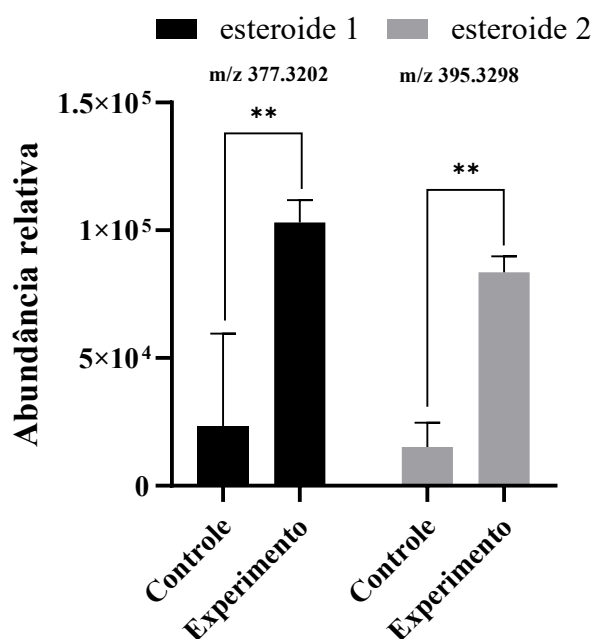
**Figura 59** - Gráfico de escores da PCA e loadings dos componentes principais PC1 e PC2, utilizando dados cromatográficos processados juntamente com os dados de cultivo do fungo *Talaromyces fuscoviridis* em meio de cultura com e sem manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – Metaboanalyst 6.0.

Além disso, o gráfico de cargas foi analisado para compreender a influência de cada variável na construção dos componentes principais. Esse gráfico revelou quais metabólitos tiveram maior impacto na diferenciação das amostras, destacando aqueles que mais contribuíram para a variação observada. A formação de agrupamentos no gráfico de cargas

indicou que os metabólitos apresentaram padrões distintos de contribuição para o PC1 e PC2, reforçando a equivalência dos compostos isolados a partir das diferentes culturas. Essa análise permitiu a identificação e confirmação de que a presença do indutor foi, de fato, responsável pela mudança na proporção dos compostos isolados, sugerindo um impacto direto do manganês na biossíntese de metabólitos secundários.

A presença de cátions metálicos de manganês no meio de cultura pode influenciar significativamente a atividade metabólica, especialmente na produção de metabólitos secundários. No presente estudo, observou-se um aumento na concentração relativa desses compostos quando o fungo *Talaromyces fuscoviridis* foi cultivado na presença de manganês, corroborando os resultados da PCA e demonstrando a influência direta desse metal no metabolismo fúngico (Figura 60).



**Figura 60** - Gráfico de abundância relativa dos esteroides isolados do fungo *Talaromyces fuscoviridis* em meio de cultura com e sem manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

O manganês atua como cofator para diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na biossíntese de esteroides. Sua presença pode ativar enzimas essenciais para a conversão de precursores e interagir diretamente com a via do mevalonato, responsável pela síntese de isoprenóides, incluindo os esteróis. Enzimas como a monooxigenase do citocromo P450, que desempenham um papel central na modificação estrutural dos esteroides, também podem ser reguladas pela disponibilidade de  $Mn^{2+}$ . Conseqüentemente, o aumento da produção

de esteroides observado nos experimentos pode estar relacionado à ativação dessas enzimas e à conversão aprimorada de intermediários metabólicos na presença desse cátion.

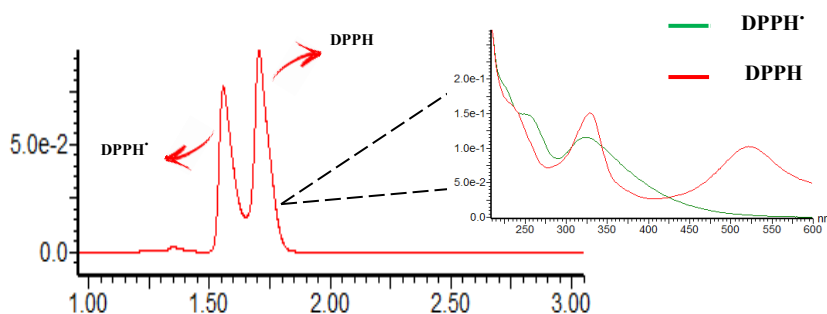
### **6.11.7. Avaliação do método cromatográfico e do potencial antioxidante dos compostos isolados**

Os radicais livres são espécies químicas muito instáveis com grande capacidade de causar danos celulares. Em sistemas biológicos, eles são principalmente os radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ), peroxila lipídica ( $\text{LOO}\cdot$ ) e algumas espécies nitrogenadas (ROSA et al., 2019). Assim, é interessante encontrar substâncias antioxidantes capazes de sequestrar essas entidades químicas agressivas, sendo úteis como protetores celulares. Um dos métodos mais comuns para avaliar a capacidade antioxidante de candidatos a protetores celulares mede a extensão da captura de radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (MOLYNEUX, 2012; ARORA e CHANDRA, 2011). Os radicais livres de DPPH ( $\text{DPP}\cdot$ ) apresentam absorção máxima a 517 nm. À medida que seu elétron desemparelhado se emparelha na presença de um doador de  $\text{H}\cdot$ , ele se transforma na forma estável de seu par reduzido (DPPH), que absorve em um comprimento de onda menor, na faixa de 330 nm (HAMEED et al., 2017; ARORA e CHANDRA, 2011). Portanto, a absorção a 517 nm, com e sem potenciais doadores de  $\text{H}\cdot$ , reflete a razão  $[\text{DPP}\cdot]/[\text{DPPH}]$  e pode ser associada à atividade antioxidante.

Embora o método espectrofotométrico direto para avaliar os radicais  $\text{DPP}\cdot$  seja amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante, ele pode apresentar limitações quando aplicado a matrizes que exibem interferências de absorção. Essa é exatamente a situação dos esteroides polieno que absorvem em torno de 320 nm, sofrendo forte interferência do DPPH ( $\lambda_{\text{máx}}$  em 330 nm). Assim, alguns grupos de pesquisa vêm desenvolvendo esforços para aprimorar esses ensaios (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022; LI et al., 2017). As separações cromatográficas utilizando HPLC têm se mostrado um método analítico mais específico e sensível para avaliar a atividade sequestradora de radicais  $\text{DPP}\cdot$ .

Durante o presente estudo, foi desenvolvido um método ainda mais rápido e sensível, utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (UPLC/DAD), para avaliar a capacidade de sequestro de radicais livres dos esteroides polieno. Enquanto a maioria dos métodos da literatura utiliza polifenóis como flavonoides como compostos de referência antioxidante, o método desenvolvido utilizou  $\beta$ -caroteno como composto de referência, já que os esteroides possuem característica lipofílica. Após o tempo de reação entre o candidato antioxidante e o radical  $\text{DPP}\cdot$ , a mistura reacional foi injetada no

sistema UPLC, resultando em dois picos cromatograficamente resolvidos, correspondentes ao DPPH e ao DPP•, dentro de 1,5 – 2,0 minutos (Figura 61). O sucesso desse método também é favorecido pelo uso de uma fase móvel composta predominantemente por solventes orgânicos sem doadores de H•, o que garante maior estabilidade do radical DPP•. Assim, a fase móvel utiliza um gradiente de acetonitrila/água, sendo necessário evitar o uso de metanol, pois ele também reage com o DPP•. Outros fatores como maior teor de água na fase móvel, adição de ácido à fase móvel e a concentração inicial de radicais DPPH também são considerados fatores importantes que podem influenciar a estabilidade desse radical (TATARCZAK-MICHALEWSKA e FLIEGER, 2022; HAMEED et al., 2017; ARORA e CHANDRA, 2011). A adaptação do ensaio com radical DPPH ao método de separação por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi considerada uma escolha metodológica satisfatória para este estudo, mostrando-se rápida e confiável.



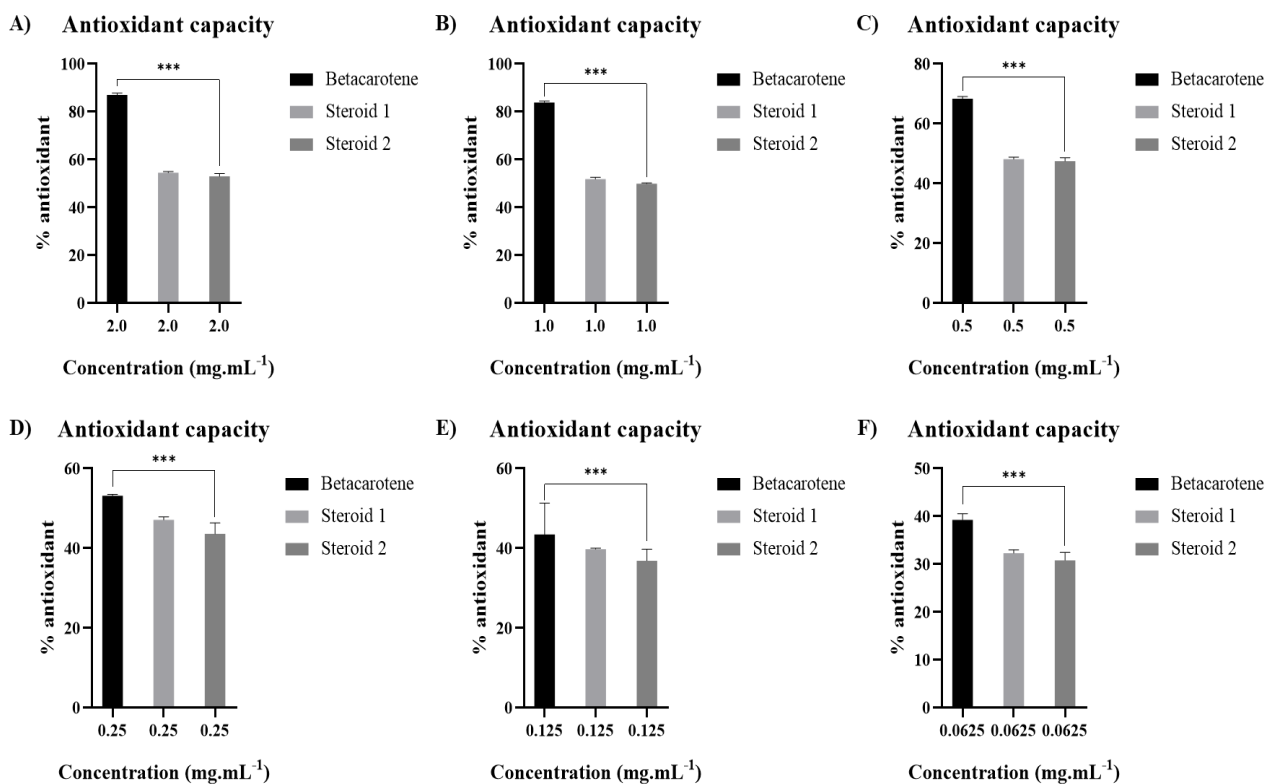
**Figura 61** - Cromatograma de DPPH a 0,075 mM, obtido em modo de eluição isocrática com 70% de acetonitrila e 30% de água.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Os esteróides 1a e 2a exibiram uma atividade muito similar de captura de radicais livres DPPH na faixa de concentração de 2,0 a 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>, com porcentagem de inibição superior a 55% nas concentrações mais altas, caindo para cerca de 30% nas concentrações mais baixas (= 6,25 ng.mL<sup>-1</sup>) (Figura 62 A-F). Essa atividade pode estar relacionada à característica estrutural desses compostos quando comparados a outras estruturas semelhantes, como o ergosterol. Compostos semelhantes a esteróides também exibem certa atividade contra esses radicais (SÁRKÖZY et al., 2020; ARORA e CHANDRA, 2011; LI et al., 2017).

O composto de referência β-caroteno inibe cerca de 80% do radical DPP• nas concentrações mais altas. É interessante notar que os esteróides 1 e 2 apresentam quase a mesma capacidade de captura de radicais que o β-caroteno nas concentrações mais baixas (Figura 62 D-F), superior a 80%. Até o momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre a

atividade antioxidante desses compostos associados ao fungo *Talaromyces fuscoviridis*, embora outros estudos sugiram que fungos pertencentes a este gênero possuam diferentes propriedades biológicas (LEI et al., 2022).



**Figura 62** - Potencial antioxidante dos esteróides 1a e 2a e do padrão  $\beta$ -caroteno contra os radicais livres DPPH com 95% de sensibilidade. As concentrações utilizadas dos compostos foram: A) 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>, B) 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, C) 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, D) 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>, E) 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>, F) 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A maioria dos antioxidantes encontrados entre os produtos naturais são substâncias polifenólicas hidrofílicas polares (RAMMOHAN, 2023). Os grupos hidroxila em polifenóis se dissociam facilmente homolítica e seletivamente devido à conjugação do radical fenóxido resultante com todo o sistema aromático, fornecendo H• que pode capturar espécies de radicais livres biológicos (RAMMOHAN et al., 2020). Assim, os polifenóis são antioxidantes fortes, rápidos e, muitas vezes, não específicos. Por outro lado, os polienos como  $\beta$ -caroteno, o composto de referência usado neste trabalho, e os esteróides tetraenos não possuem grupos hidroxila fenólicos. Supõe-se que os hidrogênios próximos às ligações duplas C-C (hidrogênios alílicos) sejam as fontes de H• a serem doados aos radicais livres biológicos

(TERAO, 2023). Essas ligações C-H alílicas são um pouco mais fortes que as ligações O-H em antioxidantes fenólicos. Portanto, os carotenoides e os esteróides polienos são geralmente antioxidantes mais fracos, mas certamente mais específicos devido à sua forte lipofilicidade. Uma hipótese que emerge disso é que talvez os polifenóis atuem como antioxidantes extracelulares, enquanto os esteróides lipofílicos e os carotenos podem proteger as paredes celulares, controlando espécies oxidantes invasoras.

Muitos fungos frequentemente demonstram uma incrível capacidade de habitar ambientes desafiadores, como solos contaminados com metais pesados ou variações significativas nos níveis de umidade e temperatura. Em ambientes com altos níveis de metais pesados, radiação UV elevada e altas temperaturas, facilita-se a produção excessiva de radicais livres. O estresse oxidativo causado por esses ambientes extremos pode desestabilizar membranas celulares e degradar biomoléculas essenciais para o seu desenvolvimento. Houve muitos esforços para compreender como esses microrganismos se adaptam a esses ambientes (MURDOCH e SKAAR, 2022; ANDREINI et al., 2008; ABREU e CABELLI, 2010). Os antioxidantes produzidos pelos fungos podem ajudar a neutralizar esses radicais, protegendo as células fúngicas de danos e permitindo sua sobrevivência. Outra característica importante é que, em ambientes com nutrientes limitados, a produção desses compostos antioxidantes auxilia na absorção de nutrientes essenciais, otimizando seu crescimento e reprodução. Assim, os esteróides polienos, juntamente com outros compostos não identificados, podem compor um arsenal antioxidante que ajuda o fungo *Talaromyces fuscoviridis* a sobreviver a tais ambientes.

## 6.12. Conclusões

Os estudos realizados demonstram que *Talaromyces fuscoviridis* é uma fonte promissora de compostos com atividade antioxidante, especialmente os esteroides isolados, que apresentaram capacidade de reduzir radicais livres DPPH. Essa atividade antioxidante está fortemente relacionada à estrutura química e à concentração dos compostos, características que influenciam seu potencial como agentes protetores contra o estresse oxidativo e os danos celulares decorrentes de diferentes condições ambientais.

Compostos como esteroides, apesar de não serem tradicionalmente reconhecidos por sua ação antioxidante, podem exercer essa função dependendo de seu tipo estrutural, desempenhando um papel importante nos mecanismos de defesa do organismo e no desenvolvimento de estratégias biológicas adaptativas. Assim, seu uso demonstra um potencial significativo para aplicação como recurso bioativo em diversos setores, incluindo os segmentos farmacêutico, alimentício e biotecnológico.

A avaliação da atividade antioxidante por meio de cromatografia líquida com detecção por UV, utilizando o princípio da reação com o radical DPPH, mostrou-se uma metodologia rápida, sensível, reprodutível e eficiente. Essa abordagem instrumental, aliada à integração de dados cromatográficos, análises de redes moleculares e ensaios biológicos comparativos com padrões de referência, permitiu não apenas o monitoramento eficaz da atividade antioxidante, mas também a identificação de substâncias bioativas com potencial aplicação como antioxidantes naturais.

Esses achados reforçam a importância de estratégias analíticas modernas na bioprospecção de metabólitos fúngicos e evidenciam o valor do uso integrado de ferramentas químicas e biológicas na descoberta de novos compostos naturais com aplicações funcionais.

## 7. Capítulo 4 – Avaliação química e quantificação de depsidonas isoladas do fungo *Talaromyces aureolinus* em meio czapek e arroz modificado com manganês

---

### 7.1. Introdução

A crescente busca por novos compostos bioativos provenientes de fontes naturais, especialmente de microrganismos, tem impulsionado significativamente a pesquisa em áreas como a biotecnologia e a farmacologia. Entre esses microrganismos, os fungos desempenham um papel de destaque devido à sua habilidade de sintetizar uma ampla gama de metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Nesse cenário, o gênero *Talaromyces* se sobressai como uma fonte proeminente de diversidade química, sendo amplamente reconhecido por produzir compostos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, entre outras atividades biológicas relevantes (WEI; XU; WANG, 2021; SALVATORE et al., 2024).

Este estudo concentrou-se na avaliação química e quantificação de depsidonas lactônicas isoladas do fungo *Talaromyces aureolinus*, uma espécie notável por sua capacidade de biossintetizar essas moléculas complexas. Tais compostos pertencem à classe dos penicilídeos, uma família de depsidonas amplamente distribuída em espécies de *Talaromyces* e *Penicillium*, muitas vezes associadas a ambientes marinhos, solos e como endófitos vegetais, o que sugere um papel ecológico relevante desses fungos como mutualistas defensivos (SALVATORE et al., 2024).

A utilização de diferentes meios de cultivo, como o czapek e o arroz modificado com manganês, foi considerada uma estratégia eficaz para induzir a produção de metabólitos específicos, ajustando as condições ambientais e nutricionais para maximizar a síntese de compostos de interesse (WEI; XU; WANG, 2021). O manganês, como cátion metálico, é conhecido por influenciar a expressão gênica relacionada ao metabolismo secundário em fungos, promovendo a ativação de rotas biossintéticas latentes (ZHAI et al., 2016; SALVATORE et al., 2024).

Além da regulação por condições abióticas, estudos demonstram que a presença de espécies competidoras ou interações simbióticas também pode modular a produção de penicilídeos e derivados, como observado na cocultura de *Talaromyces pinophilus* com *Trichoderma harzianum*, que aumentou significativamente a produção de secopenicilídeos (SALVATORE et al., 2024).

Ao investigar o comportamento do *Talaromyces aureolinus* em meios modificados, este trabalho visou não apenas compreender melhor o papel do manganês na modulação do metabolismo secundário, mas também destacar o potencial deste fungo como fonte de compostos bioativos para futuras aplicações farmacêuticas, cosméticas e agrícolas. Estudos apontam que penicilídeos, como a penicilida e purpactina A, apresentam efeitos antibacterianos relevantes, inclusive contra cepas resistentes como *Staphylococcus aureus* MRSA, com concentrações inibitórias mínimas bastante promissoras (SALVATORE et al., 2024).

Este estudo contribui para o entendimento da química de fungos extremófilos e suas aplicações sustentáveis, reafirmando a importância de explorar a biodiversidade fúngica como uma rica fonte de inovação científica e biotecnológica. A perspectiva biotecnológica do gênero *Talaromyces*, associada à sua expressiva quimiodiversidade e capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos, o consolida como um grupo promissor na prospecção de novos produtos naturais bioativos (YANG; LI; JI, 2015; LIU et al., 2010; SALVATORE et al., 2024).

## 7.2. Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN foram adquiridos em solução de  $\text{CD}_3\text{OD}$ , com tetrametilsilano (TMS) como sinal de referência, utilizando um instrumento Bruker AVANCE III, 9,4 Tesla, equipado com um autoamostrador, uma cabeça de sonda ATMA® BFO de 5 mm e um gradiente de campo no eixo Z, operando a 400 e 100 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Os dados de espectrometria de massas de alta resolução foram adquiridos em um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF MS, Impac II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), acoplado a um UHPLC (Shimadzu Nexera X2, Tóquio, Japão), utilizando uma coluna reversa C-18 de 135 Å de porosidade e tamanho de partícula de 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Billerica, MA, EUA), 2,1×100 mm. As análises de GC/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas QP-2010-plus (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a uma cromatografia gasosa GC-17A equipada com uma coluna de sílica fundida Restek-Rxi-5ms (J&W Scientific, 10 m x 0,10 mm x 0,10  $\mu\text{m}$ ). A cromatografia preparativa de média pressão (MPLC) foi realizada utilizando um sistema Teledyne-Isco Combiflash RF 200, com colunas empacotadas com sílica gel RediSep gold. A TLC foi realizada em placas de sílica gel GF254 pré-revestidas com suporte de alumínio; as manchas foram visualizadas sob luz UV ou por pulverização com ácido sulfúrico a 10% em EtOH seguido de aquecimento. Os ensaios para atividade antioxidante utilizaram uma cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC-Acquity M-Class) da Waters (Manchester, Reino Unido) equipada com uma coluna C-18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm). Os dados de difração de raios-X foram coletados a 100 K em um difratômetro Rigaku XtaLAB Synergy-S Dualflex equipado com um detector Hypix-6000 HE, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  (1,54184 Å). O sequenciamento genético para identificação fúngica foi realizado com um sequenciador

automático ABI 3500XL Series (Applied Biosystems).

Os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol foram de grau analítico e adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil) e Quimis (Indaiatuba, SP, Brasil). Para separações HPLC, foram utilizados acetonitrilo e metanol de grau cromatográfico (Panreac, Barcelona, Espanha). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical e utilizados sem purificação adicional.

### 7.3. Isolamento do micro-organismo

A amostra de solo foi coletada da bacia de resíduos de mineração de uma mina de cobre no estado do Pará, Brasil (posição global: -6.429729, -50.081160). A cepa isolada foi obtida de solo a uma profundidade de 0 a 10 cm. Alíquotas de aproximadamente 50 µL de uma suspensão de solo preparada com 25 g em 225 mL de água desionizada esterilizada contendo cloranfenicol e tetraciclina, ambos a uma concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, foram espalhadas em placas de Petri contendo BDA. As colônias em crescimento foram re-cultivadas em novas placas. Após o isolamento, os fungos foram preservados em água esterilizada e depositados na micoteca do laboratório multidisciplinar de biologia da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA. Posteriormente, foram compartilhados com a micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos - LaBioMMi, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos, Brasil. *Talaromyces aureolimus* foi codificado como P<sub>2</sub>Z<sub>1</sub>B<sub>10</sub>.

### 7.4. Identificação do micro-organismo

Para observações morfológicas, o fungo isolado foi cultivado em microescala utilizando a técnica de cultura em lâmina. Nesse método, uma suspensão de células do fungo foi inoculada em lâminas de microscopia contendo 40 µL de meio de cultura BDA. A suspensão preparada foi transferida para o meio de cultura utilizando uma alça de platina previamente esterilizada em chama. Após a inoculação, uma lamínula foi cuidadosamente colocada sobre a superfície do meio de cultura. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril.

Para criar condições adequadas de cultivo, um pedaço de algodão umedecido foi adicionado à placa de Petri, garantindo que não entrasse em contato com a lâmina ou a lamínula. A placa de cultura foi então selada e incubada a 27 °C por 6 dias em um incubador do tipo BOD. Após o período de incubação, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro, permitindo a visualização dos aspectos morfológicos das estruturas fúngicas observadas.

O sequenciamento de DNA genômico (Bt2/Bt2b) também foi utilizado para confirmar a identificação do fungo. Uma suspensão celular do fungo foi transferida para um meio de cultura apropriado e incubada a 28 °C. O DNA genômico desse microrganismo foi

purificado utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol. A amplificação do marcador foi realizada por metodologia de PCR, utilizando o DNA extraído como molde. O primer (oligonucleotídeos sintéticos) usado na reação de PCR foi Bt2/Bt2b, complementar à região de  $\beta$ -Tubulina. O produto da amplificação foi purificado em uma coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento em um sequenciador automático da série ABI 3500XL. O primer utilizado para o sequenciamento foi Bt2a/Bt2b.

As sequências genéticas parciais obtidas com o primer foram montadas em uma sequência consenso única (uma sequência consenso combinada com diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com sequências de organismos representados nos bancos de dados Genbank e CBS. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o software CLUSTAL X, associado ao BioEdit 7.2.6. Análises de distância foram realizadas utilizando o software MEGA v.11.0. A matriz de distância foi calculada com base no modelo de Kimura, e a construção do dendrograma de distância genética foi realizada pelo método Neighbor-Joining, com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 reamostragens.

## **7.5. Produção dos extratos e fracionamento**

O isolado fúngico foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA (batata, dextrose e agar), que foram esterilizadas em um autoclave vertical Phoenix sob 1 atm a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, as placas foram resfriadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro do isolado de *Talaromyces aureolinus* foram usados para inocular as placas em um ambiente de fluxo laminar. As placas foram incubadas por um período de 10 dias.

Uma suspensão de esporos foi preparada usando um laço de platina para transferir células fúngicas das placas para um tubo Falcon contendo cerca de 30 mL de água destilada autoclave. A suspensão foi agitada em um vortex. O número de esporos foi contado em uma câmara de Neubauer e ajustado para  $1 \times 10^5$  células por mL. Esta suspensão foi distribuída em dez frascos Erlenmeyer de 1000 mL, cada um contendo cerca de 200 gramas de arroz previamente autoclave duas vezes a 121°C sob 1 atm por 15 minutos. Eles foram então incubados a 28°C por 30 dias. Após a incubação, as culturas foram extraídas com cerca de 200 mL de etanol por frasco Erlenmeyer. A biomassa foi macerada com uma barra de vidro para otimizar a extração, seguida de sonicação por 20 minutos em um banho ultrassônico. A extração também foi realizada utilizando acetato de etila. O extrato final foi filtrado sob vácuo, e a fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo para evaporação do solvente. Este

procedimento foi repetido três vezes. Uma alíquota deste extrato foi utilizada para análise do perfil metabolômico em um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker QToF) acoplado à cromatografia líquida.

O extrato foi fracionado em uma coluna seca de cromatografia a vácuo, utilizando uma coluna de 30 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro, embalada com gel de sílica 60 (malha 70-230). Seis frações foram coletadas com eluentes compostos de hexano, acetato de etila e metanol em proporções de polaridade crescente (respectivamente 95:5:0 – Fr1; 70:30:0 – Fr2; 0:100:0 – Fr3; 0:90:10 – Fr4; 0:70:30 – Fr5; 0:0:100 – Fr6). A fração Fr3 foi submetida a uma purificação adicional usando uma cromatografia de média pressão em uma coluna de gel de sílica montada no sistema Combiflash RF 200, eluída com gradiente de acetato de etila e metanol, resultando em 3 depsidonas lactônicas puras, que apresentaram como aspecto físico um sólido marrom amorfo.

## **7.6. Análise dos extratos fúngicos por UHPLC-MS/MS**

A análise do perfil metabolômico dos extratos brutos foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (QToF, Bruker). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 (da Waters). A fase móvel consistiu de água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B). Foi aplicada uma eluição em gradiente, começando com 95% A e 5% B por 1 minuto, passando para 30% A e 70% B aos 12 minutos, alcançando 2% A e 98% B aos 20 minutos e retornando às condições iniciais entre 20 e 25 minutos, garantindo a reequilibração da coluna. A taxa de fluxo foi mantida em 0,25 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna a 40°C.

Antes da análise, o espectrômetro de massas foi calibrado usando uma solução de formiato de sódio (10 mmol.L<sup>-1</sup>; isopropanol:água, 1:1 v/v) com adição de 50 µL de ácido fórmico concentrado. Durante a operação, a fonte de íons ESI foi configurada no modo de ionização positiva, com uma voltagem de capilar de 4500 V e um desvio de placa final de -500 V. O gás seco foi mantido a 8 L.min<sup>-1</sup>, a 180°C, e o gás nebulizador foi ajustado para 4 bar. A aquisição de dados variou de m/z 50 a 1500 com uma taxa de 5 Hz. Para análise MS/MS em tandem, foi realizada uma fragmentação automática de varredura MS/MS com foco nos cinco íons mais intensos de cada pico cromatográfico, otimizando a qualidade dos dados e os padrões de fragmentação específicos de íons para identificação subsequente dos metabolitos.

## 7.7. Construção da rede molecular

A rede molecular baseada nos dados espectrais de massas foi estabelecida usando a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Dados MS de alta resolução das amostras foram adquiridos utilizando uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), que normalmente fornece íons precursores proeminentes. Em seguida, os dados de LC-MS/MS foram analisados e processados usando o software MS-DIAL versão 4.24, com a detecção de massas avaliada dentro de um intervalo de tempo de retenção de 0,3 a 25,0 minutos, utilizando detecção de massa centróide e um limite de nível de ruído de  $1,0 \times 10^4$ . Os parâmetros de tolerância para MS1 e MS2 foram ajustados de acordo com os padrões GNPS, com MS1 a 0,02 Da e MS2 a 0,02 Da. O intervalo de massas foi ajustado de m/z 50 a 1500. Os parâmetros de deconvolução incluíram uma janela de 0,5 e um corte de abundância MS/MS no nível de amplitude 30. O alinhamento foi baseado em dados de referência aplicados a uma amostra em branco, com uma tolerância de tempo de retenção de 0,5 minutos. O fator de retenção e o fator MS1 também usaram um valor de 0,5, aplicável dentro de um intervalo de referência de 0-1.

Os arquivos foram processados por meio do algoritmo de redes espectrais (GNPS) em três formatos: um arquivo mgf de espectros deconvoluídos pelo MS-DIAL 4.24, uma tabela de quantificação dos picos gerados nesse processo e uma tabela de metadados com informações da amostra, como tipo de amostra e modo experimental. No GNPS, a tolerância de massa para o íon precursor foi de 0,02 Da, a tolerância de massa para o íon fragmentado foi de 0,02 Da, foi usado um mínimo de 5 picos correspondentes e um limiar de pontuação de 0,7. As opções avançadas de busca incluíram uma classe de biblioteca com um histórico superior a 1 por espectro e o uso da biblioteca espectral GNPS. As opções avançadas da rede foram configuradas para um par de cosseno mínimo de 0,65 e uma rede TopK de 10. A visualização da rede foi realizada usando o software Cytoscape versão 3.10.2.

## 7.8. Análise UPLC/MS via modo de aquisição MRM para quantificação dos compostos isolados

A quantificação dos compostos isolados foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, Waters Acquity®) acoplado a um espectrômetro de massas operando com fonte de ionização por electrospray (ESI) em modo positivo, com aquisição em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna ACQUITY

UPLC® CSH™ C18 (1,7 µm; 2,1 × 100 mm), mantida à temperatura constante de 40 °C.

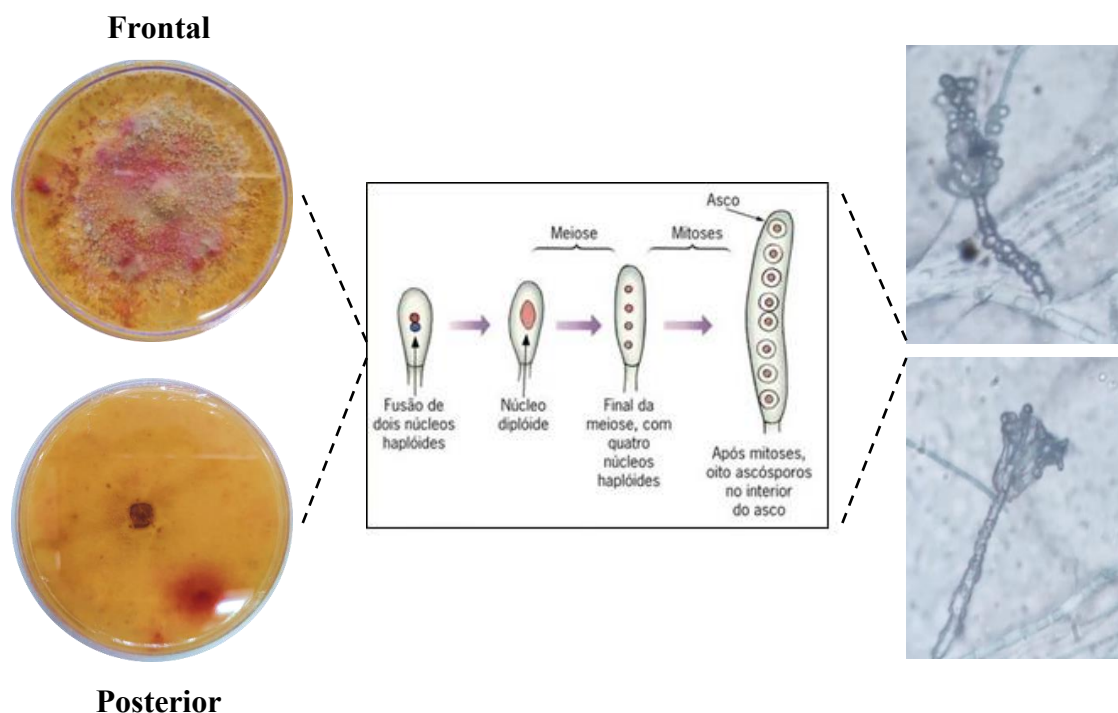
A fase móvel foi composta por água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O sistema operou em regime de eluição gradiente ao longo de 15 minutos, com uma vazão constante de 0,400 mL.min<sup>-1</sup>. Inicialmente, a composição era de 90% A e 10% C, mantida até 1,5 minuto. A partir de então, o teor de acetonitrila foi progressivamente aumentado: 20% aos 4 minutos, 70% aos 9 minutos e 100% aos 11 minutos. Essa condição foi mantida até 12,5 minutos, seguida pelo retorno às condições iniciais (92% A, 8% C) aos 13 minutos, finalizando a corrida em 15 minutos com reequilíbrio da coluna. As amostras foram injetadas em volume de 5 µL. A identificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção, nas transições MRM específicas e nos dados de fragmentação previamente adquiridos. A utilização do modo MRM foi fundamental para garantir seletividade e sensibilidade na detecção dos analitos, especialmente em uma matriz complexa.

A quantificação dos compostos foi realizada pelo método da curva analítica utilizando uma solução padrão dos compostos isolados com faixa de concentração de 1,953125 a 250 µg/mL. Para avaliação do teste foi utilizada a seguinte equação: [composto 1, 2, 3, µg/mL] = AP(composto 1, 2, 3) – b/δ, onde AP(composto 1, 2, 3) é a área do pico do composto 1, 2, 3 em diferentes concentrações, (b) é o coeficiente linear e (δ) é o coeficiente angular da curva analítica. Além disso, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pela relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, conforme as seguintes equações: LD = (3,3 x σ/S) e LQ = (10 x σ/S), onde o desvio padrão da resposta (σ) pode ser determinado com base no desvio padrão da interceptação da linha de regressão (é o coeficiente linear da equação), enquanto (S) representa a inclinação da curva de calibração (é o coeficiente angular da curva analítica). Todas as análises foram realizadas em triplicata (CASSIANO et al., 2009; RIBANI et al., 2004).

## 7.9. Resultado e discussões

### 7.9.1. Identificação do fungo *Talaromyces aureolinus*

O fungo cresceu em placas de Petri com meio BDA, formando estruturas intensamente pigmentadas em amarelo-alaranjado, visíveis na parte frontal da placa e apresentando coloração semelhante na parte posterior (Figura 63).

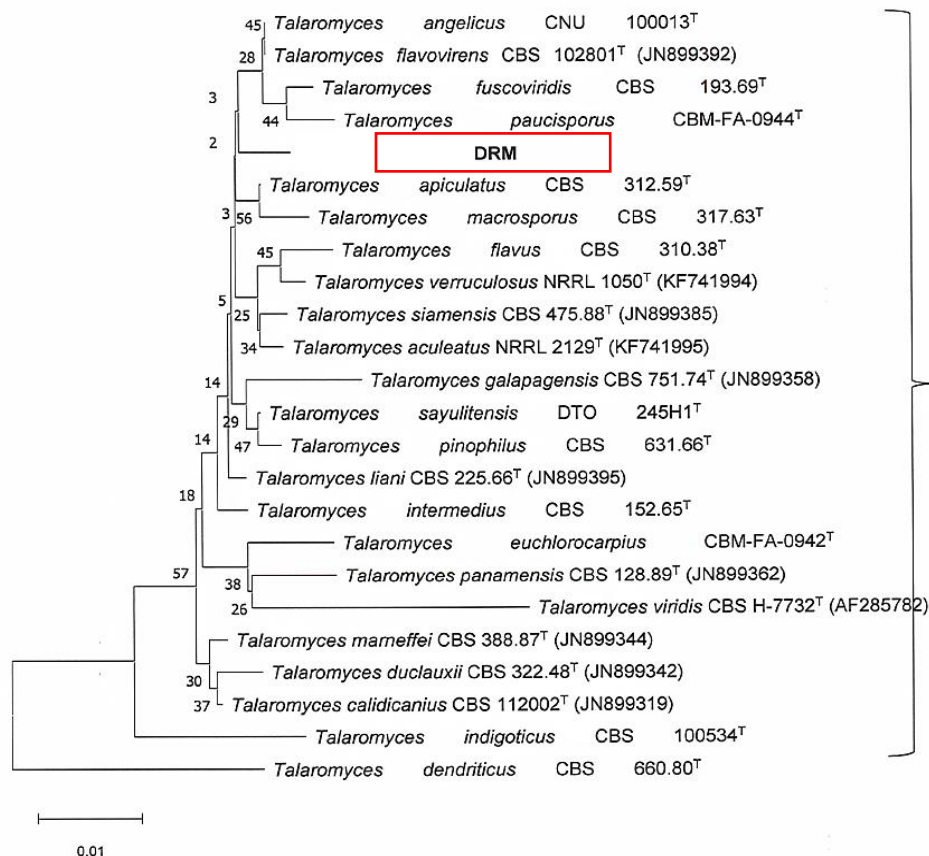


**Figura 63** - Morfologia do crescimento em placa de Petri (frontal e posterior) do fungo *Talaromyces aureolinus* e micrografia obtida a partir de microcultura, utilizando um microscópio com lente de 40x.

**Fonte** - Adaptado de César e Sezar (2019).

A micrografia revelou conidióforos verticilados com a formação de fiáldes, e os conídios estavam organizados em cadeias, com maior concentração nas regiões superiores. Além disso, observou-se a presença de gimnotécios amarelo-alaranjados, contendo ascos de origem única e ascósporos elipsoidais e espinhosos. Essas características são altamente compatíveis com fungos do gênero *Talaromyces aureolinus* (WEI; XU; WANG, 2021).

Embora a identificação do gênero do fungo tenha sido clara por inspeção morfológica, a determinação da espécie foi realizada apenas por sequenciamento do DNA genômico. A sequência da região  $\beta$ -Tub da amostra apresentou 99-100% de similaridade com sequências da mesma região ribossômica de diferentes espécies dentro do gênero *Talaromyces*, conforme depositadas nos bancos de dados GenBank e CBS-Knaw. A análise da distância genética posicionou a amostra de fungo em um agrupamento dentro da seção *Talaromyces*, porém sem definir nenhuma espécie. Assim os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final deste fungo como sendo *Talaromyces* sp (Figura 64).



**Figura 64** - Dendrograma baseado na distância genética, utilizando o método Neighbor-Joining, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região  $\beta$ -Tub da amostra DRM e as sequências de cepas de microrganismos relacionados presentes nos bancos de dados Mycobank (CBS Know, atualmente Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e GenBank.

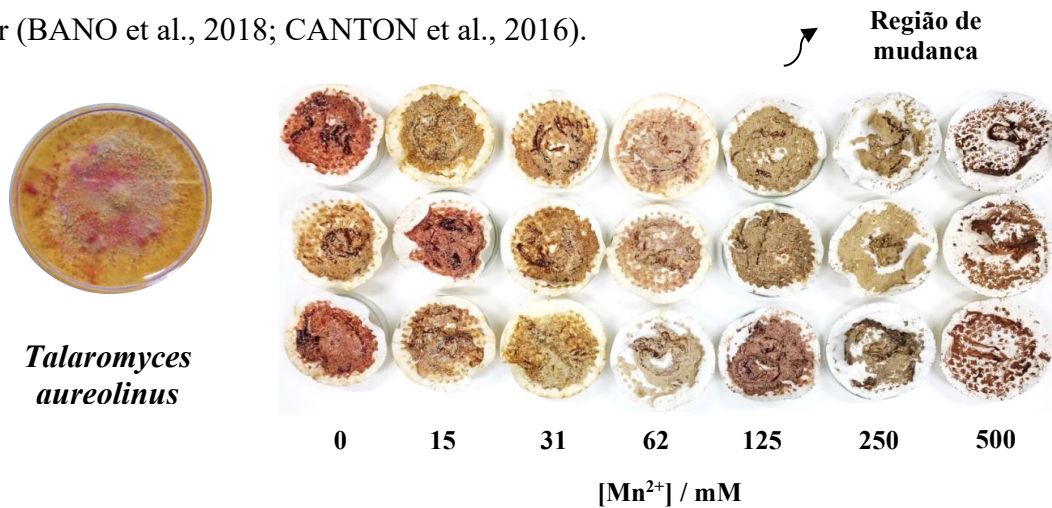
Fonte - Elaborado pelo autor.

### 7.9.2. Otimização experimental: tolerância ao íon manganês

A tolerância do fungo ao  $Mn^{2+}$  foi avaliada usando concentrações de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  variando de 0 a 1000 mM em meio base de czapek, onde fungos filamentosos geralmente crescem muito bem.

As réplicas da concentração 0 mM foram usadas como referência para o crescimento do fungo. Observou-se que, em concentrações iniciais (0 - 31 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ), o fungo mantém sua coloração e não apresenta mudanças morfológicas macroscópicas aparentes. Em concentrações acima de 31 mM, o micélio começa a escurecer, até a concentração de 500 mM, onde produz apenas pequenas quantidades de células. Concentrações de 1000 mM de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  inibem completamente o crescimento do fungo. Assim, a concentração máxima na qual ainda consegue crescer está entre 250 e 500 mM (Figura 65).

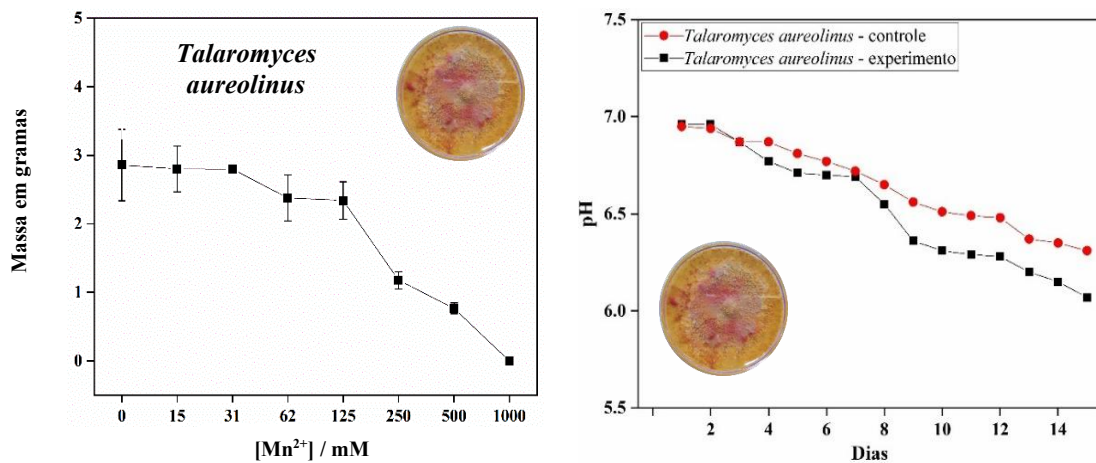
Essa mudança de cor de marrom para marrom-escuro provavelmente está relacionada ao acúmulo de dióxido de manganês ( $MnO_2$ ), um pó de cor preta a marrom, que é um produto da oxidação de  $Mn^{2+}$  pelas manganês peroxidases do fungo. Observou-se que os fungos utilizam essas peroxidases para lidar com o excesso de manganês. Após certa concentração, as peroxidases perdem sua capacidade de desintoxicação, e o fungo para de crescer (BANO et al., 2018; CANTON et al., 2016).



**Figura 65** - Evolução da mudança de coloração da biomassa de acordo com o aumento de concentração de manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A concentração de 15 mM  $Mn^{2+}$  promove um aumento de aproximadamente 15% na massa micelial, mas começa a retornar ao valor de controle em 31 e 62 mM, e então cai 40% nas concentrações de 125, 250 e 500 mM  $Mn^{2+}$ .



**Figura 66** - Taxa de crescimento médio do fungo *Talaromyces aureolinus* em teste controle e em teste de toxicidade com diferentes concentrações de  $Mn^{2+}$  e a variação de pH nos dias de experimento.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A toxicidade do  $Mn^{2+}$  inicia a atividade das peroxidases, ocorre em concentrações ligeiramente superiores a 62 mM. A inibição do crescimento microbiano por  $Mn^{2+}$  depende de muitos fatores, como pH e a presença de outros cátions, como o  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (Figura 66). Enquanto algumas leveduras são inibidas a 32 mM  $Mn^{2+}$ , algumas bactérias do gênero *Serratia* podem tolerar até 1200 mM  $MnSO_4$ , embora muitas outras bactérias apresentem concentração inibitória mínima (MIC) geralmente abaixo de 30 mM. O fungo *Cladosporium cladosporioides* cresceu bem em um meio contendo 60 mM  $Mn^{2+}$ , mas também conseguiu tolerar 1200 mM.

Enzimas peroxidases têm sido associadas à oxidação de manganês em várias espécies de microrganismos. Além disso, em certos fungos basidiomicetos, *Penicillium* e *Aspergillus*, a oxidação de manganês por enzimas peroxidases extracelulares também foi estudada. A enzima manganês peroxidase é capaz de promover a oxidação do íon manganês  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ , que é estabilizado por metabólitos derivados de ácidos orgânicos. O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao de outras peroxidases contendo heme, mas a manganês peroxidase exibe uma preferência por  $Mn^{2+}$  como doador de elétrons (KUMAR et al., 2013; TOMIKAWA et al., 2000; DONG et al., 2009; KAIFUCHI et al., 2015; TAKEUCHI et al., 1989; LI et al., 2011; FUJIMOTO et al., 1990; YOSHIDA et al., 1995; TABATA et al., 1999; BARA et al., 2013; VAN EIJK, 1973; MATSUNAGA et al., 2015).

Embora os microrganismos apresentem uma ampla diversidade de níveis de tolerância ao  $Mn^{2+}$ , os estudos encontrados na literatura indicam que sempre haverá uma concentração mínima que começa a perturbar sua maquinaria bioquímica para se adaptar às condições adversas. Isso é interessante para nosso propósito neste trabalho, uma vez que a inibição ou indução de novas enzimas pode impactar na biossíntese de produtos naturais pelo fungo (DETHOUP et al., 2007; MORINO et al., 1995; MIAO et al., 2012; KOMAI et al., 2004; HE et al., 2014; KAWAGUCHI et al., 2013; ARAI et al., 2002; HAYADHI et al., 2012; LI et al., 2011).

### 7.9.3. Análise estrutural dos compostos isolados

Os compostos isolados foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), permitindo a identificação exata da massa molecular e a determinação da fórmula molecular com base em erros inferiores a 5 ppm. A fragmentação induzida por colisão (MS/MS) permitiu identificar padrões característicos de perdas de radicais funcionais típicos de depsídonas, confirmando a identidade estrutural preliminar (ZHAI et al., 2016; CHU et al., 2010; GUO et al., 2011). A análise espectroscópica por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC complementou a caracterização estrutural, permitindo a elucidação completa dos esqueletos químicos e a diferenciação entre isômeros ou compostos análogos.

Assim, a combinação entre os dados de tempo de retenção no cromatograma (Figura 67), os perfis espectrométricos de massas e os dados de RMN consolidou a identificação estrutural dos compostos como metabólitos secundários do tipo depsidona, reforçando o potencial químico de *Talaromyces aureolinus* como fonte de substâncias bioativas, especialmente sob condições moduladas por íons metálicos como  $\text{Mn}^{2+}$ .

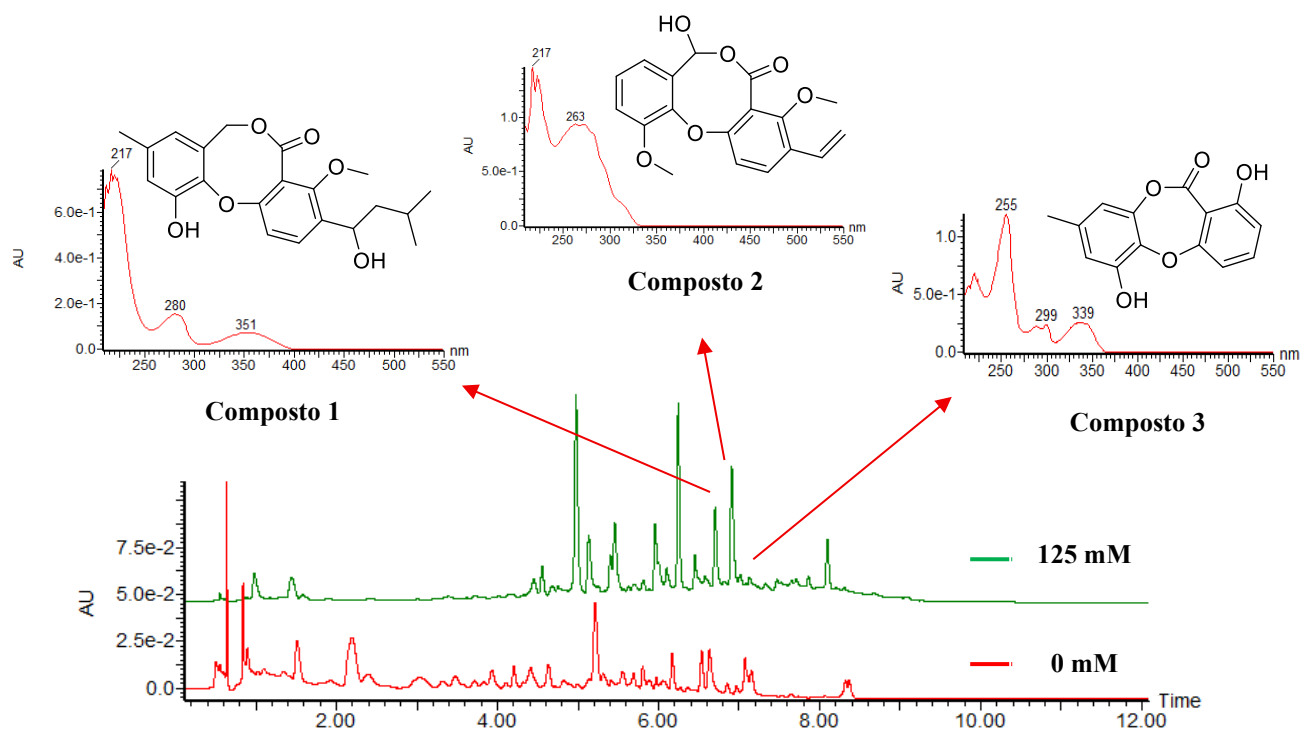
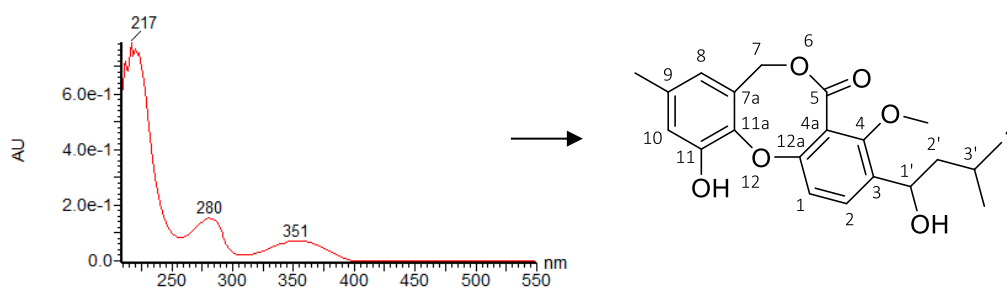


Figura 67 – Cromatogramas nas concentrações de 0 mM e 125 mM dos compostos isolados.

Fonte - Elaborado pelo autor.

#### 7.9.4. Análise estrutural do composto 1: 11-hidroxi-3-(1-hidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-9-metil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona



**Figura 68** - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Ao analisarmos o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz, Figura 68), observamos na região de  $\delta$  6,41 a 7,67 um padrão de sinais característico de sistemas aromáticos. A presença de quatro sinais nessa faixa, com integrais e constantes de acoplamento distintas, sugere a existência de dois anéis aromáticos com padrões de substituição diferentes (Figura 68). O primeiro sistema apresenta dois sinais duplos em  $\delta$  7,00 (d,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,66 (d,  $J = 8,5$  Hz), indicando fortemente um sistema aromático do tipo 1,4-dissubstituído. Já o segundo anel apresenta um padrão de acoplamento típico de um sistema 1,2,3-trissubstituído, com dois sinais duplos de pequena constante de acoplamento:  $\delta$  6,41 (d,  $J = 1,4$  Hz) e  $\delta$  6,78 (d,  $J = 1,5$  Hz), o que sugere que esses prótons estão em posições meta entre si.

Na região alifática do espectro, entre  $\delta$  0,94 e 2,21, observa-se a presença de dois sinais de metila em  $\delta$  0,95 (d,  $J = 6,7$  Hz) e  $\delta$  0,98 (d,  $J = 6,6$  Hz), atribuíveis aos grupos  $\text{CH}_3$ -5' e  $\text{CH}_3$ -4', respectivamente. Esses sinais apresentam acoplamento com o metileno e metínico vizinhos. A multiplicidade complexa observada para os prótons em  $\delta$  1,45 (ddd),  $\delta$  1,64 (ddd) e  $\delta$  1,78 (m) confirma a presença de um sistema alifático ramificado, atribuído à cadeia lateral ligada ao anel aromático.

Além disso, destaca-se um sinal singlete em  $\delta$  3,92, correspondente a um grupo metoxila ( $\text{OMe}$ -4), e outro singlete em  $\delta$  2,21, atribuível a uma metila ligada diretamente ao anel aromático ( $\text{Me}$ -9).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 70) revelou 21 sinais distintos, compatíveis com a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$ . Foram observados sinais de dois carbonos metílicos da cadeia lateral (23.83 e 22.26 ppm), um sinal de metoxila (63.13 ppm), sinais de

carbonos aromáticos desprotonados e protonados entre  $\delta$  100 e 165 ppm, e um sinal em  $\delta$  169,86 ppm, típico de carbono carbonílico, sugerindo a presença de um grupo carboxílico.

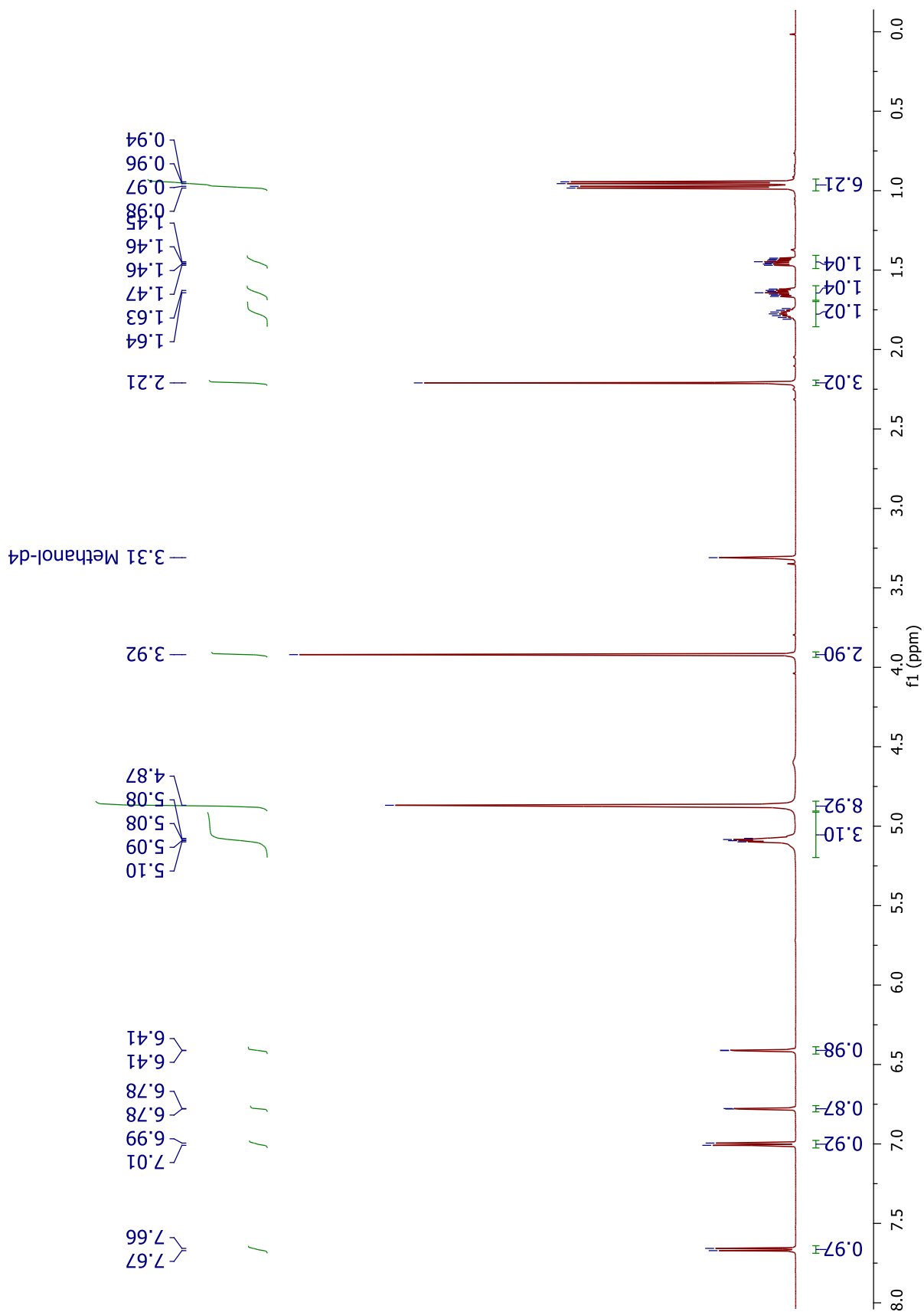
As correlações estabelecidas pelo espectro HSQC (Figura 71) permitiram atribuir os hidrogênios observados no  $^1\text{H}$ -RMN aos respectivos carbonos protonados no  $^{13}\text{C}$ -RMN. Destacam-se: a correlação do singlete em  $\delta$  3,92 com um carbono em  $\delta$  63.13 ppm, confirmando a presença de uma metoxila; as correlações dos sinais de metilas alifáticas com carbonos em  $\delta$  22.26 e 23.83 ppm; e os sinais aromáticos de  $\delta$  6,41 a 7,66 correlacionando-se com carbonos entre  $\delta$  121.24 e 132.39 ppm.

No espectro HMBC (Figura 72), foram observadas correlações cruciais para elucidação estrutural. O próton da metila aromática em  $\delta$  2,21 mostrou correlação com carbonos entre  $\delta$  120–140 ppm, confirmando sua ligação direta ao anel aromático, provavelmente na posição C-9. A metoxila ( $\delta$  3,92) correlacionou-se com um carbono desprotonado aromático em  $\delta$  150–160 ppm, característico de um carbono fenol substituído, sugerindo sua posição em C-4. Os prótons aromáticos em  $\delta$  6,41 e 6,78 apresentaram correlações com carbonos vizinhos no anel, reforçando o padrão 1,2,3-trissubstituído.

O espectro COSY (Figura 73) confirmou as interações esperadas dos acoplamentos entre os prótons aromáticos meta-substituídos ( $\delta$  6,41 e 6,78) e entre os prótons da cadeia alifática, conectando os grupos  $\text{CH}_3$ -4' e  $\text{CH}_3$ -5' aos sinais multipletos de  $\delta$  1,45 a 1,78, sugerindo um sistema propanoide ou isopropilado.

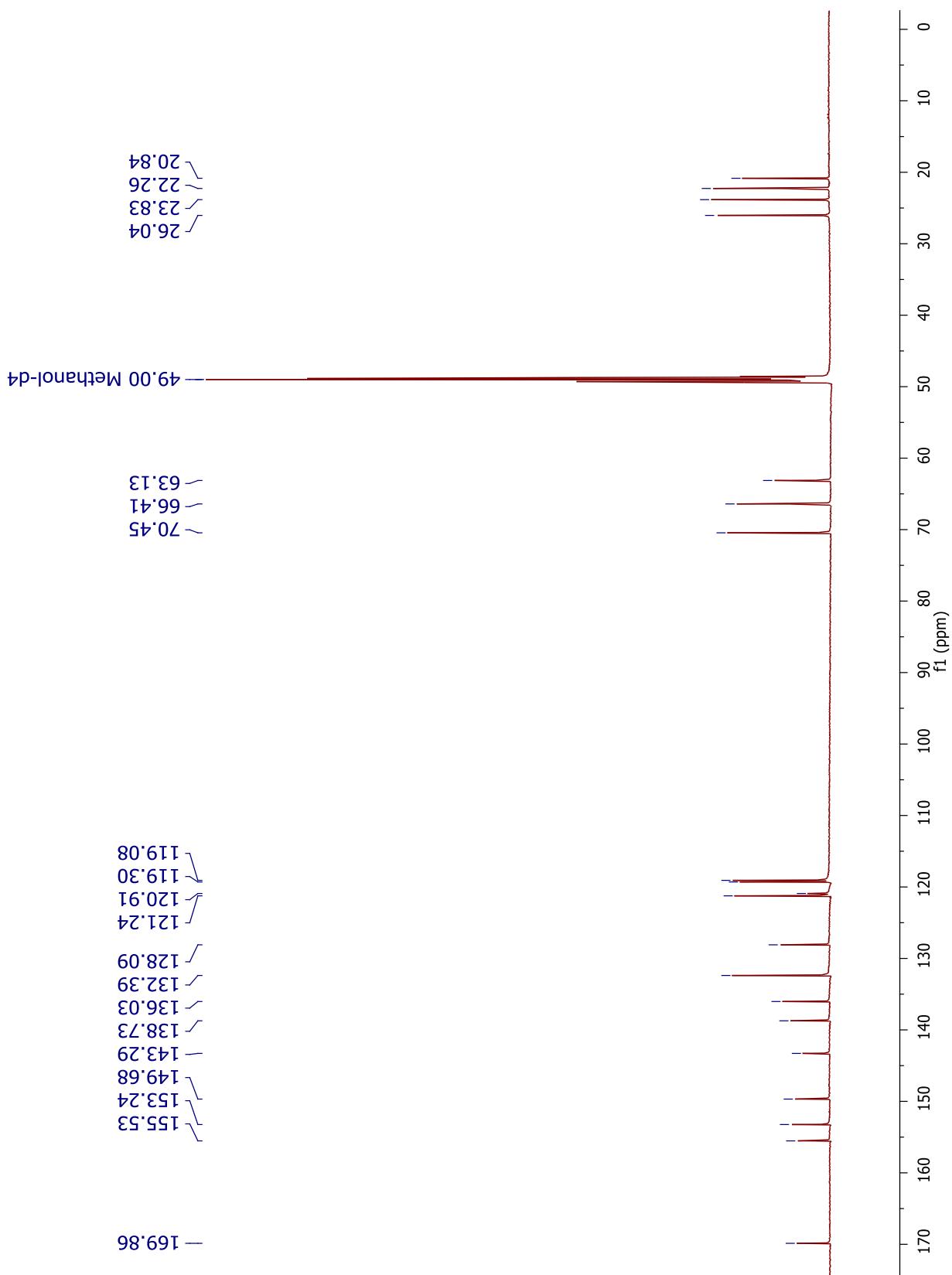
Complementarmente, o espectro de UV-Vis apresentou bandas de absorção em 217, 280 e 351 nm (Figura 68), indicativas da presença de sistemas conjugados aromáticos e grupos cromóforos oxigenados, como aqueles observados em compostos fenólicos e depsidônicos.

Esses dados integrados confirmam a presença de uma estrutura com dois sistemas aromáticos distintos, um grupo metoxila, uma cadeia lateral ramificada e um grupo metila ligado diretamente ao anel, compatível com um composto do tipo depsidona lactônicas.



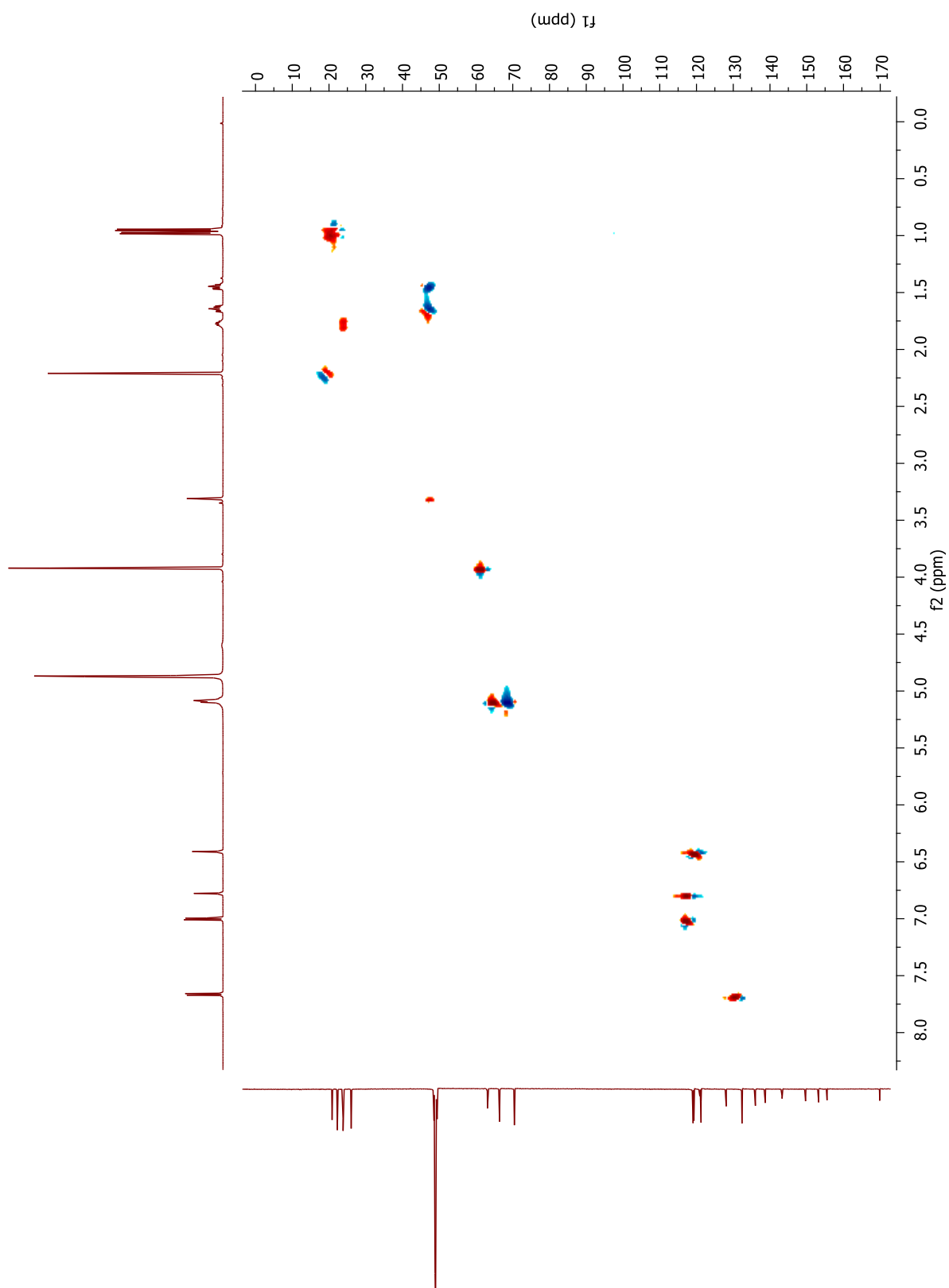
**Figura 69** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz do composto 1.

Fonte - Elaborado pelo autor.



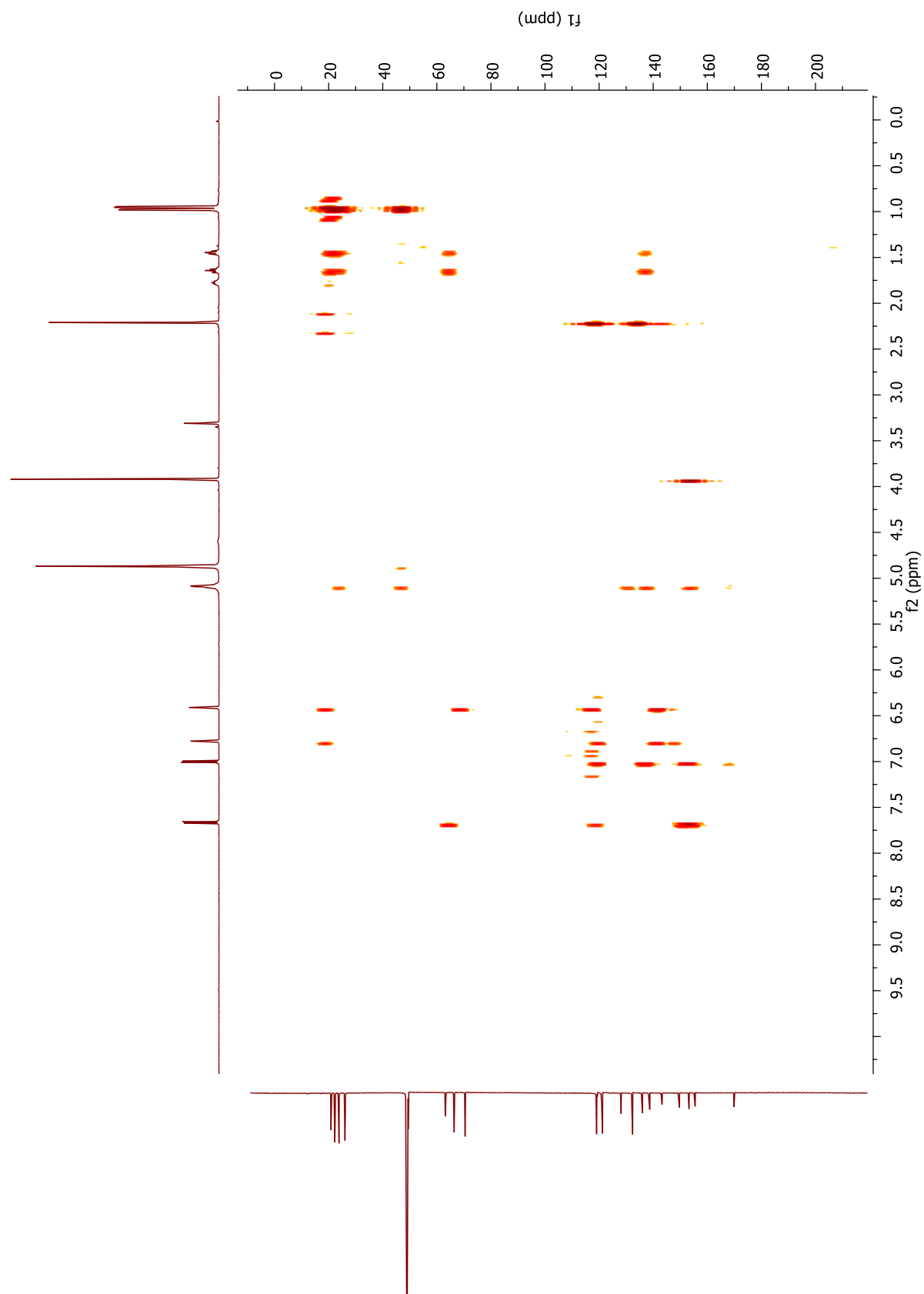
**Figura 70** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



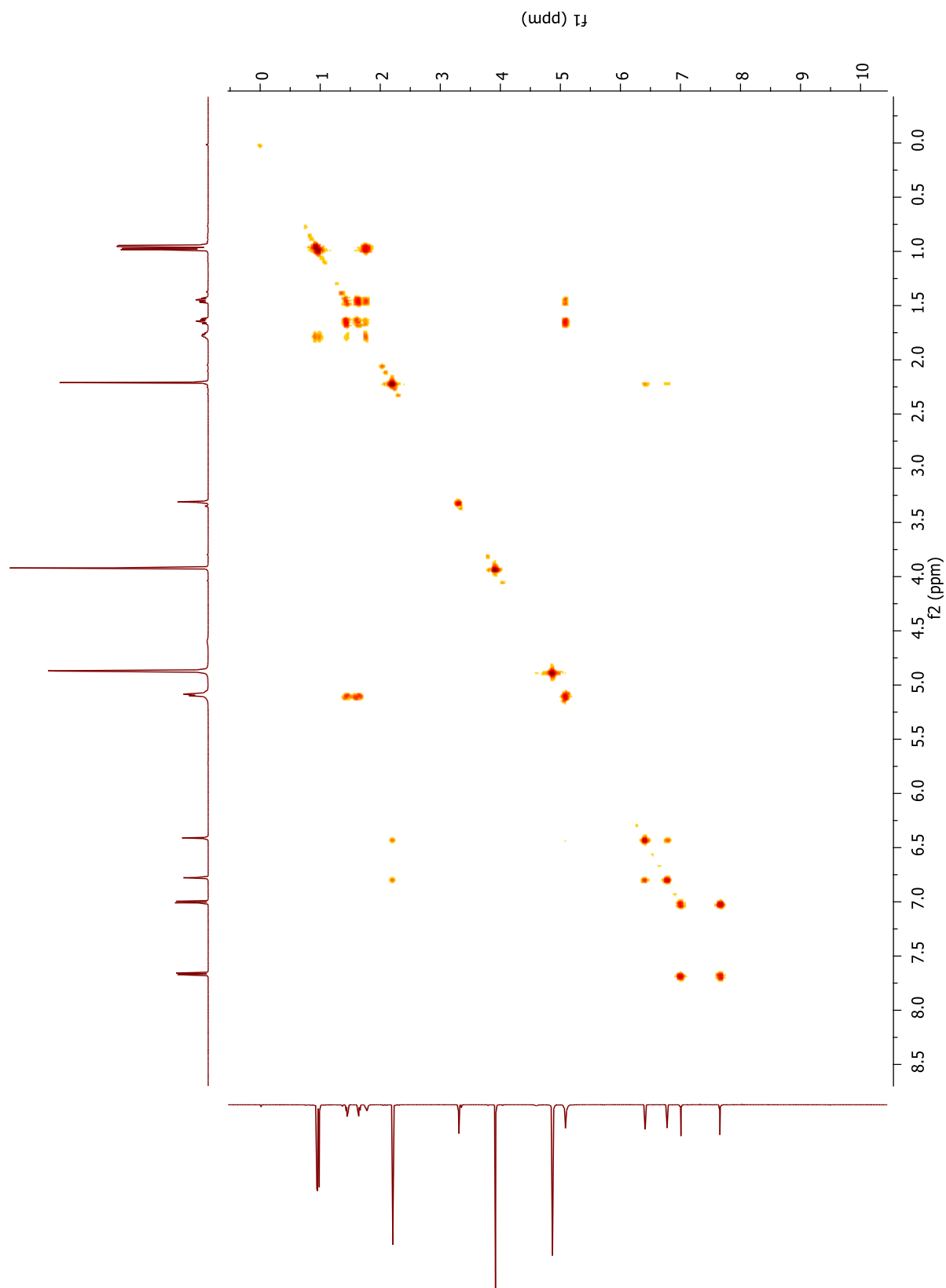
**Figura 71** – Espectro de RMN HSQC CD<sub>3</sub>OD, do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 72** – Espectro de RMN HMBC CD<sub>3</sub>OD, do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



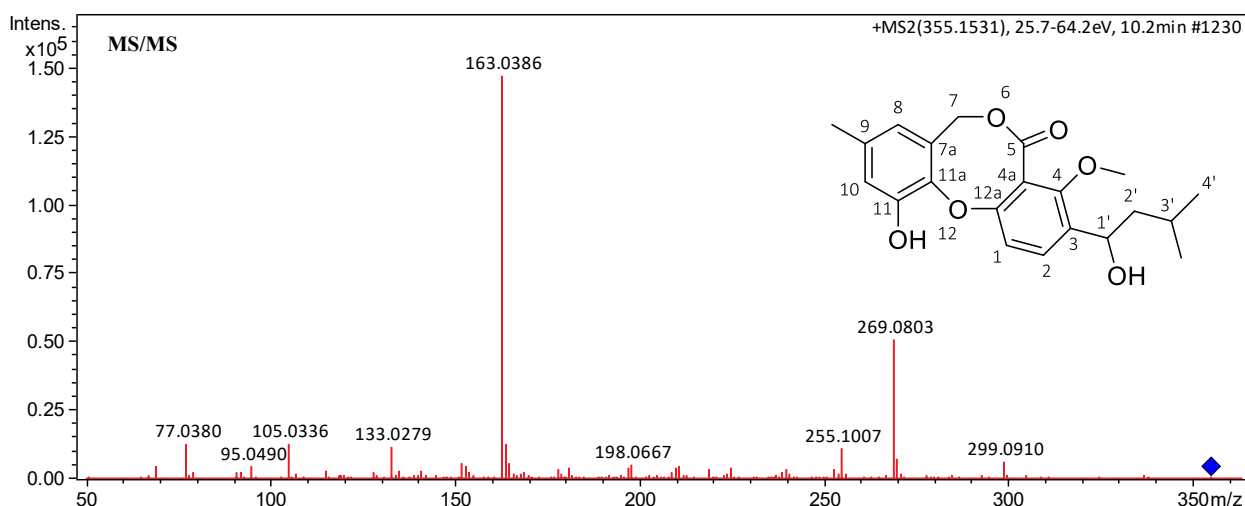
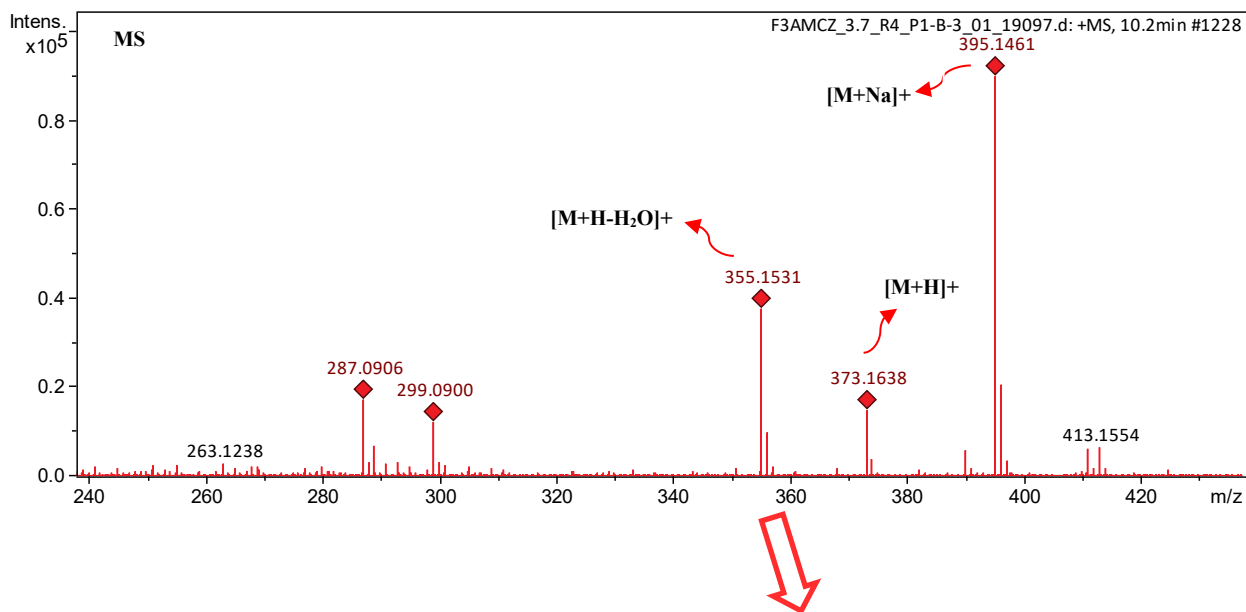
**Figura 73** – Espectro de RMN COSY CD<sub>3</sub>OD, do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Tipo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade / J (Hz)
1	119.08	CH	7.00	d, J = 8.5
2	132.39	CH	7.66	d, J = 8.5
3	136.03	C	—	—
4	155.53	C	—	—
4A	155.53	C	—	—
5	169.86	C=O	—	—
6	—	O	—	—
7	70.45	CH <sub>2</sub>	5.08	m
7A	128.09	C	—	—
8	121.24	CH	6.41	d, J = 1.8
9	136.03	C	—	—
10	119.08	CH	6.78	d, J = 1.8
11	149.68	C	—	—
11A	143.29	C	—	—
12	—	O	—	—
12A	153.24	C	—	—
1'	66.41	CH	5.10	m
2'	47.58	CH <sub>2</sub> (Tm)	1.45 / 1.64	ddd, J = 14.0, 9.0, 5.2
3'	24.94	CH	1.78	m
4'	23.83	CH <sub>3</sub>	0.98	d, J = 6.6
5'	22.26	CH <sub>3</sub>	0.95	d, J = 6.6
OME-4	63.13	OCH <sub>3</sub>	3.92	s
ME-9	20.84	CH <sub>3</sub>	2.21	s

**Tabela 6** - Deslocamento químico do composto 1.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 74** - Espectro de massas do composto 1 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto.

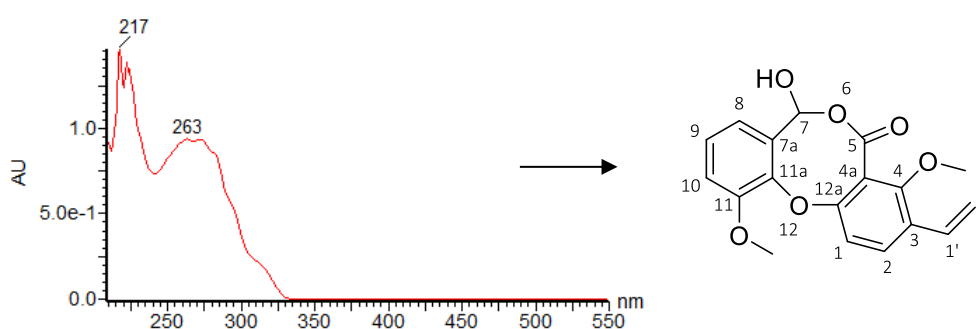
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A completa identificação estrutural do composto 1 foi corroborada pela análise do espectro de massas de alta resolução (HRMS), em modo positivo, no qual foi observado o aduto  $[M+H]^+$  com  $m/z$  373,1634, compatível com a fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_6$  (erro de massa de 2,94 ppm), conforme mostrado na Figura 74. A fórmula proposta corresponde a uma massa molecular teórica de 372,1578 Da, o que está de acordo com a estrutura sugerida a partir dos dados espectroscópicos de RMN.

Além disso, o espectro de fragmentação (MS/MS) revelou um pico base em  $m/z$  269,0810, com alta intensidade, sugerindo uma clivagem significativa da molécula. Este fragmento indica a perda de uma parte da cadeia lateral oxigenada, possivelmente incluindo os

grupos metoxila e hidroxila conjugados, o que reforça a presença de um núcleo aromático estabilizado na estrutura. A análise desse fragmento, em conjunto com os dados de RMN e comparações com substâncias análogas descritas na literatura, permitiu a elucidação estrutural do composto como sendo 11-hidroxi-3-(1-hidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-9-metil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona, um derivado policíclico aromático oxigenado produzido por espécies do gênero *Talaromyces*.

### 7.9.5. Análise estrutural do composto 2: 7-hidroxi-4,11-dimetoxi-3-vinil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona



**Figura 75** - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 2.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Ao analisarmos o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto 2 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), observamos na região de  $\delta$  6,74 a 8,00 ppm um padrão de sinais característico de sistemas aromáticos funcionalizados de forma distinta. A presença de múltiplos sinais nessa faixa, com integrais e constantes de acoplamento diferentes, sugere a existência de dois anéis aromáticos com padrões de substituição distintos (Figura 75). O primeiro sistema apresenta dois sinais duplos em  $\delta$  6,85 (d, J = 8,5 Hz) e  $\delta$  6,98 (d, J = 8,5 Hz), compatíveis com um sistema 1,4-dissubstituído. O segundo sistema mostra sinais na faixa de  $\delta$  6,74 a 6,80 ppm, com constantes de acoplamento em torno de 3,1 Hz, típicas de acoplamentos meta, indicando a presença de um anel 1,2,3-trissubstituído, cujos hidrogênios (H-8, H-9 e H-10) apresentam acoplamento entre si.

Destaca-se ainda um sinal singlete bem definido em  $\delta$  8,00 ppm, atribuído ao próton H-7. A ausência de acoplamento associado a esse sinal sugere um ambiente eletrônico desprotegido, provavelmente influenciado pela proximidade de um grupo carbonila e pela ligação à ponte dioxepínica, o que contribui para o desblindamento do sinal observado (Figura

76).

Além do padrão aromático, foram observados sinais na região de  $\delta$  6,19 a 6,31 ppm, compatíveis com prótons vinílicos acoplados entre si. Os dupletos registrados apresentam constante de acoplamento em torno de 16 Hz, valor típico para a presença de uma cadeia lateral do tipo isoprenil.

Na região de  $\delta$  3,82 e 3,89 ppm, observam-se dois sinais singletos, cada um integrando para três hidrogênios, atribuídos a grupos metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ) ligados diretamente a carbonos aromáticos. Essas metoxilas foram posicionadas nas posições C-4 e C-11 com base nas correlações observadas por HMBC (Figura 79).

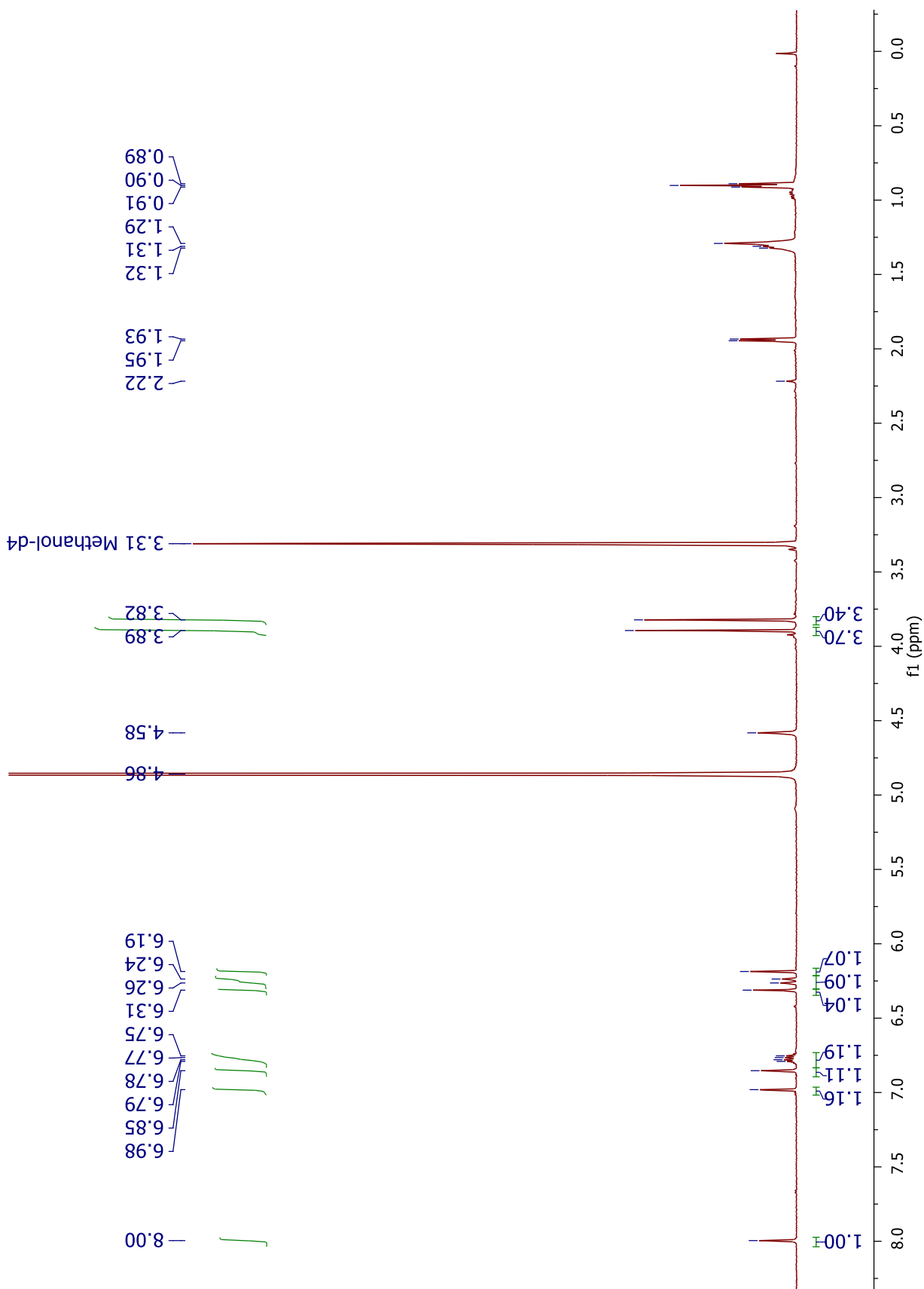
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 77), foram detectados 16 sinais distintos, consistentes com a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6$ . Dentre os sinais, destaca-se a presença de carbonos aromáticos (entre  $\delta$  100–160 ppm), dois sinais de metoxila ( $\delta$  56,46 e 56,51 ppm), carbonos vinílicos ( $\delta$  ~130 ppm) e um sinal de carbonila em  $\delta$  179,85 ppm, atribuível ao grupo lactona conjugado ao sistema dibenzo[d][1,3]dioxepínico.

A análise do espectro HSQC (Figura 78) permitiu a correlação direta entre os prótons observados no  $^1\text{H}$ -RMN e seus respectivos carbonos no  $^{13}\text{C}$ -RMN. As correlações de  $\delta$  3,82 e 3,89 com  $\delta$  56,51 e 56,46 confirmam a presença das metoxilas. Os sinais de hidrogênios vinílicos e aromáticos também mostraram correspondência com os carbonos esperados na faixa de  $\delta$  110 a 135 ppm.

No espectro HMBC (Figura 79), o singlete em  $\delta$  8,00 (H-7) apresentou correlação com a carbonila em  $\delta$  179,85, reforçando sua proximidade com o grupo lactona. Os sinais das metoxilas mostraram correlações longas com carbonos aromáticos desprotonados, sugerindo sua ligação aos carbonos C-4 e C-11. Os sinais vinílicos correlacionaram-se com carbonos do sistema aromático, indicando a extensão da conjugação.

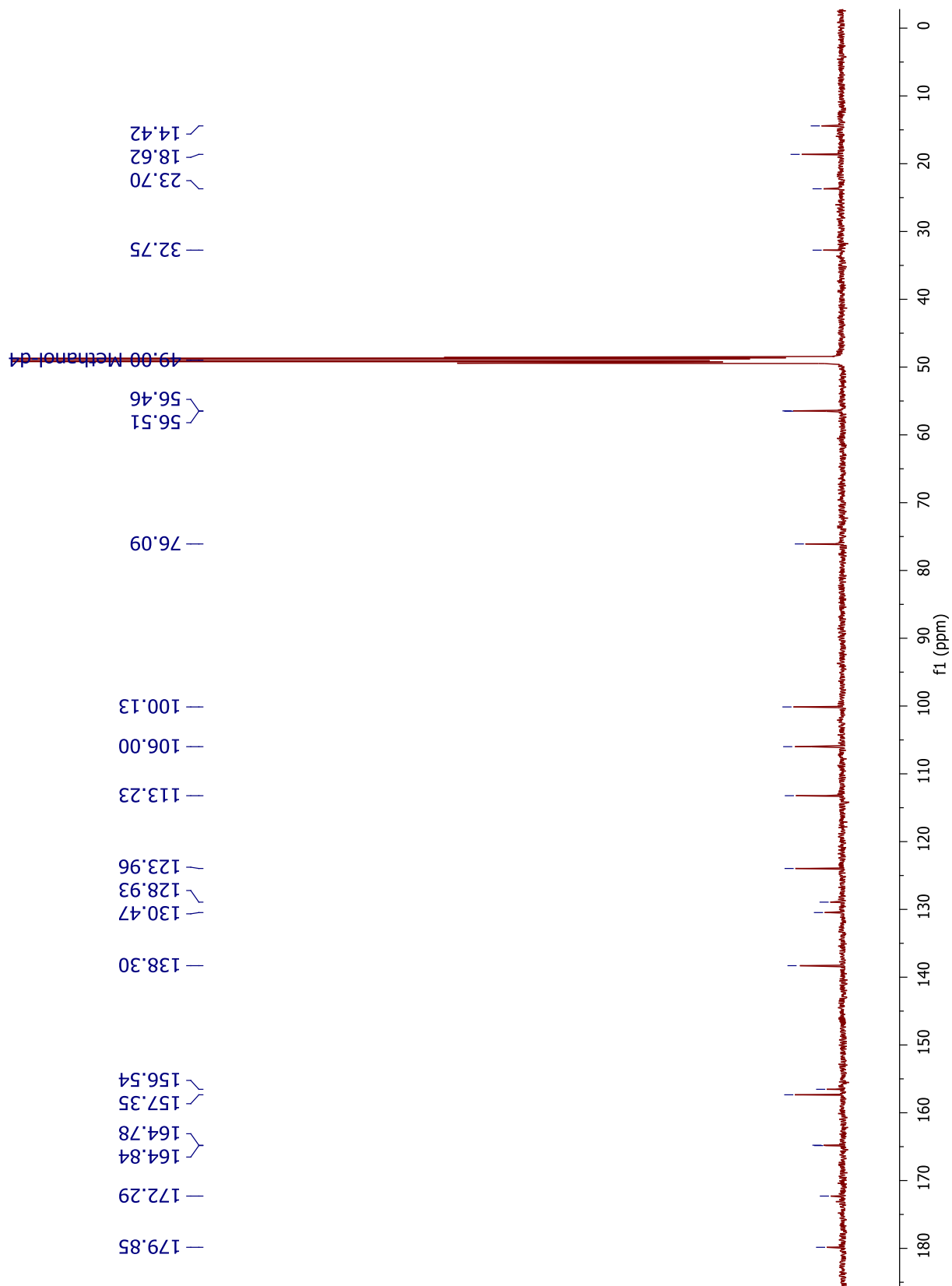
Complementarmente, o espectro de UV-Vis apresentou bandas de absorção em 217, 225 e 263 nm (Figura 75), compatíveis com a presença de sistemas conjugados aromáticos e cromóforos oxigenados. Esses padrões são característicos de estruturas fenólicas e de sistemas dibenzo[d][1,3]dioxepínicos funcionalizados.

Esses dados integrados confirmam a presença de dois sistemas aromáticos substituídos de maneira distinta, dois grupos metoxila, um grupo carbonila, uma cadeia lateral isoprenil e um esqueleto central do tipo dibenzo[d][1,3]dioxepina funcionalizado. Tais evidências sustentam a proposta estrutural de um composto do tipo depsidona lactônica. Todas as atribuições encontram-se resumidas na Tabela 7.



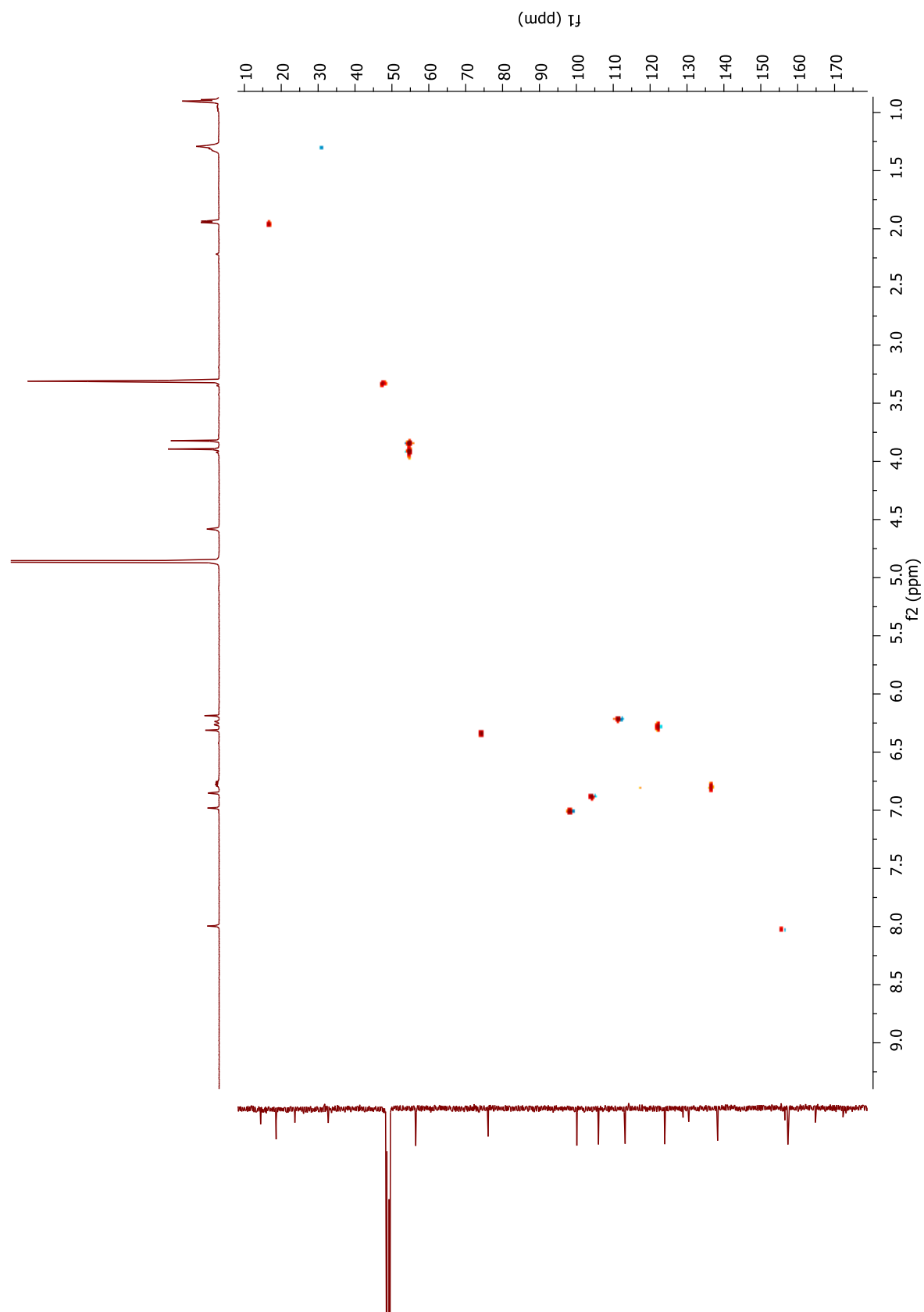
**Figura 76** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz do composto 2.

Fonte - Elaborado pelo autor.



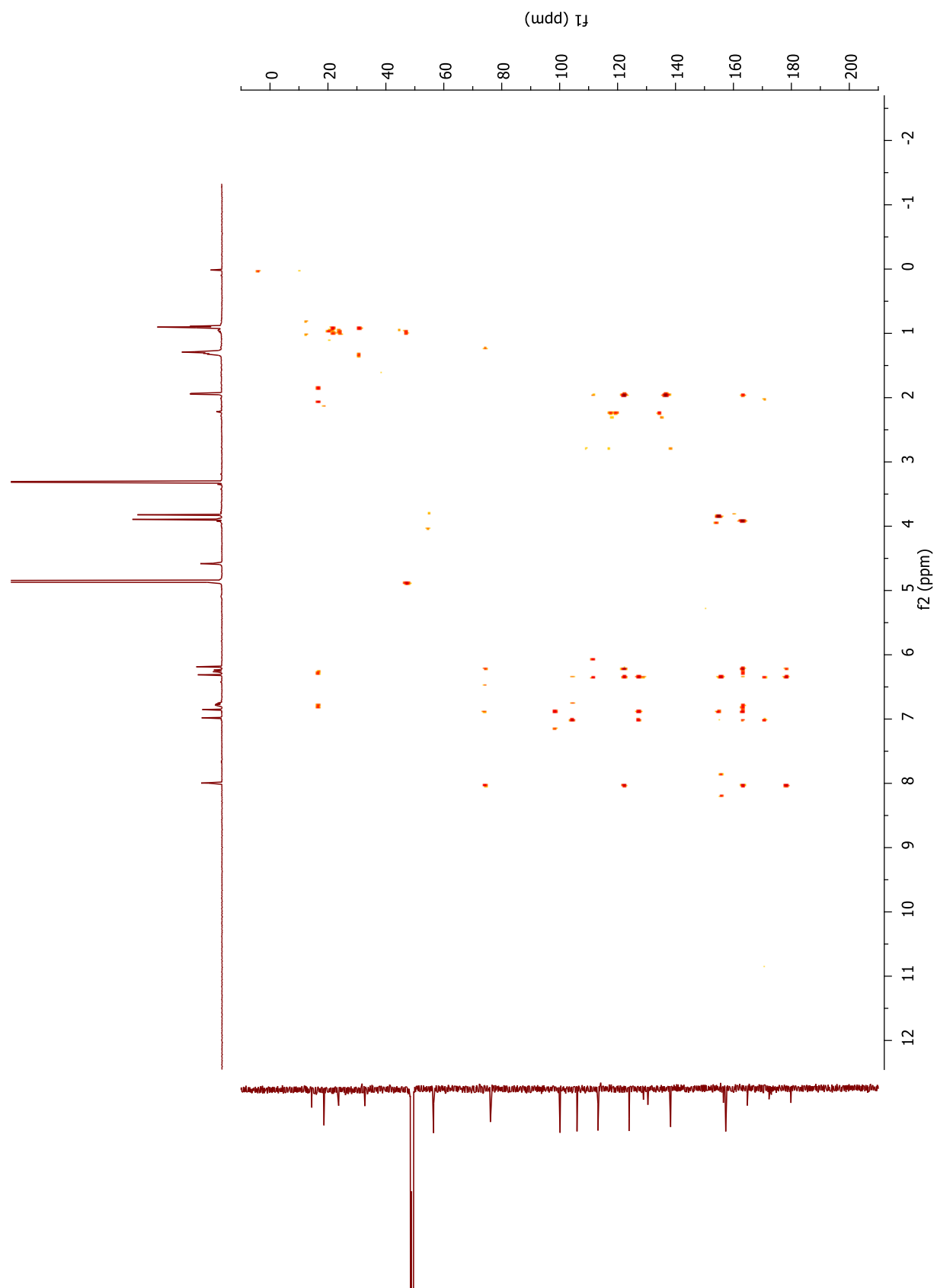
**Figura 77** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz do composto 2.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 78** – Espectro de RMN HSQC  $\text{CD}_3\text{OD}$ , do composto 2.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



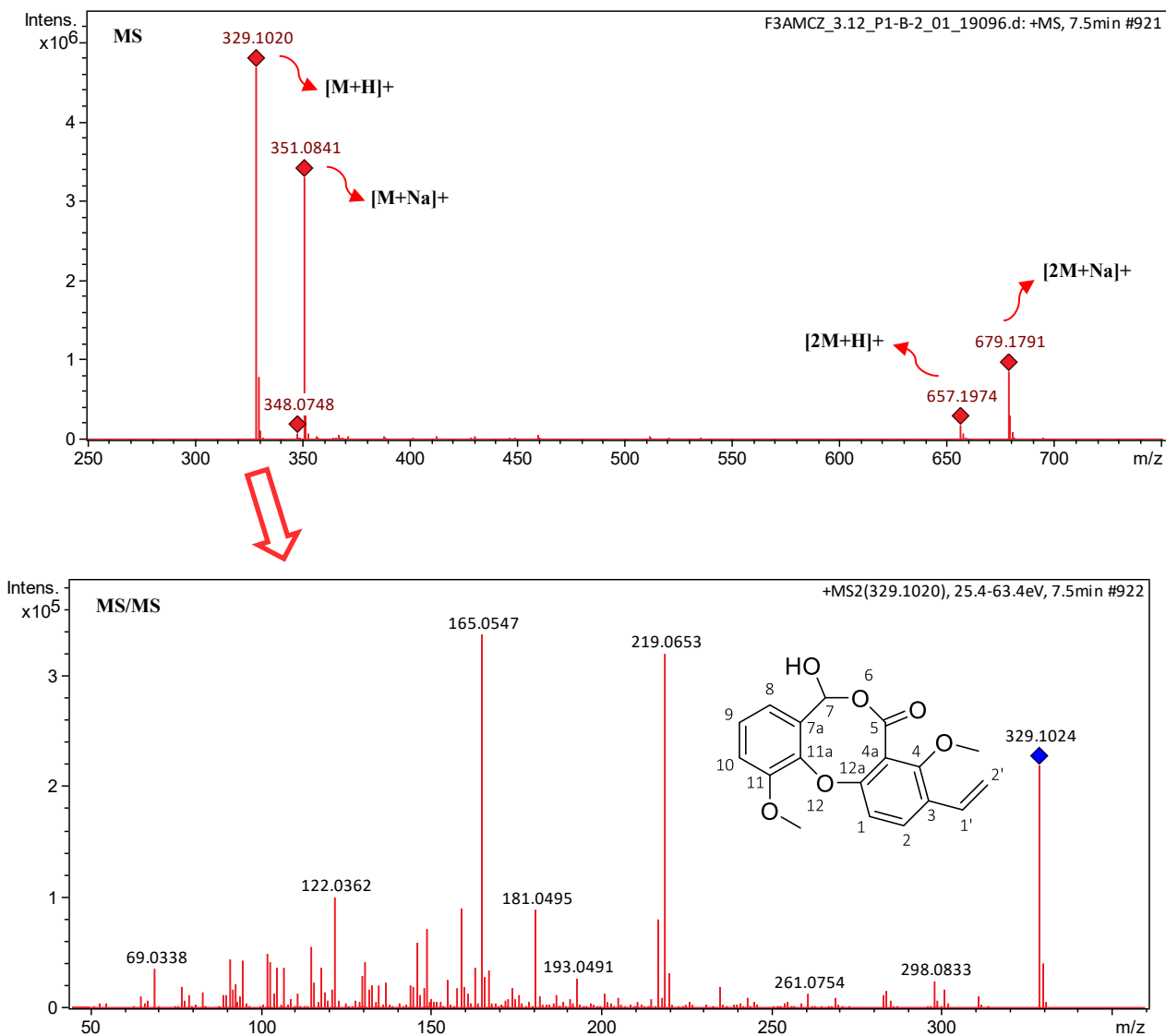
**Figura 79** – Espectro de RMN HMBC CD<sub>3</sub>OD, do composto 2.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Tipo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade / J (Hz)
<b>1</b>	106.00	CH	6.85	D, J = 8.5
<b>2</b>	100.13	CH	6.98	D, J = 8.5
<b>3</b>	164.78	C	—	—
<b>4</b>	128.93	C	—	—
<b>4a</b>	156.54	C	—	—
<b>5</b>	179.85	C=O	—	—
<b>6</b>	—	O	—	—
<b>7</b>	157.35	CH	8.00	—
<b>7a</b>	130.47	C	—	—
<b>8</b>	123.96	CH	6.26	D, J = 8.5
<b>9</b>	124.00	CH	6.24	—
<b>10</b>	113.23	CH	6.19	—
<b>11</b>	156.54	C	—	—
<b>11a</b>		C	—	—
<b>12</b>	—	O	—	—
<b>12a</b>	172.29	C	—	—
<b>1'</b>	138.30	CH	6.77	DD, J = 15.9, 6.9
<b>2'</b>	123.96	CH <sub>2</sub>	6.25	D, J = 15.9
<b>OMe-4</b>	56.46	OCH <sub>3</sub>	3.89	S
<b>OMe-11</b>	56.51	OCH <sub>3</sub>	3.82	S

**Tabela 7** - Deslocamento químico do composto 2.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 80** - Espectro de massas do composto 2 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto.

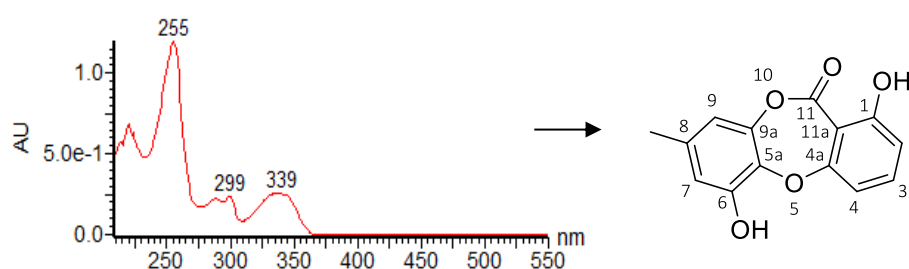
**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A completa identificação estrutural do composto 2 foi corroborada pela análise do espectro de massas de alta resolução (HRMS), obtido em modo positivo, no qual foi observado o íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  329,1024 (Figura 80), compatível com a fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_6$ , apresentando um erro de massa de 3,95 ppm. A fórmula proposta corresponde a uma massa molecular teórica de 329,1032 Da, o que está em concordância com a estrutura sugerida a partir dos dados espectroscópicos de RMN.

Adicionalmente, o espectro de fragmentação (MS/MS) revelou fragmentos diagnósticos, com destaque para os picos em  $m/z$  165,0547 e 219,0653, que indicam clivagens características da molécula. O padrão de fragmentação é consistente com a perda de radicais

metoxila, hidroxila e parte da cadeia lateral, o que sustenta a presença de um núcleo aromático altamente estabilizado. A análise detalhada desses fragmentos, em conjunto com os dados de RMN e comparação com substâncias análogas descritas na literatura, permitiu a elucidação estrutural do composto como sendo 7-hidroxi-4,11-dimetoxi-3-vinil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona, um derivado policíclico aromático oxigenado, frequentemente produzido por fungos do gênero *Talaromyces*.

### 7.9.6. Análise estrutural do composto 3: 1,6-di-hidroxi-8-metil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepina-11-ona



**Figura 81** - Estrutura e espectro de absorção UV do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A análise espectroscópica do composto 3 revela características estruturais compatíveis com o núcleo de depsidona lactônica, estrutura previamente observada em compostos análogos produzidos por espécies do gênero *Talaromyces*. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) apresenta dois conjuntos de sinais aromáticos bem definidos. O primeiro conjunto consiste em dois dupletos em  $\delta$  6,69 ( $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,25 ( $J = 8,5$  Hz), indicando um sistema 1,4-dissubstituído típico, com acoplamento orto, o que sugere um padrão simétrico no anel A. O segundo conjunto é caracterizado por sinais em  $\delta$  6,61 (d,  $J = 1,9$  Hz) e  $\delta$  6,36 (d,  $J = 1,9$  Hz), que revelam um padrão de acoplamento meta, indicando a presença de um anel 1,2,4-trissubstituído (Figura 82).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 83), corroborado pelas correlações HSQC, revela 14 sinais distintos, incluindo os carbonos quaternários em  $\delta$  144,17, 153,00, 158,42, 165,49 e 165,75 ppm. Estes dados indicam a presença de carbonos conjugados com oxigênio e uma carbonila característica de lactona, sugerindo um anel fechado com funcionalidade éster. Os sinais aromáticos protonados aparecem em  $\delta\text{C}$  100,63, 101,34, 101,35, 104,19 e 117,16, todos com correlações diretas no HSQC (Figura 84) aos prótons previamente descritos. Um sinal adicional em  $\delta\text{H}$  2,75 (s), correlacionado a  $\delta\text{C}$  24,44, corresponde a uma metila ligada a um dos

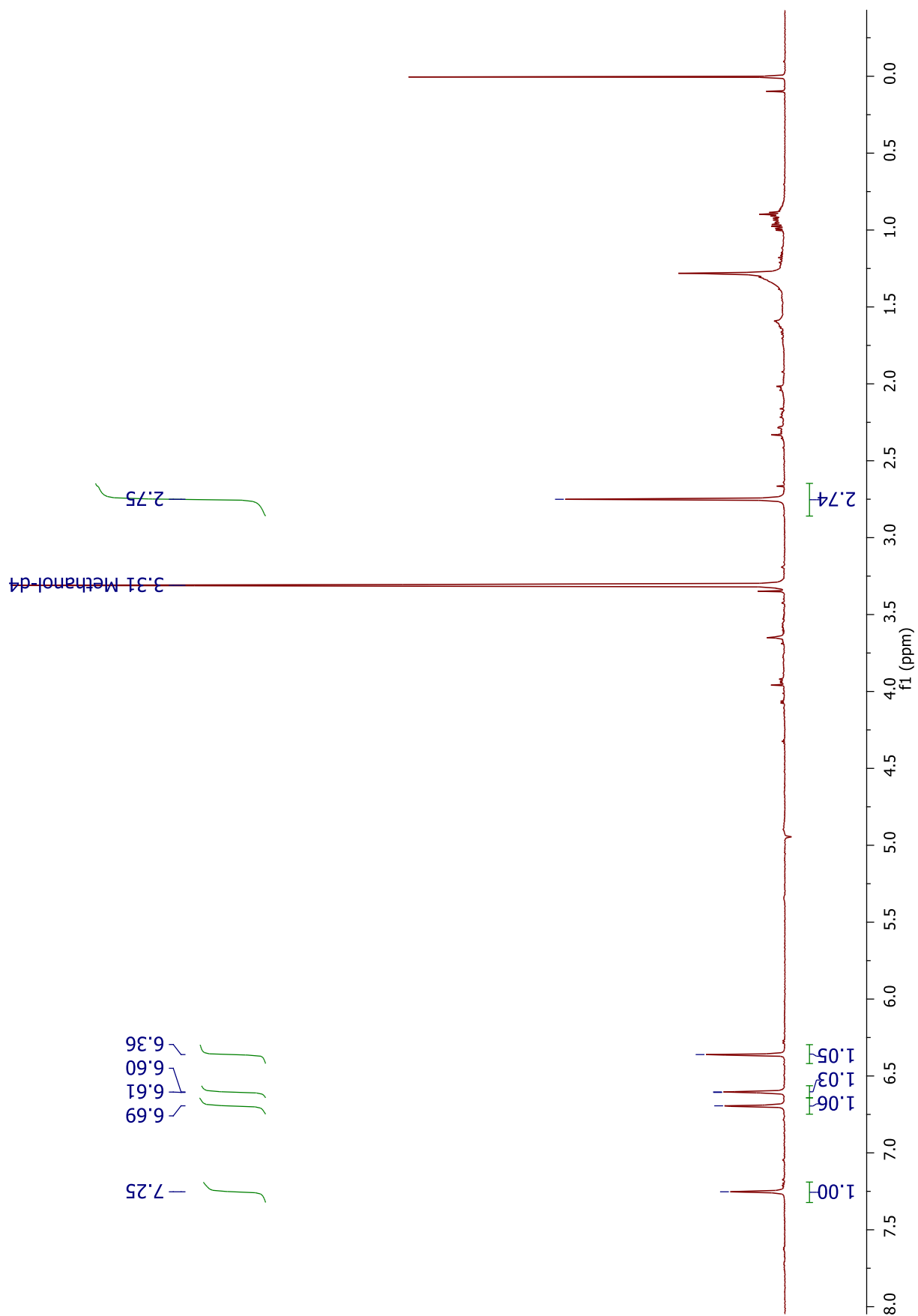
anéis aromáticos, provavelmente em posição orto a uma ponte oxigenada.

O espectro COSY (Figura 86) fornece evidência adicional para os padrões de acoplamento entre os prótons aromáticos. A correlação cruzada clara entre os sinais em  $\delta$  6,69 e  $\delta$  7,25 confirma o acoplamento orto entre os prótons presentes neste anel. Da mesma forma, o acoplamento entre  $\delta$  6,61 e  $\delta$  6,36 reforça a atribuição do segundo sistema aromático com acoplamento meta no anel B. Esses dados consolidam a presença de dois sistemas aromáticos independentes no esqueleto da molécula.

As correlações HMBC (Figura 85) auxiliam na confirmação das conectividades entre os sistemas aromáticos e os carbonos quaternários adjacentes. Observa-se, por exemplo, correlação entre a metila em  $\delta$ H 2,75 e o carbono em  $\delta$ C 138,60, indicando a posição deste grupo no anel B. As correlações entre os prótons aromáticos e as pontes conjugadas (carbonos em  $\delta$ C 144,17, 158,42 e 153,00) sustentam a presença de um sistema bicíclico típico das depsidonas lactônicas.

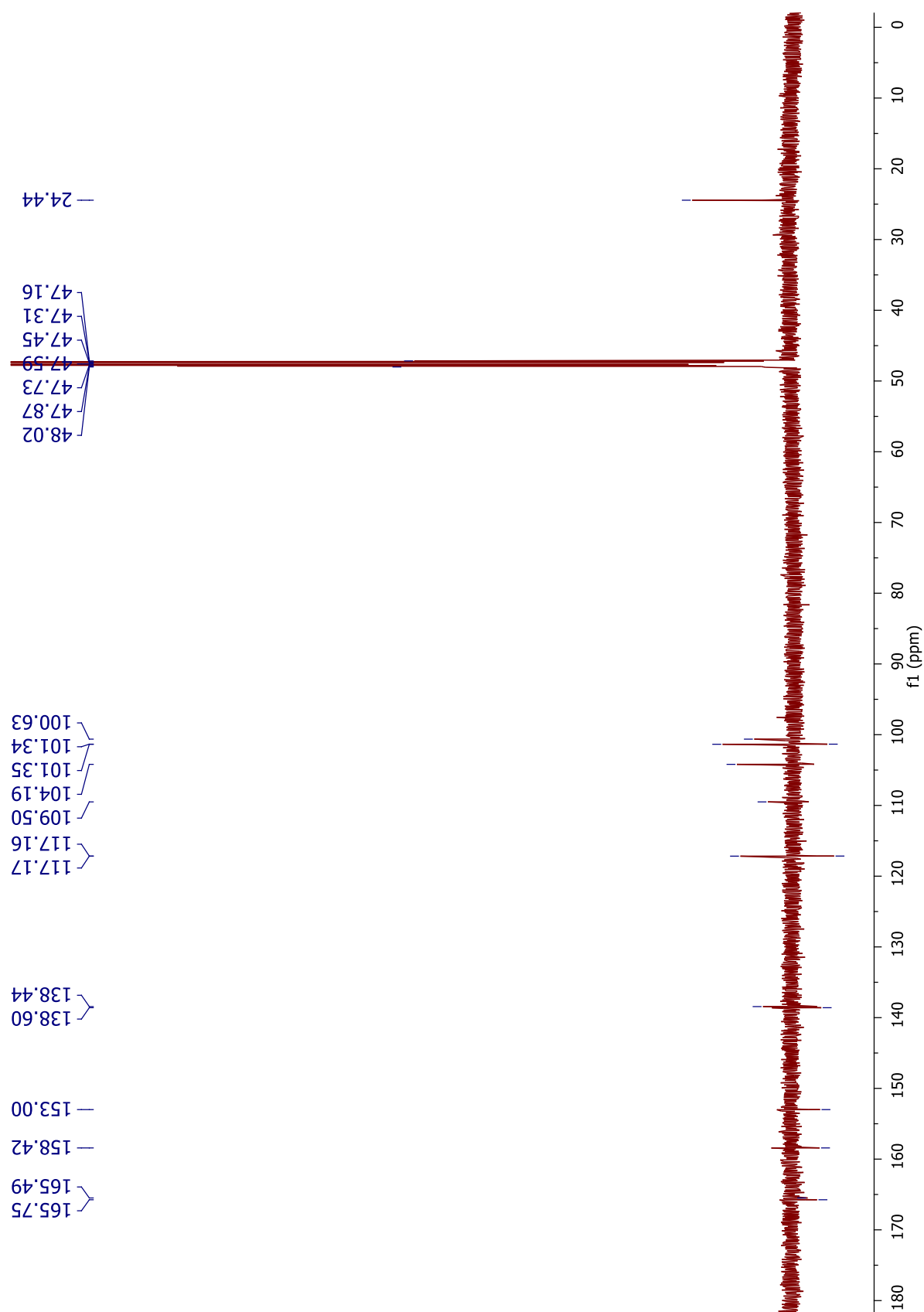
Por fim, o espectro de absorção UV-Vis exibe bandas em 217, 255, 299 e 339 nm (Figura 81), compatíveis com sistemas aromáticos conjugados contendo cromóforos do tipo benzenoide e lactônico. A presença de absorções em comprimentos de onda mais elevados reforça a hipótese de uma conjugação entre os anéis aromáticos, ligados por uma ponte oxigenada e uma carbonila.

Dessa forma, a partir da análise integrada dos espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY) e dos dados de absorção eletrônica no UV-Vis, conclui-se que o composto 3 apresenta um esqueleto estrutural do tipo depsidona lactônica, compartilhando elementos centrais com o composto 1, mas apresentando diferenças sutis em posições substituintes, como a presença de uma única metila em posição específica no anel B. A combinação das técnicas permite afirmar com confiança a identidade estrutural e a organização eletrônica do composto, evidenciando seu potencial como metabólito bioativo fúngico.



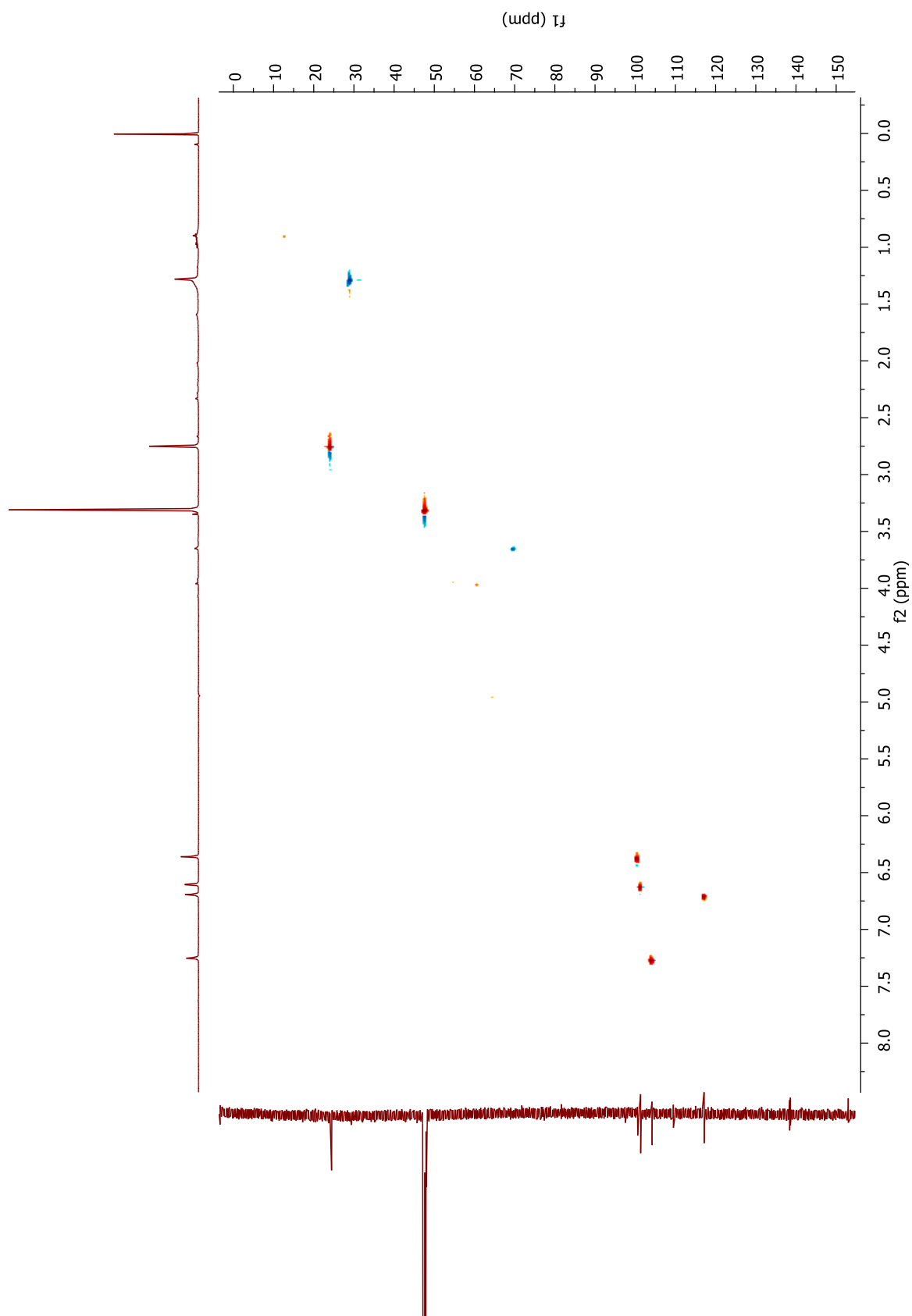
**Figura 82** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



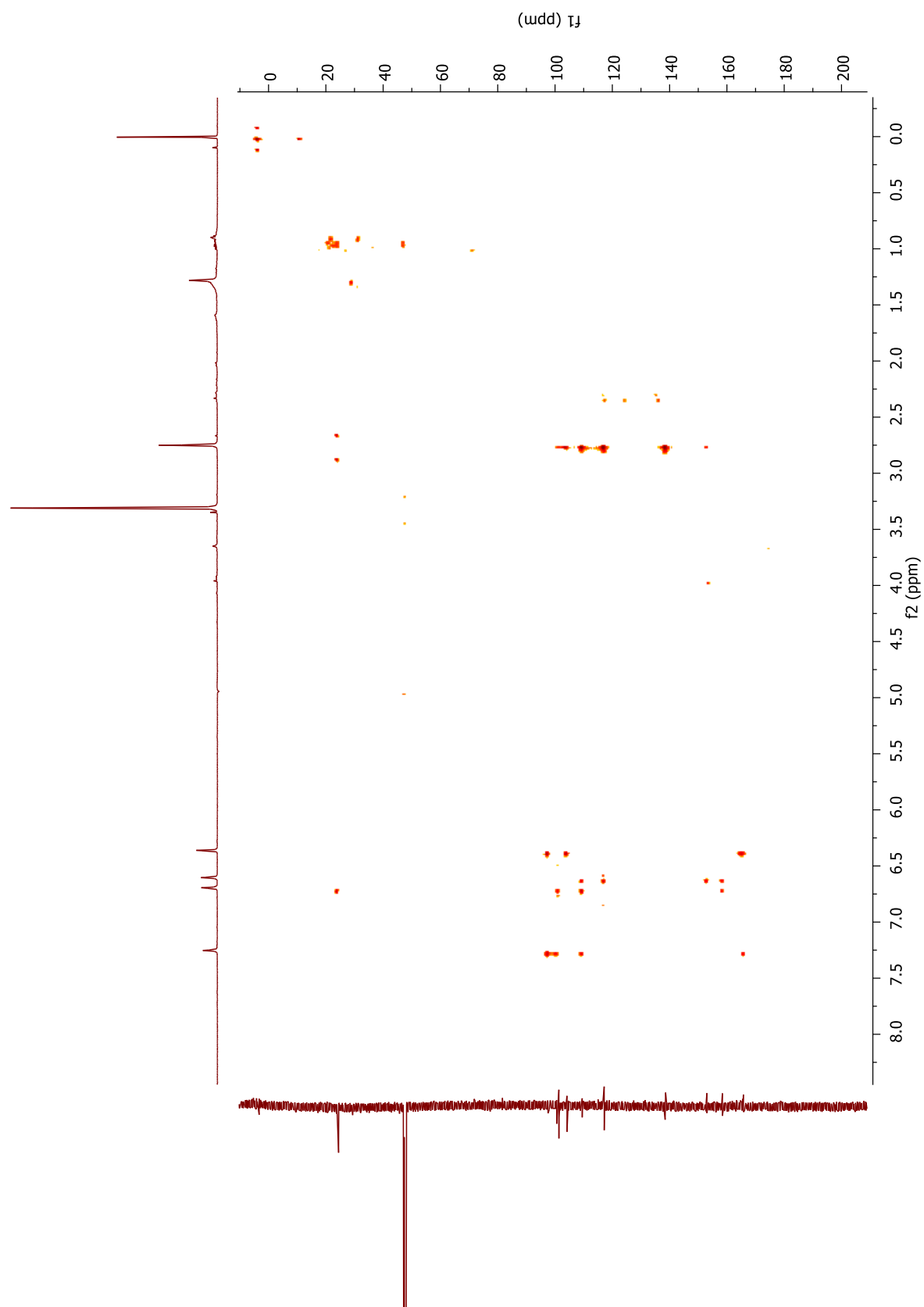
**Figura 83** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



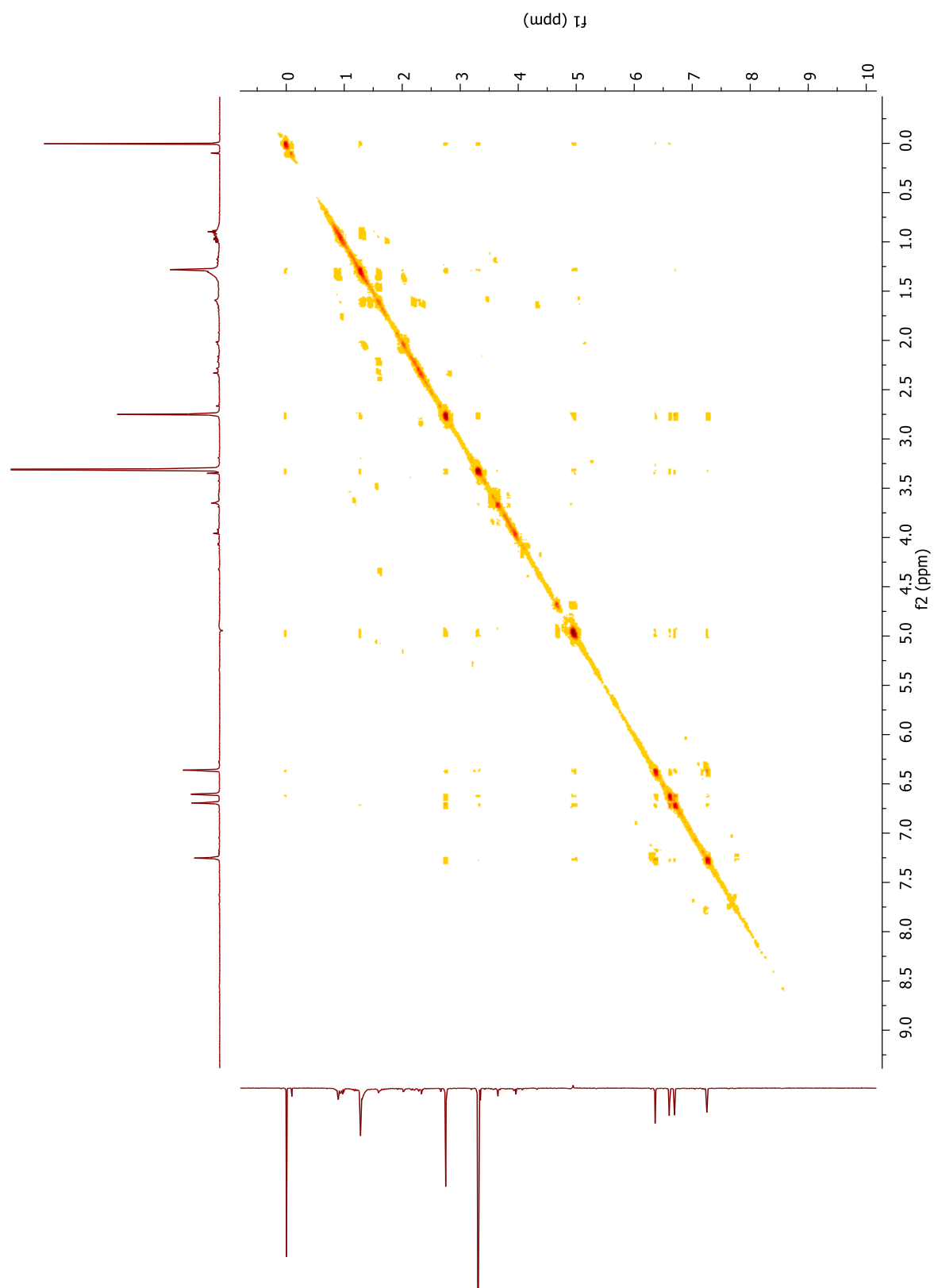
**Figura 84** – Espectro de RMN HSQC CD<sub>3</sub>OD, do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 85** – Espectro de RMN HMBC CD<sub>3</sub>OD, do composto 3.

Fonte - Elaborado pelo autor.



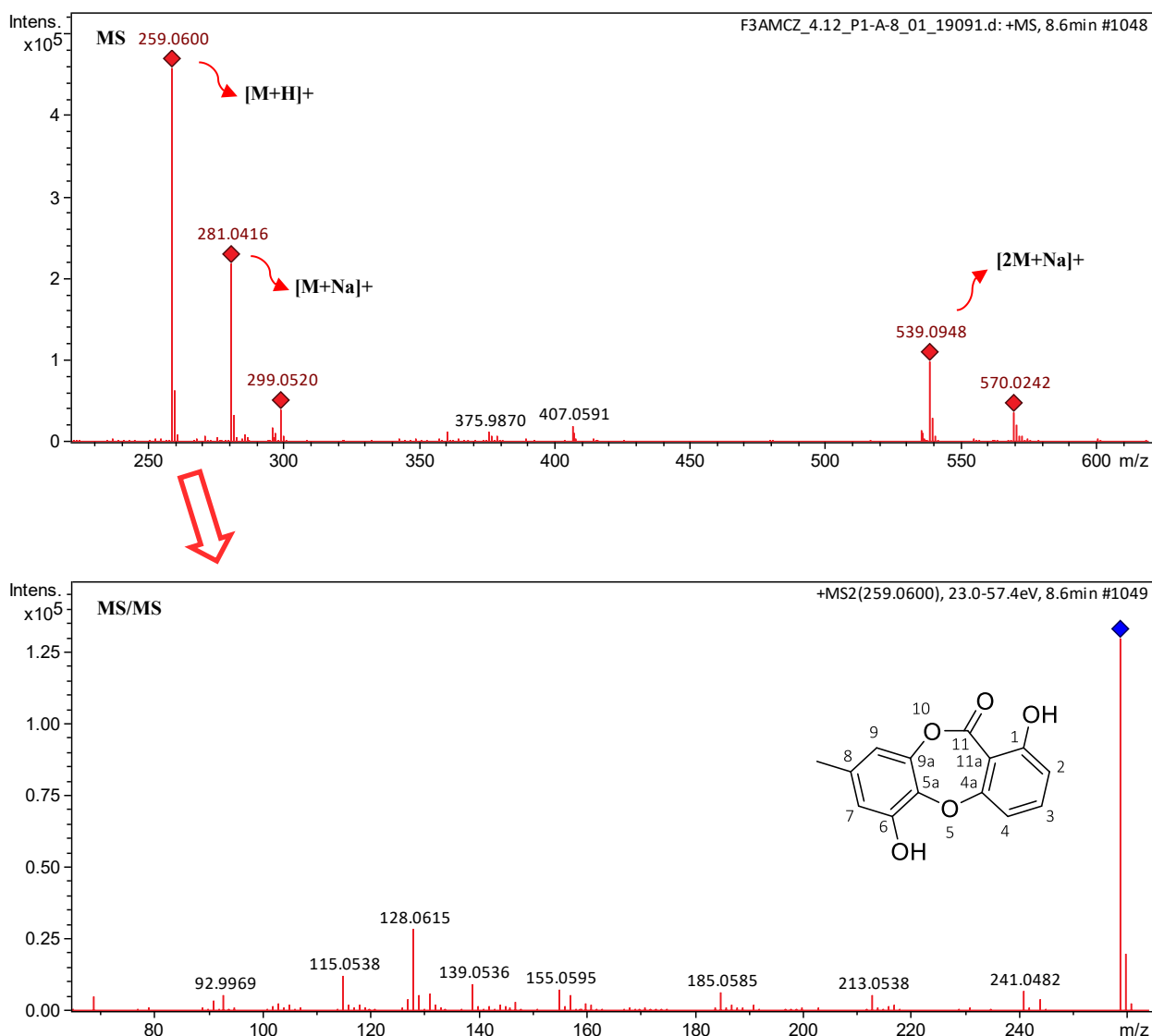
**Figura 86** – Espectro de RMN COSY CD<sub>3</sub>OD, do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Tipo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade / J (Hz)
<b>1</b>	165.49	C	—	—
<b>2</b>	101.35	CH	6.60	D, J = 8.5
<b>3</b>	104.19	CH	7.25	T
<b>4</b>	117.16	CH	6.69	—
<b>4a</b>	158.42	C	—	—
<b>5</b>	—	O	—	—
<b>5a</b>	138.44	C	—	—
<b>6</b>	153.00	C	—	—
<b>7</b>	100.63	CH	6.36	D, J = 1.9
<b>8</b>	138.60	C	—	—
<b>9</b>	101.34	4	6.61	D, J = 1.9
<b>9a</b>	144.17	C	—	—
<b>10</b>	—	O	—	—
<b>11</b>	165.75	C=O	—	—
<b>11a</b>	—	C	—	—
<b>Me-8</b>	24.44	CH <sub>3</sub>	2.75	S

**Tabela 8** - Deslocamento químico do composto 3.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.



**Figura 87** - Espectro de massas do composto 3 (espectro de HRMS com fonte de ionização ESI), mostrando os adutos observados para este composto.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

A completa identificação estrutural do composto 3 foi corroborada por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), em modo positivo, na qual foi detectado o íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  259,0600, compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_{10}O_5$ , apresentando um erro de massa de 3,86 ppm, conforme ilustrado na Figura 87. Essa fórmula corresponde a uma massa molecular teórica de 258,0583 Da, em consonância com a estrutura proposta com base nos dados espectroscópicos de RMN.

O espectro de fragmentação (MS/MS) revelou um pico base em  $m/z$  259,0600 indicando a alta estabilidade do íon molecular. Dentre os fragmentos observados, destacam-se os íons em  $m/z$  128,0615, 115,0538 e 92,9969, sugerindo rupturas no sistema policíclico

oxigenado da molécula, possivelmente relacionadas à quebra de ligações no núcleo aromático substituído. A formação desses fragmentos reforça a presença de um esqueleto aromático altamente conjugado e estabilizado por grupos oxigenados.

A análise combinada dos dados de fragmentação, RMN e comparações com compostos análogos descritos na literatura permitiu a identificação do composto como 1,6-dihidroxi-8-metil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepina-11-ona, um derivado aromático policíclico oxigenado, comumente encontrado em metabólitos produzidos por espécies do gênero *Talaromyces*.

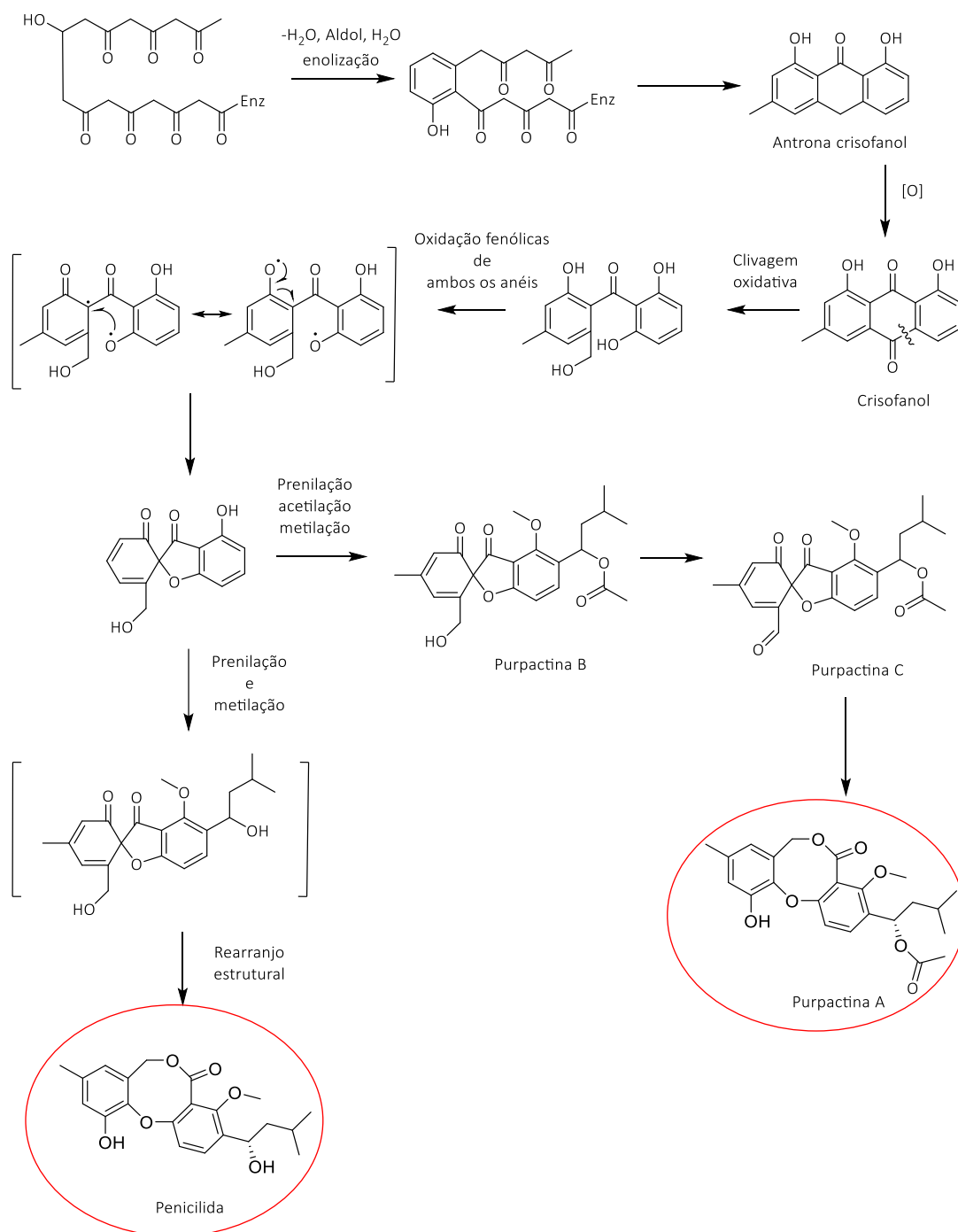
### 7.9.7 Biossíntese das penicilideas lactônicas

Os compostos do tipo penicilida pertencem a uma classe de metabólitos secundários derivados da via biossintética dos policetídeos, comum em fungos do gênero *Penicillium* e *Talaromyces*. Sua formação tem origem na ação sequencial de poliquetídeo sintases (PKSs), que utilizam unidades de acetato para gerar cadeias policetídicadas lineares que, por meio de processos cíclicos e oxidativos, são convertidas em estruturas altamente oxigenadas e aromáticas (NISHIDA et al., 1992).

A biossíntese desses compostos pode ser inferida a partir de um precursor do tipo antrona, como a crisofanol-antrona, formada após descarboxilação de uma cadeia octacetídica. A clivagem oxidativa do anel B da antrona leva à formação de uma benzofenona altamente reativa, intermediária crucial para a construção do esqueleto tricíclico característico desta classe. Este intermediário pode então sofrer reações de ciclização intramolecular e aromatização, originando um núcleo espirobenzofurano fundido a uma estrutura de ciclohexa-3',5'-dieno-2',3-diona (DEWICK, 2016).

Modificações oxidativas subsequentes, incluindo a metilação de grupos hidroxila e a introdução de cadeias laterais via mecanismos enzimáticos específicos (como preniltransferases e metiltransferases), contribuem para a diversidade estrutural dos compostos biossintetizados. A penicilida 1, em particular, parece derivar da modificação oxidativa e metilação de um intermediário comum, levando à formação do esqueleto dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one, caracterizado por uma ponte oxigenada interanular e a presença de grupos metoxila, hidroxila e cadeias laterais alifáticas oxigenadas.

Assim, a diversidade dos compostos observados nesta classe deriva de alterações sutis no padrão de oxidação, na natureza dos substituintes aromáticos e na extensão das modificações pós-PKS, o que confere grande complexidade à sua biossíntese e potencial atividade biológica.



**Figura 88** - Esquema biossintético proposto para os compostos penicilida e purpactina A.

Fonte - Adaptado de Salvatore M. M. et al. (2024).

### 7.9.8. Abordagem de redes moleculares

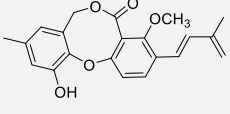
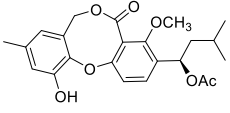
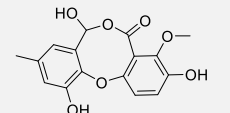
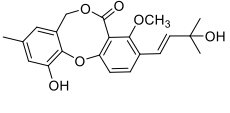
A rede molecular revelou alterações significativas no perfil metabólico do fungo *Talaromyces aureolinus* cultivado com e sem a adição de manganês como indutor. A figura 89 apresenta a rede molecular construída com base nos espectros MS/MS obtidos das duas condições experimentais: controle (representado pelos nós em rosa) e cultivado com manganês (nós em azul). A análise resultou em diversos agrupamentos (clusters), indicando compostos com fragmentações similares e, portanto, estruturalmente relacionados.

De maneira geral, observou-se que a adição de manganês levou ao surgimento ou aumento da intensidade de diversos compostos exclusivos (nós em azul) e também ao deslocamento do perfil químico com formação de novas famílias moleculares. Esses compostos potencialmente induzidos pelo íon metálico são indicados na rede molecular.

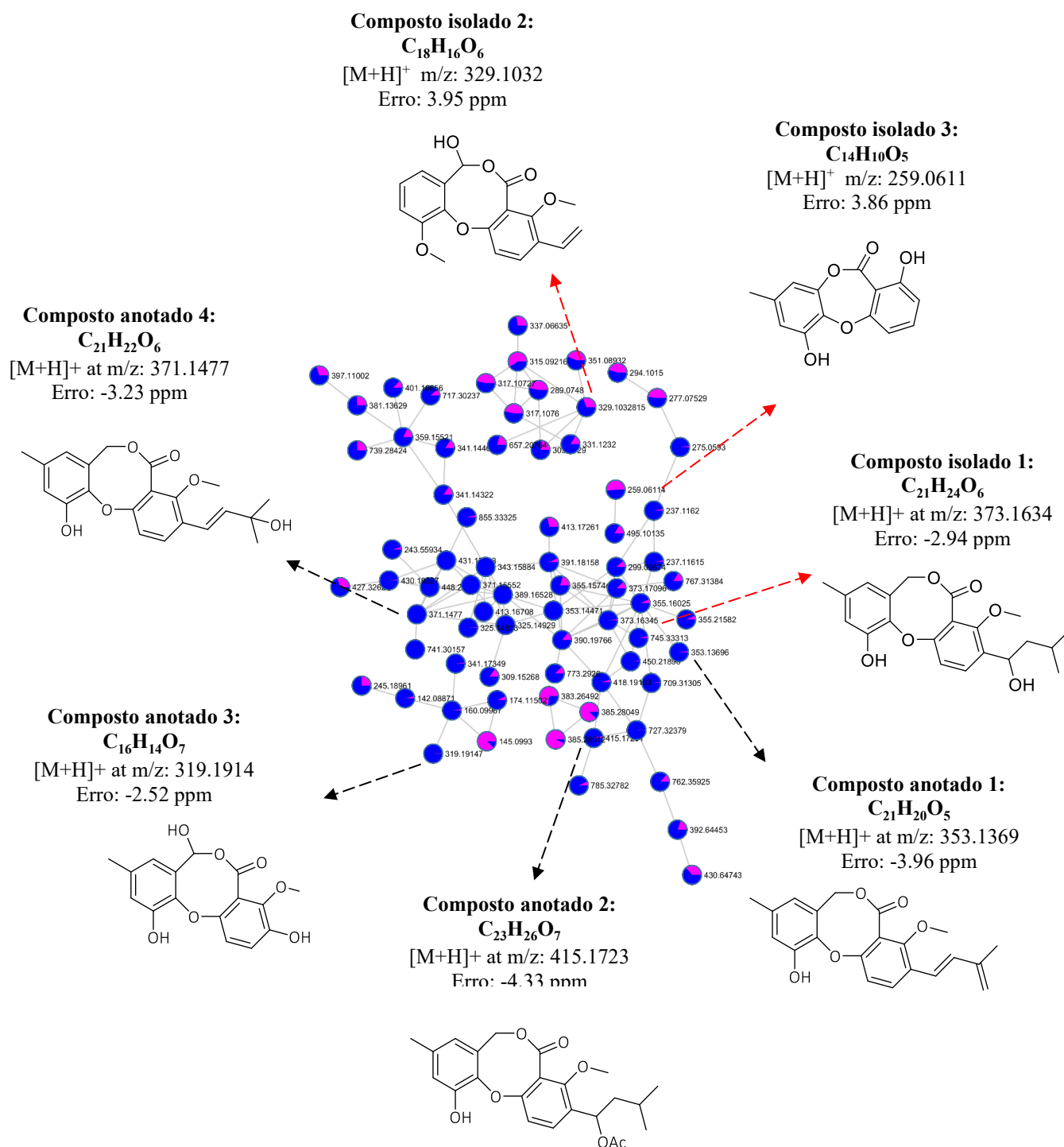
Dentre os compostos detectados, três foram isolados e elucidados estruturalmente, sendo eles: Composto isolado 1: 11-hidroxi-3-(1-hidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-9-metil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona; Composto isolado 2: 7-hidroxi-4,11-dimetoxi-3-vinil-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocina-5-ona e o Composto isolado 3: 1,6-di-hidroxi-8-metil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepina-11-ona (Figura 89).

Os demais compostos que foram anotados foram: Composto anotado 1: Neosarfenol B, composto anotado 2: [(1R)-1-(6-hidroxi-1-metoxi-8-metil-12-oxo-10H-benzo[b][1,5]benzodioxocin-2-il)-3-metilbutil] acetato, Composto anotado 3: 3,7,11-trihydroxy-4-methoxy-9-methyl-5H,7H-dibenzo[b,g][1,5]dioxocin-5-one e o Composto anotado 4: 1',2'-Desidropenicilídeo, presentes na rede e que foram anotados com base na comparação com padrões espectrais de bibliotecas públicas (como GNPS, SIRIUS e MSfinder e busca bibliográfica) (Figura 89) e (Tabela 9) (SALVATORE et al., 2024).

A distribuição dos compostos sugere que o manganês atua como modulador da biossíntese secundária do fungo, influenciando diretamente a expressão de vias metabólicas específicas responsáveis pela produção desses metabólitos aromáticos oxigenados.

Nº	Fórmula molecular	*[M]	*[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	Estrutura
1	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	352.1311	353.1369	<b>353.1369</b> ; 337.1070; 323.1277; 307.0964; 269.0808; 189.0910; 137.0597; 121.0647; 91.0542; 79.0542	
2	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	414.1679	415.1723	<b>415.1723</b> ; 353.1383; 337.1070; 325.1434; 299.0914; 285.0757; 271.0601; 151.0389; 69.0698; 43.0178	
3	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	318.1904	319.1914	<b>319.1914</b> ; 301.0710; 289.0710; 273.0602; 257.0441; 229.0494; 197.0441; 153.0187	
4	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	370.1416	371.1477	<b>371.1477</b> ; 369.1332; 351.1227; 337.1070; 323.1277; 311.0914; 217.0859; 207.1015; 137.0597; 109.0647	

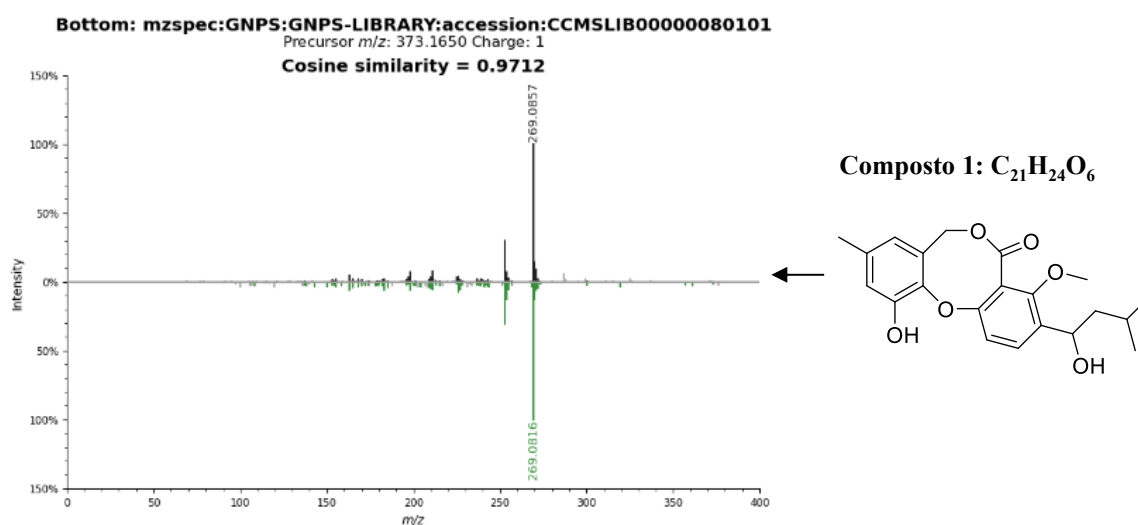
**Tabela 9** - Compostos anotados no processo de desreplicação com equivalência estrutural aos compostos isolados.



**Figura 89** - Agrupamento de depsídonas lactônicas isoladas (setas vermelhas) e anotadas (setas pretas) na rede molecular obtida a partir dos dados de MS/MS do fungo *Talaromyces aureolinus*. Os nós em rosa indicam o controle experimental e os nós em azul indicam o experimento associado ao cátion manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor – GNPS 2.

Vale ressaltar que a anotação do composto 1 foi realizada por meio da comparação do espectro de fragmentação MS/MS experimental com a biblioteca espectral do GNPS (acesso: CCMSLIB00000080101). O resultado revelou um valor de similaridade cosseno de 0,9712, evidenciando uma excelente correlação com o espectro de referência da penicilida. Essa alta similaridade confere grande confiabilidade à anotação proposta. No espectro em formato *mirror* (Figura 90), observa-se uma sobreposição significativa entre os fragmentos do composto experimental (em preto) e aqueles do padrão da biblioteca (em verde), com destaque para o fragmento em  $m/z$  269,0810, presente em ambas as análises.



**Figura 90** - Espectro de espelho do composto 1.

**Fonte** - Adaptado do GNPS 2.

Dentre os três compostos isolados neste estudo, apenas o composto 1 pôde ser anotado via GNPS, uma vez que foi o único com espectro depositado na plataforma. Esse fato ressalta a importância da ferramenta como aliada na identificação rápida de metabólitos conhecidos e, ao mesmo tempo, destaca sua limitação diante de substâncias inéditas com a possibilidade de depósito espectral para uma atualização das bibliotecas do GNPS. Os compostos 2 e 3, embora caracterizados por técnicas espectroscópicas, não possuem relatos prévios na literatura científica até o momento, o que aponta para seu possível ineditismo estrutural.

A partir da integração dos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massas de alta resolução e MS/MS, juntamente com a comparação espectral via GNPS, foi possível realizar a identificação assertiva do composto 1 como sendo penicilida. Trata-se de um metabólito aromático oxigenado, com esqueleto policíclico e cadeias alifáticas ramificadas, amplamente descrito como produto natural de espécies do gênero *Talaromyces*, conhecido por

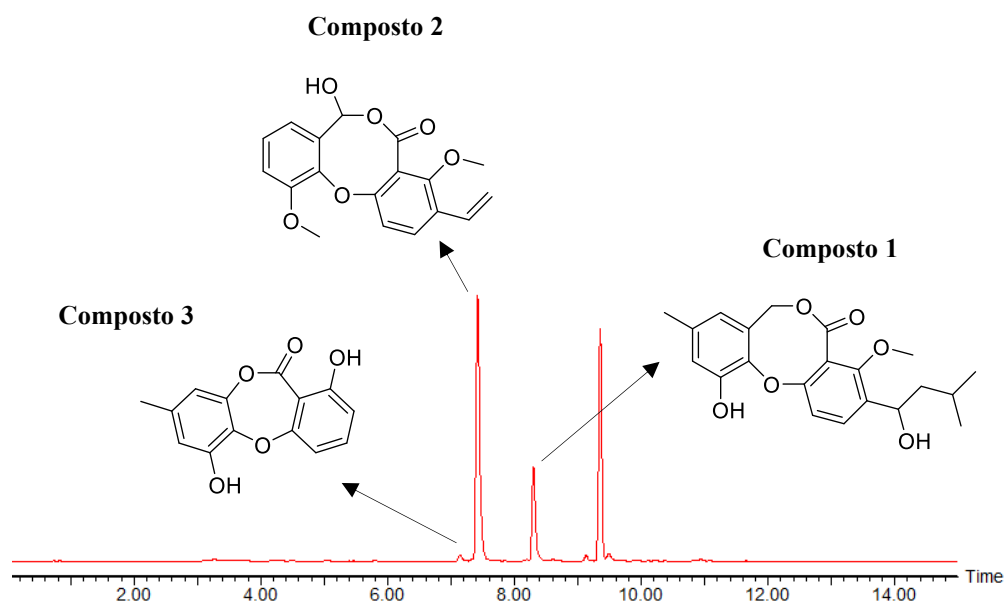
apresentar diversas atividades biológicas potenciais (CHU et al., 2010; GUO et al., 2011; ZHAI et al., 2015; GUO et al., 2012; NIU et al., 2014; SUZUKI et al., 2000; NGOKPOL et al., 2015).

Esse resultado reforça o papel estratégico das plataformas de redes moleculares na triagem e anotação de metabólitos, além de incentivar a ampliação de bancos de dados com novos espectros para facilitar futuras identificações.

### 7.9.9. Quantificação dos compostos isolados

A aplicação do modo de aquisição MRM (Multiple Reaction Monitoring) demonstrou-se fundamental neste estudo, especialmente por sua alta especificidade na detecção e quantificação de compostos em matrizes complexas. Esse modo de aquisição permite que íons precursores específicos sejam selecionados e fragmentados no espectrômetro de massas, possibilitando o monitoramento apenas dos íons produto de interesse. Com isso, é possível realizar a análise simultânea de diversos analitos em uma única corrida cromatográfica, com ganhos significativos em seletividade e sensibilidade.

No contexto da quantificação dos compostos isolados, a estratégia baseada no modo MRM se mostrou extremamente eficiente. A técnica não apenas aumentou a sensibilidade do método, como também reduziu interferências provenientes de íons não relacionados, o que contribuiu para a precisão dos resultados (Figura 91). As curvas de calibração construídas para cada composto revelaram excelente linearidade, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,996, evidenciando a confiabilidade dos dados obtidos.



**Figura 91** - Cromatograma dos compostos isolados.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

As análises foram realizadas dentro de uma faixa de concentração entre 1,953125 e 250 mg/mL, intervalo no qual os parâmetros de desempenho analítico mostraram-se adequados. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) encontrados reforçam essa adequação: o composto 1 apresentou LOD de 0,08 mg/mL e LOQ de 0,24 mg/mL; o composto 2, LOD de 0,06 mg/mL e LOQ de 0,19 mg/mL; e o composto 3, LOD de 0,05 mg/mL e LOQ de 0,15 mg/mL.

Composto	R2	LOD	LOQ	Intervalo [mg/mL]	[mg/mg] Extrato Czapek	[mg/mg] Extrato Czapek Mn <sup>2+</sup>	[mg/mg] Extrato arroz	[mg/mg] Extrato arroz Mn <sup>2+</sup>
Composto 1	0,9967	0,08	0,24	250-1,953125	9.8827	28.4515	11.2777	8.2309
Composto 2	0,9979	0,06	0,19	250-1,953125	4.8279	14.8279	7.2629	11.7367
Composto 3	0,9986	0,05	0,15	250-1,953125	5.9487	6.9958	15.4925	25.8535

\*LOD – limite de detecção e \*LOQ – limite de quantificação.

**Tabela 10** - Ajustes obtidos para a curva de calibração dos compostos isolados e quantificação nos extratos dos meios de cultivo czapek e arroz.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

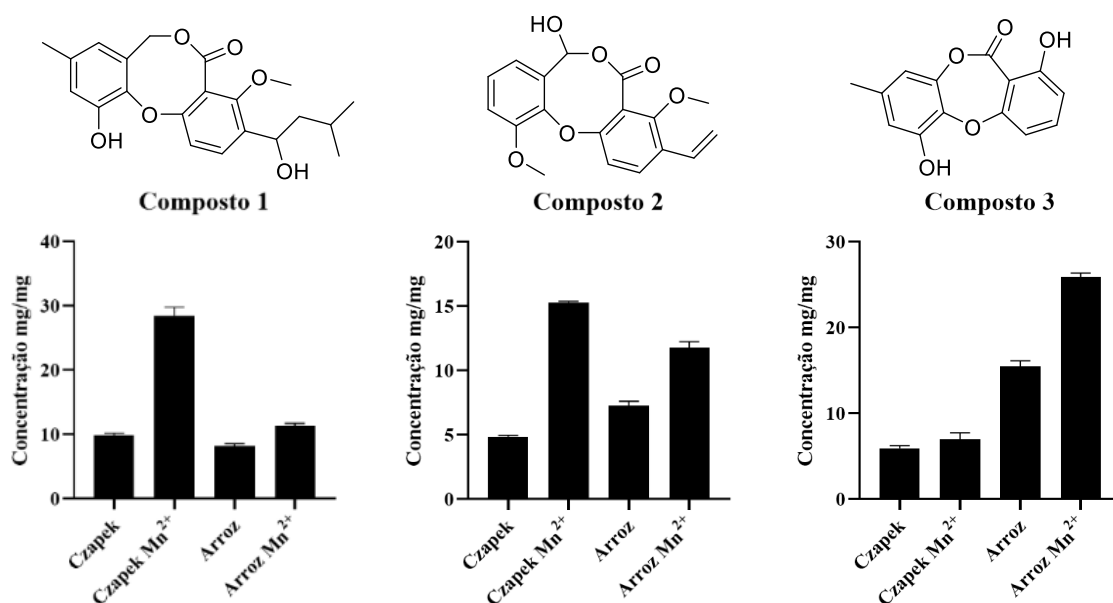
Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que o uso do modo MRM representa uma ferramenta robusta e confiável para a quantificação de metabólitos isolados, especialmente quando se busca alta seletividade, reprodutibilidade e sensibilidade em métodos analíticos voltados à caracterização de produtos naturais. A quantificação nos diferentes extratos revelou variações significativas na produção dos compostos em função do meio de cultivo e da presença de íons Mn<sup>2+</sup>.

O composto 1 foi majoritariamente produzido no extrato obtido em meio czapek suplementado com Mn<sup>2+</sup> (28,4515 mg/mg), seguido pelo extrato de arroz sem adição de Mn<sup>2+</sup> (11,2777 mg/mg), o extrato de czapek sem suplementação (9,8827 mg/mg) e, por fim, o extrato de arroz com Mn<sup>2+</sup> (8,2309 mg/mg).

Para o composto 2, o maior rendimento foi observado no extrato de arroz com Mn<sup>2+</sup> (11,7367 mg/mg), enquanto os demais extratos apresentaram valores semelhantes: 7,2629 mg/mg (arroz sem Mn<sup>2+</sup>), 7,2036 mg/mg (czapek sem Mn<sup>2+</sup>) e 4,8279 mg/mg (czapek com Mn<sup>2+</sup>).

Já o composto 3 apresentou a maior concentração no extrato de arroz suplementado com Mn<sup>2+</sup> (25,8535 mg/mg), seguido pelo extrato de arroz sem suplementação

(15,4925 mg/mg), czapek com  $Mn^{2+}$  (6,9958 mg/mg) e czapek sem suplementação (5,9487 mg/mg). Esses resultados indicam que a presença de  $Mn^{2+}$  e o tipo de meio influenciaram de maneira distinta a produção de cada composto, destacando o potencial modulador do íon metálico na expressão metabólica do fungo *Talaromyces aureolinus*.



**Figura 92** - Compostos isolados que foram quantificados nos meios de cultivo czapek e arroz com e sem o indutor de manganês.

**Fonte** - Elaborado pelo autor.

No caso do composto 1, observa-se um impacto marcante da suplementação com  $Mn^{2+}$  no meio czapek, com a concentração atingindo aproximadamente 28,45 mg/mg, o que representa um aumento superior a 2,8 vezes em relação ao mesmo meio sem suplementação ( $\approx 9,88$  mg/mg). Esse efeito, contudo, não se reproduz no meio à base de arroz, onde a concentração do composto foi ligeiramente reduzida na presença de  $Mn^{2+}$  ( $\approx 8,23$  mg/mg) em comparação ao arroz sem suplementação ( $\approx 11,28$  mg/mg). Esses dados sugerem uma interação específica entre o  $Mn^{2+}$  e os componentes do meio czapek, que favorece significativamente a biossíntese do composto 1.

Para o composto 2, verifica-se uma resposta distinta e dependente do meio: em ambos os meios suplementados com  $Mn^{2+}$ , a produção do composto foi estimulada em comparação aos respectivos controles sem o cátion. No extrato de arroz com  $Mn^{2+}$ , a concentração foi de aproximadamente 11,74 mg/mg, superior ao arroz sem suplementação ( $\approx 7,26$  mg/mg). No meio czapek, embora a concentração do composto tenha sido maior na presença de  $Mn^{2+}$  ( $\approx 15,25$  mg/mg) comparada ao czapek sem  $Mn^{2+}$  ( $\approx 4,83$  mg/mg), destaca-se

que a suplementação promoveu um aumento expressivo. Assim, a influência do  $Mn^{2+}$  na biossíntese do Composto 2 é positiva em ambos os meios, indicando um efeito modulador seletivo, porém dependente do tipo de substrato.

Já para o composto 3, observa-se uma tendência clara e consistente de aumento progressivo na produção nos meios à base de arroz, especialmente quando suplementados com  $Mn^{2+}$ . A concentração máxima, de aproximadamente 25,85 mg/mg, foi observada no extrato de arroz com  $Mn^{2+}$ , valor significativamente superior às demais condições. Embora o meio czapek com  $Mn^{2+}$  tenha apresentado um leve incremento em relação ao czapek sem suplementação ( $\approx 6,99$  vs.  $\approx 5,95$  mg/mg), o efeito sinérgico entre o meio sólido de arroz e o íon  $Mn^{2+}$  revelou-se muito mais expressivo para a biossíntese do composto 3.

De forma geral, os resultados evidenciam que a produção dos metabólitos pelo *Talaromyces aureolinus* é fortemente influenciada pelo tipo de meio e pela presença do  $Mn^{2+}$ , e que esse impacto varia conforme o composto analisado. Esses achados reforçam a importância da otimização das condições de cultivo como estratégia para maximizar a produção de metabólitos bioativos, além de destacar o manganês como um importante modulador seletivo da expressão metabólica fúngica.

## 7.10. Conclusões

O presente estudo evidenciou a influência significativa do cátion metálico  $Mn^{2+}$  na produção de metabólitos secundários por *Talaromyces aureolinus*, demonstrando que a suplementação dos meios de cultivo com esse indutor pode atuar como um modulador seletivo da expressão metabólica fúngica. Os efeitos do manganês foram uniformes entre os compostos analisados, revelando uma resposta biossintética específica e aparentemente dependente da estrutura química de cada substância associado a suplementação do cátion.

Para o composto 1, o meio czapek suplementado com  $Mn^{2+}$  proporcionou a maior concentração, sugerindo que essa combinação estimula rotas metabólicas particulares associadas à sua biossíntese. Já o Composto 3 apresentou uma produção significativamente elevada no meio de arroz suplementado com  $Mn^{2+}$ , evidenciando a importância da matriz do meio na ativação de vias específicas. No caso do Composto 2, a maior concentração foi observada no meio czapek em equivalência ao composto 1 suplementado com  $Mn^{2+}$ , superando as demais condições e indicando uma resposta positiva à presença do cátion nesse meio definido, embora o efeito tenha sido relevante também no meio de arroz.

A etapa de quantificação dos compostos demonstrou elevada confiabilidade e reprodutibilidade, com curvas analíticas apresentando excelente linearidade ( $R^2 > 0,996$ ) e

faixas de trabalho adequadas às concentrações observadas. Fatores como baixa variabilidade entre réplicas, alta sensibilidade dos métodos analíticos (com baixos LOD e LOQ), estabilidade das soluções padrão e eficiência na extração dos compostos contribuíram decisivamente para a qualidade dos resultados.

Esses achados reforçam a importância de estratégias que considerem tanto as características físico-químicas dos meios de cultivo quanto o papel modulador de íons metálicos como o  $Mn^{2+}$  na expressão de vias metabólicas secundárias. A aplicação controlada desse cátion surge como uma abordagem promissora para a indução de rotas biossintéticas e aumento da produção de metabólitos bioativos, contribuindo para o avanço da biotecnologia fúngica e da exploração racional de micro-organismos como fontes de novas substâncias de interesse industrial, farmacêutico e biotecnológico.

## 8. Referências

- ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1804, p. 263–274, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>.
- AISLABIE, J. M.; MCLEOD, M. P. Dominant bacteria in soils of marble point and wright valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 3041–3056, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.02.018>.
- AKSENOV, A. A. et al. Global chemical analysis of biology by mass spectrometry. *Nature Reviews Chemistry*, v. 1, 2017.
- ALAZARD, D.; DUKAN, S.; URIOS, A. et al. Desulfovibrio hydrothermalis sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 173–178, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02323-0>.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>.
- ALTAIR, T.; AVELLAR, M. G. B.; RODRIGUES, F. et al. Microbial habitability of Europa sustained by radioactive sources. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 260, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18470-z>.
- AMAGATA, T. et al. Variation in cytostatic constituents of a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by manipulating the carbon source. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 1731–1740, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/np070165m>.
- ANDREINI, C. et al. Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 13, p. 1205–1218, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5>.
- ANO, Y. et al. Identification of 14-dehydroergosterol as a novel anti-inflammatory compound inducing tolerogenic dendritic cells. *Scientific Reports*, v. 7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14446-1>.
- ARAI, M. et al. Poliésteres de *Talaromyces flavus* com sinergismo a miconazol. *Journal of Antibiotics*, v. 55, p. 172–180, 2002.
- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. *ISRN Pharmacology*, v. 2011, p. 1–11, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5402/2011/619395>.
- ARRUDA, G. L. de et al. Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. *Natural Product Research*, v. 36, p. 3999–4002, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1892098>.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for manganese. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health

Service, 2000.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, Santiago, v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000.

BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 44, n. 2, p. 139–152, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00028-X).

BAKER-AUSTIN, C.; DOPSON, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 165–171, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>.

BALIYAN, S. et al. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, v. 27, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>.

BANO, A. et al. Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. *Chemosphere*, v. 199, p. 218–222, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.043>.

BARA, R. et al. Biomodin: atividade contra MRSA. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 56, p. 3257–3272, 2013.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology Spectrum*, v. 4, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>.  
BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. WILEY, 2002. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/S>. Acesso em: 12 jul. 2025.

BROUWERS, G. J. et al. Bacterial Mn<sup>2+</sup> oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions. *Geomicrobiology Journal*, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490450050023791>.

BURGER, M. S. et al. Manganese removal during bench-scale biofiltration. *Water Research*, v. 42, n. 19, p. 4733–4742, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.016>.

BURGOS, W. D.; TAN, H.; SANTELLI, C. M.; HANSEL, M. C. Importance of fungi in biological Mn(II) oxidation in limestone treatment beds. National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation – ASMR, Pittsburgh, 2010.

CACHO, R. A.; TANG, Y.; CHOOI, Y. H. Next-generation sequencing approach for connecting secondary metabolites to biosynthetic gene clusters in fungi. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00774>.

CANTON, G. C. et al. Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, v. 26, p. 475–487, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0686-3>.

CHACON, D. S. et al. *Erythrina velutina* Willd. alkaloids: piecing biosynthesis together from transcriptome analysis and metabolite profiling of seeds and leaves. *Journal of Advanced*

*Research*, v. 34, p. 123–136, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.01.017>.

CHAUDHARY, K. K. et al. Phenolics and polyesters from *Talaromyces stipitatus*: Revision of the structure of *Talaromycesone A*. *Journal of Natural Products*, v. 87, n. 2, p. 418–425, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c00885>.

CHAUDHARY, K.; SINGH, A.; KUMAR, P. Advances in genome mining and CRISPR-based activation of cryptic biosynthetic gene clusters in fungi. *Journal of Fungi*, v. 10, n. 1, p. 12–29, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof10010012>.

CHEN, Min et al. Bioactive steroid derivatives and butyrolactone derivatives from a gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus. *Chemistry & Biodiversity*, v. 12, n. 9, p. 1426–1434, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400321>.

CHOROT, V. et al. Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus, *Pleurotus ostreatus* (oyster fungus). [*s.l.*]: [s.n.], [s.d.].

CHU, Y. S. et al. Pyranoindol alkaloids talathermophilins A e B isolados de *Talaromyces thermophilus* com atividade nematocida. *Organic Letters*, v. 12, p. 4356–4359, 2010.

CHU, Y. S. et al. Talatermophilins A and B, two nematocidal diterpenoids from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Organic Letters*, v. 12, n. 19, p. 4356–4359, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/ol101817g>.

COBLE, J. B.; FRAGA, C. G. Comparative evaluation of preprocessing freeware on chromatography/mass spectrometry data for signature discovery. *Journal of Chromatography A*, v. 1358, p. 155–164, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.100>.

CONDE-MARTÍNEZ, N. et al. Integrating molecular network and culture media variation to explore the production of bioactive metabolites by *Vibrio diabolicus* A1SM3. *Marine Drugs*, v. 17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/md17040196>.

CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. *Natural Product Letters*, Abingdon, v. 6, n. 3, p. 193–196, 1995.

COUTINHO, H. L. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 71, n. 3, pt. 2, p. 491–503, 1999.

COY, E. B. D.; NIETO, I. R. J. Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. [*S.l.*]: [s.n.], 2009.

DANTAS, S. B. S. et al. Phenolic compounds and bioactive extract produced by endophytic fungus *Corioloopsis rigida*. *Natural Product Research*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2115492>.

DAS, A. P.; SUKLA, L. B.; PRADHAN, N.; NAYAK, S. Manganese biomining: A review. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 16, p. 7381–7387, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.009>.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – an overview. *Indian*

*Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008.

DETHOUP, T. et al. Peptídeos cíclicos talaromins A e B. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 1200–1202, 2007.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.

DHANKHAR, R.; HOODA, A. Fungal biosorption—An alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, v. 32, p. 467–491, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>.

DING, H. E. et al. Ergosterols from marine-derived fungus *Penicillium* sp. and their inhibitory effects on monoamine oxidase. *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 48, p. 6754–6757, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.10.063>.

DONG, Y. S. et al. Wortmannilactonas E–H: inibidores de catepsina B. *Helvetica Chimica Acta*, v. 92, p. 567–574, 2009.

DU, L. et al. Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. *Journal of Antibiotics*, v. 63, p. 165–170, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2010.11>.

DU, L. et al. Unusual C25 steroid isomers with bicyclo[4.4.1]A/B rings from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1343–1351, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/np8000442>.

DU, L.; FENG, T.; ZHAO, B.; LI, D.; CAI, S.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. *Journal of Antibiotics*, v. 63, p. 165–170, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2010.11>.

DU, L.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Unusual C25 steroid isomers with bicyclo[4.4.1]A/B rings from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1343–1351, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/np8000442>.

EHRlich, H. L.; NEWMAN, D. K. *Geomicrobiology*. 5. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

ELE, J. W. et al. Steroids with MAO inhibitory activity from the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 16, n. 10, p. 1029–1034, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/10286020.2014.933812>.

EL-NAGGAR, N. E. A.; HAROUN, S. A.; OWEIS, E. A.; SHERIEF, A. A. Preparation. *Biochemistry and Biotechnology*, v. 45, n. 7, p. 712–729, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.943375>.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Drinking water criteria document for manganese. Washington, D.C.: EPA, 1994.

FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00173>.

FILL, T. P. et al. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 1444–1451, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160163>.

FLIEGER, J.; FLIEGER, M. The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD method on tracking the antioxidant activity of pure antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) hydroalcoholic extracts. *Molecules*, v. 25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25246005>.

FUJIMOTO, H. et al. Luteusinas e atividade inibitória da MAO. *Heterocycles*, v. 30, p. 607–616, 1990.

FUJIMOTO, H. et al. Steroids from a fungal source: Inhibitors of monoamine oxidase. *Mycotoxins*, v. 27, p. 15–19, 1988. DOI: <https://doi.org/10.2520/myco1975.1988.15>.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, v. 156, p. 609–643, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>.

GAVRILESCU, M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*, v. 4, n. 3, p. 219–232, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.200420026>.

GEORGIEVA, M. L. et al. Bioprospecting of halophilic and halotolerant fungi from hypersaline environments: a review of diversity and biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, v. 43, p. 34–56, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.02.001>.

GEORGIEVA, M. L. et al. Fungal diversity and bioactive potential in hypersaline lakes of Central Asia. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1178465>.

GEORGIEVA, M. L. et al. Haloalkalitolerant fungi from sediments of the Big Tambukan Saline Lake (Northern Caucasus): diversity and antimicrobial potential. *Microorganisms*, v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102587>.

GÔES, K. C. G. P. de; SILVA, J. J. da; LOVATO, G. M.; IAMANAKA, B. T.; MASSI, F. P.; ANDRADE, D. S. *Talaromyces sayulitensis*, *Acidiella bohemia* and *Penicillium citrinum* in Brazilian oil shale by-products. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 110, n. 12, p. 1637–1646, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0913-8>.

GONÇALVES TAVARES, D.; VIANA LESSA BARBOSA, B.; LOPES FERREIRA, R.; FERREIRA DUARTE, W.; GOMES CARDOSO, P. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 148–154, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.031>.

GORBACHEVA, M. et al. Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. *Bioorganic Chemistry*, v. 37, n. 1, p. 1–5, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2008.10.004>.

GUO, J. P. et al. Descoberta dos compostos talathermophilins C–E e ciclodipeptídeo em fungo

termofilico. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 2278–2281, 2011.

GUO, J. P. et al. Talatermophilins C and D, two novel diterpenoids from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 10, p. 2278–2281, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/np200365z>.

GUO, J. P. et al. Termolídeos A–F: macrolídeos híbridos PKS–NRPS. *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, p. 20306–20309, 2012.

GUO, J. P. et al. Total synthesis and configuration revision of talatermophilin A. *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, n. 50, p. 20306–20309, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja3104044>.

HAGEMANN, A. et al. The sterols of calcareous sponges (*Calcarea*, Porifera). *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 156, p. 26–32, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.07.001>.

HAMEED, A. et al. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, v. 9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu9101101>.

HANSEL, C. M. et al. Mn(II) oxidation by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, v. 109, n. 31, p. 12621–12625, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1203885109>.

HASAN, H. A. et al. Biosorption of manganese in drinking water by isolated bacteria. *Journal of Applied Sciences*, v. 10, n. 21, p. 2653–2657, 2010.

HASAN, H. A. et al. Isotherm equilibria of Mn<sup>2+</sup> biosorption in drinking water treatment by locally isolated *Bacillus* species and sewage activated sludge. *Journal of Environmental Management*, v. 111, p. 34–43, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.027>.

HAYADHI, H. et al. Chrodrimaninas com atividade inseticida. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 76, p. 745–748, 2012.

HE, J. W. et al. Talapoliésteres: polióis inativos citotóxicos. *Molecules*, v. 19, p. 20880–20887, 2014.

HE, J. W. et al. Two new coumarins from *Talaromyces flavus*. *Molecules*, v. 19, p. 20880–20887, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191220880>.

HOPE, C. K.; BOTT, T. R. Laboratory modelling of manganese biofiltration using biofilms of *Leptothrix discophora*. *Water Research*, v. 38, n. 7, p. 1853–1861, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.036>.

HORAI, H. et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, p. 703–714, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.

HUI, M. L. Y. et al. The extremophilic actinobacteria: from microbes to medicine. *Antibiotics*, v. 10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>.

JIN, D. X. et al. Phenolic composition, antioxidant, cytotoxic activities and cardioprotective effect of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Hypericum attenuatum* Fisch. ex Choisy. *Natural Product Research*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2199214>.

JÚNIOR, F. B. D. R. et al. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microorganismos do solo. Planaltina, DF: Embrapa, 2002.

KAIFUCHI, S. et al. Ukulactona C: inibidor de NADH-fumarato redutase. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 61, p. 57–62, 2015.

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

KAWAGUCHI, M. et al. Talapoliésteres com sinergia antifúngica. *Journal of Antibiotics*, v. 66, p. 179–189, 2013.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 412–422, 2011.

KEHRES, D. G.; MAGUIRE, M. E. Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 263–290, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00052-4).

KELLER, N. P. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nature Chemical Biology*, v. 11, p. 671–677, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1897>.

KELLER, N. P. *Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 167–180, mar. 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0121-1.

KHALILNEZHAD, R. et al. Manganese biosorption from aqueous solution by *Penicillium camemberti* biomass in the batch and fixed bed reactors: a kinetic study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, p. 1919–1934, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1076-y>.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111–120, 1980.

KISS, A. et al. The cytotoxic properties of extreme fungi's bioactive components—An updated metabolic and omics overview. *Life*, v. 13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/life13081623>.

KOMAI, S. I. et al. Penicilídeos e isocumarinas de *Talaromyces flavus*. *Mycotoxins*, v. 54, p. 15–19, 2004.

KUHAR, F.; CASTIGLIA, V. C.; ZAMORA, J. C. Detección de manganeso peroxidasa y otras exoenzimas en 4 aislamientos de *Geastrum* (Geastrales) en cultivo puro. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 48, p. 274–278, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.002>.

KUMAR, M. et al. Epoformina e lactonas bioativas. *Journal of Natural Products*, v. 76, p. 194–199, 2013.

KUMARA, P.; K, S.; KUMAR, B. A. Determination of DPPH free radical scavenging activity by RP-HPLC: rapid sensitive method for the screening of berry fruit juice freeze dried extract. *Natural Products Chemistry & Research*, v. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000341>.

KUML, D. et al. Spiculisporic acid E, a new spiculisporic acid derivative and ergosterol derivatives from the marine-sponge associated fungus *Talaromyces trachyspermus* (KUFA 0021). *Natural Product Communications*, v. 9, n. 8, p. 1147–1150, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900808>.

LEARMAN, D. R. et al. Coupled biotic–abiotic Mn(II) oxidation pathway mediates the formation and structural evolution of biogenic Mn oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 75, p. 6048–6063, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.07.012>.

LEI, L. R. et al. Research advances in the structures and biological activities of secondary metabolites from *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.984801>.

LI, C. et al. Adaptative mechanisms of halophytic *Eutrema salsugineum* encountering saline environment. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.909527>.

LI, H. L. et al. Antioxidant hydroanthraquinones from the marine algal-derived endophytic fungus *Talaromyces islandicus* EN-501. *Journal of Natural Products*, v. 80, p. 162–168, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00797>.

LI, H. X. et al. Cytotoxic steroids from *Fusarium* sp. associated with marine sponge. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 5, p. 1230–1235, 2011b. DOI: <https://doi.org/10.1021/np200164k>.

LI, H. X. et al. Steroids with MAO inhibition and cytotoxic activity from the sponge-derived fungus *Fusarium* sp. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 5, p. 1230–1235, 2011a. DOI: <https://doi.org/10.1021/np200164k>.

LI, H. X. et al. Talaperóxidos: lactonas peroxidadas citotóxicas. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 1230–1235, 2011.

LI, L. Q. et al. Sesquiterpenos e derivados de phthalida. *Guangxi Zhiwu*, v. 31, p. 699–701, 2011.

LIND, A. L. et al. Drivers of genetic diversity in secondary metabolic gene clusters within a fungal species. *PLoS Biology*, v. 15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003583>.

LIND, A. L.; WISECAVER, J. H.; LAMEIRAS, C.; WIEMANN, P.; PALMER, J. M.; KELLER, N. P.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H.; ROKAS, A. Drivers of genetic diversity in secondary metabolic gene clusters within a fungal species. *PLoS Biology*, v. 15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003583>.

LIU, F. et al. Talacumarinas e atividade antiagregante. *Planta Medica*, v. 76, p. 185–189, 2010.

LIU, S. et al. *Talaromyces funiculosus*, a novel causal agent of maize ear rot and its sensitivity to fungicides. *Plant Disease*, v. 105, n. 12, p. 3852–3857, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0686-RE>.

LV, C. et al. Discovery of novel fungal metabolites through integration of omics and synthetic biology. *Fungal Biology Reviews*, v. 47, p. 1–10, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100273>.

LV, M. et al. New polyketides with antimicrobial activity from a mangrove-derived fungus *Talaromyces* sp. *Marine Drugs*, v. 21, n. 3, p. 177, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/md21030177>.

MACCHERONI, J. R. W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 638.

MARTIRENA-RAMÍREZ, A. et al. *Aspergillus brasiliensis* E\_15.1: A novel thermophilic endophyte from a volcanic crater. *Journal of Fungi*, v. 10, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof10080517>.

MARTIRENA-RAMÍREZ, M. A. et al. Bioprospecting thermophilic fungi from volcanic ecosystems for novel antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1223456, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1223456>.

MATSUNAGA, H. et al. Vanitaracinas com atividade anti-HBV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, p. 4325–4328, 2015.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem mass spectrometry. *Science*, v. 214, p. 280–287, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.7280693>.

MENDIL, D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum*-loaded on Sepabeads SP 70 prior to flame atomic absorption spectrometric determinations. *Journal of Hazardous Materials*, v. 152, p. 1171–1178, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.097>.

MERINO, N.; ARONSON, H. S.; BOJANOVA, D. P. et al. Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 10, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>.

MIAO, F. et al. Derivados de pirrolidona de *Talaromyces verruculosus*. *Molecules*, v. 17, p. 14091–14098, 2012.

MOHANTY, S. et al. Isolation, identification and screening of manganese solubilizing fungi from low-grade manganese ore deposits. *Geomicrobiology Journal*, v. 34, p. 309–316, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1189016>.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *[s.l.]*: [s.n.], [s.d.].

MOORE, Bradley S.; NEWMAN, David J. The extraordinary benefit of nature's chemistry to health, society, and the economy. *Journal of Natural Products*, v. 82, n. 6, p. 1417–1418, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5c00554>.

MORINO, T. et al. Adenina peptídica com atividade larvicida. *Journal of Antibiotics*, v. 48, p. 1509–1510, 1995.

MURDOCH, C. C.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 657–670, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6>.

NEALSON, K. H. The manganese-oxidizing bacteria. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). *The prokaryotes*. New York: Springer, 2006. p. 222–231.

NEALSON, K. H.; TEBO, B. M.; ROSSON, R. A. Occurrence and mechanisms of microbial oxidation of manganese. *Advances in Applied Microbiology*, v. 33, p. 279–318, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70165-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70165-5).

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629–661, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.

NGOKPOL, S. et al. Cytotoxic meroterpenoids from a marine-derived *Talaromyces* sp. *Marine Drugs*, v. 13, n. 6, p. 3567–3580, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/md13063567>.

NGOKPOL, S. et al. Minioluteumides: sesquiterpenos citotóxicos de origem marinha. *Marine Drugs*, v. 13, p. 3567–3580, 2015.

NIETO, I. J.; ÁVILA, I. M. Determinación de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del cuerpo fructífero de *Suillus luteus*. [S.l.]: [s.n.], [s.d.].

NISHIDA, H.; TOMODA, H.; OKUDA, S.; OMURA, S. Biosynthesis of purpactin A. *Journal of Organic Chemistry*, v. 57, p. 1271–1274, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1021/jo00031a032>.

NIU, X. M. et al. Genes de biossíntese dos termolídeos. *Organic Letters*, v. 16, p. 3744–3747, 2014.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, v. 17, p. 905–908, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 17, p. 36–44, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_165](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165).

PARVATHI, K.; NARESHKUMAR, R.; NAGENDRAN, R. Manganese biosorption sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Technology*, v. 28, p. 779–784, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593332808618833>.

PASRICHA, S.; SCHAFFERER, L.; LINDNER, H.; BOYCE, K. J.; HAAS, H.; ANDRIANOPOULOS, A. Differentially regulated high-affinity iron assimilation systems assist *Talaromyces marneffe*i to grow inside macrophages. *Molecular Microbiology*, v. 102, p. 715–737,

2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13489>.

PÉREZ SILVA, R. M. et al. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1533–1538, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.057>.

PILON, A. C. et al. Molecular networks: an analysis on annotations and discovery of new assets. *Química Nova*, v. 44, p. 1168–1179, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170777>.

PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; DURÁN-PATRÓN, R. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches. *Marine Drugs*, v. 20, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/md20020084>.

PITT, J. *Penicillium e Talaromyces*: introdução, *Penicillium*. In: BATT, C. A. (ed.). *Enciclopédia de microbiologia de alimentos*. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 6–13.

PONGPOM, M.; AMSRI, A.; SUKANTAMALA, P.; SUWANNAPHONG, P.; JEENKEAWPIEAM, J. Expression of *acuM* and *acuK* genes of *Talaromyces marneffeii* under gluconeogenic substrates and different iron concentrations. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 3, p. 102, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6030102>.

PROKSA, B. Recent progress in biologically active compounds of microbial origin. *Chemical Papers*, v. 64, n. 6, p. 696–714, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0073-z>.

PULSCHEN, A. A.; ARAUJO, G. G.; CARVALHO, A. C. S. R. et al. Survival of extremophilic yeasts in the stratospheric environment during balloon flights and in laboratory simulations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, n. 23, e01942-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01942-18>.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Minsk*, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.

RADDADI, N. et al. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 7907–7913, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>.

RAMMOHAN, A. et al. In silico, in vitro antioxidant and density functional theory-based structure–activity relationship studies of plant polyphenolics as prominent natural antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, p. 3690–3701, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.12.017>.

RAMMOHAN, A. Z. G. V. B. Y. B. M. K. Antioxidants: Structure–activity of plant polyphenolics. *Vitamins and Hormones*, v. 121, p. 395–411, 2023.

RANGSEEKAEW, P.; PATHOM-AREE, W. Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 387, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00387>.

REEN, F. J.; ROMANO, S.; DOBSON, A. D. W.; O’GARA, F. The sound of silence: Activating

silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. *Marine Drugs*, v. 13, p. 4754–4783, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/md13084754>.

REKHA, K. J.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus: a potential source of biologically synthesized nanoparticle. *Journal of Microbiology*, Seoul, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.

RIVERA, A. et al. *Pleurotus sajor-caju*. [s.l.]: [s.n.], [s.d.].

ROSA, L. H. et al. Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. In: *Fungi of Antarctica*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 1–17. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_1).

RUTTKIES, C. et al. MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *Journal of Cheminformatics*, v. 8, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9>.

SALVATORE, M. M. et al. Penicillides from *Penicillium* and *Talaromyces*: chemical structures, occurrence and bioactivities. *Molecules*, v. 29, n. 16, p. 3888, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29163888>.

SAMPAIO, J. A. et al. Manganês. [S.l.]: CETEM – Centro de Tecnologia Mineral, 2008. (Série Rochas e Minerais Industriais, v. 3).

SANCHEZ, O. et al. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 18, p. 5962–5967, 2007.

SANTALOVA, E. A. et al. Sterols from six marine sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 153–167, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00143-1).

SANTANA, A. L. Manganês. 2009. [S.l.]: s.n.

SANTELLI, C. M. et al. Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coal mine drainage in passive treatment systems by diverse fungal and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 14, p. 4871–4875, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00208-10>.

SANTOS, J. A. dos et al. Fungal community in Antarctic soil along the retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). *Microorganisms*, v. 8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081145>.

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, Munich, v. 183, n. 1, p. 92–99, 2016.

SÁRKÖZY, A. et al. Cerebrosides and steroids from the edible mushroom *Meripilus giganteus* with antioxidant potential. *Molecules*, v. 25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25061395>.

SAYED, A. M. et al. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, v. 128, p. 630–657, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14386>.

SHAO, S. et al. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 11616–11625, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf102285b>.

SHI, Y. et al. New bioactive secondary metabolites from fungi: 2023. *Mycology*, v. 15, p. 283–321, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/21501203.2024.2354302>.

SI, Y. et al. Cytotoxic cytochalasans from *Aspergillus flavipes* PJ03-11 by OSMAC method. *Tetrahedron Letters*, v. 59, p. 1767–1771, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.03.077>.

SKELLAM, E. Strategies for engineering natural product biosynthesis in fungi. *Trends in Biotechnology*, v. 37, p. 416–427, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.09.003>.

SMALL, J. et al. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 10, p. 4708–4716, 2001.

SOYER, J. L. et al. Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics*, v. 10, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004227>.

SUETRONG, S. et al. Hidden fungal diversity in cave environments: isolation and metabolite profiling of novel cave-derived fungi. *Mycological Progress*, v. 22, n. 1, p. 45–62, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01898-z>.

SUETRONG, S. et al. Unravelling the hidden diversity of cave mycobiota in Thailand's Satun Geopark. *Scientific Reports*, v. 13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43316-2>.

SUETRONG, S.; RUNGJINDAMONGKOL, P.; PHONGPAICHIT, S. Marine-derived fungi from coral ecosystems: novel species and bioactive compounds. *Marine Drugs*, v. 21, n. 6, p. 330, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/md21060330>.

SUJITH, P. P.; BHARATHI, P. A. L. Manganese oxidation by bacteria: biogeochemical aspects. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, v. 52, p. 49–76, 2011. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-21230-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-21230-7_3).

SUZUKI, S. et al. Talaroconvolutinas: ácidos tetramícos antifúngicos. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 768–772, 2000.

TABATA, Y. et al. Diazaphilonic acid: inibidor de telomerase. *Journal of Antibiotics*, v. 52, p. 412–414, 1999.

TAKECHI-HARAYA, Y. et al. Improved atomic force microscopy stiffness measurements of nanoscale liposomes by cantilever tip shape evaluation. *Analytical Chemistry*, v. 91, p. 10413–10423, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05479>.

TAKEUCHI, M. et al. Coculnol: ácido penicílico com ação antiviral. *Journal of Antibiotics*, v. 42, p. 198–205, 1989.

TATARCZAK-MICHALEWSKA, M.; FLIEGER, J. Application of High-Performance Liquid

Chromatography with Diode Array Detection to Simultaneous Analysis of Reference Antioxidants and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in Free Radical Scavenging Test. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19148288>.

TAVARES, D. G. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 148–154, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.031>.

TEBO, B. M. et al. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, v. 32, p. 287–328, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.32.101802.120213>.

TEBO, B. M. et al. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 9, p. 421–428, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.07.009>.

TERAO, J. Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention. *Food & Function*, v. 14, p. 7799–7824, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1039/d3fo02330c>.

TOMIKAWA, T. et al. Rasfonina como indutora de apoptose. *Journal of Antibiotics*, v. 53, p. 848–850, 2000.

TSUKADA, K. et al. Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalin-containing diterpenoid pyrones. *Nature Communications*, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15664-4>.

VAN EIJK, G. W. Derivados de antraquinona de *Talaromyces stipitatus*. *Experientia*, v. 29, p. 522–523, 1973.

VAN SANTEN, J. A. et al. The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. *ACS Central Science*, v. 5, p. 1824–1833, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00806>.

VEK, V. et al. Comparison of the content of extractives in the bark of the trunk and the bark of the branches of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Molecules*, v. 28, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28010225>.

VISAGIE, C. M. et al. Five new *Talaromyces* species with ampulliform-like phialides and globose rough walled conidia resembling *T. verruculosus*. *Mycoscience*, v. 56, p. 486–502, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.02.005>.

WADSWORTH, J.; COCKELL, C. S. Perchlorates on Mars enhance the bacteriocidal effects of UV light. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 4662, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04910-3>.

WANG, H. et al. Substituted L-tryptophan-L-phenyllactic acid conjugates produced by an endophytic fungus: *Aspergillus aculeatus* using an OSMAC approach. *RSC Advances*, v. 8, p. 7863–7872, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ra00200b>.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural

Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, p. 828–837, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.

WATROUS, J. et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>.

WEI, S.; XU, X.; WANG, L. Four new species of *Talaromyces* section *Talaromyces* discovered in China. *Mycologia*, v. 113, n. 2, p. 492–508, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1853457>.

XIAO, F. et al. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, v. 1, p. 60–69, 2020.

YANG, H. B.; LI, F.; JI, N. Y. Indole alcaloides de *Talaromyces* endofítico. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015.

YERSHOV, G. et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 10, p. 4913–4918, 1996.

YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 914, p. 17–34, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>.

YONGXIA, Z. et al. Isolation and characterization of ergosterol from *Monascus anka* for anti-lipid peroxidation properties. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 30, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101038>.

YOSHIDA, E. et al. Helicinas A–D: azafilonas cloradas. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 43, p. 1307–1310, 1995.

YOUSSEF, F. S.; SINGAB, A. N. B. An updated review on the secondary metabolites and biological activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and exploring the cytotoxic potential of their isolated compounds using virtual screening. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2021, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/8860784>.

YU, H.; LEADBETTER, J. R. Bacterial chemolithoautotrophy via manganese oxidation. *Nature*, v. 583, p. 453–458, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2468-5>.

ZARINS-TUTT, J. S. et al. Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Natural Product Reports*, v. 33, p. 54–72, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5np00111k>.

ZHAI, M. M. et al. Diketopiperazinas de *Talaromyces pinophilus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 9558–9564, 2015.

ZHAI, M. M. et al. Minioluteumides A and B: two novel sesquiterpene lactones with cytotoxic activity from *Talaromyces minioluteus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 43,

p. 9558–9564, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04296>.

ZHAI, M. M. et al. Talaromycolides A–C, novel phenyl-substituted phthalides isolated from the green Chinese onion-derived fungus *Talaromyces pinophilus* AF-02. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 9558–9564, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04296>.

ZHAI, M. M. et al. The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0081-3>.

ZHANG, J. et al. Kinetics of Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 65, p. 773–781, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00577-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00577-0).

ZHANG, X. et al. Bioactive dipyrroloquinones from endophytic *Talaromyces* sp. with anti-inflammatory activity. *Molecules*, v. 28, n. 23, p. 7847, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28237847>.

ZHANG, Y. et al. High-throughput screening of fungal secondary metabolites based on dereplication and metabolomic strategies. *Microbial Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 357–371, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14134>.

ZHANG, Y. et al. Isolation and characterization of ergosterol from *Monascus anka* for anti-lipid peroxidation properties. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 30, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101038>.

ZHU, W. et al. Bioactive lactones and pyrrolidines from *Talaromyces assiutensis* isolated from mangrove sediment. *Marine Drugs*, v. 21, n. 12, p. 650, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/md21120650>.

ZHU, W. et al. New antibacterial metabolites from the marine-derived fungus *Talaromyces minnesotensis*. *Marine Drugs*, v. 22, n. 1, p. 36, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/md22010036>.

ZHU, X. et al. Integration of metabolomics and machine learning for the discovery of fungal natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 52, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad060>.

ZIEMBIŃSKA, A. et al. Molecular analysis of temporal changes of a bacterial community structure in activated sludge using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent in situ hybridization (FISH). *Polish Journal of Microbiology*, v. 56, n. 2, p. 119–127, 2007.