

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CCET - CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DQ - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Trabalho de Conclusão de Curso

# **Respostas Metabólicas de Fungos Filamentosos a Fatores Ambientais: Abordagem por Análises Metabolômicas**

**JOÃO PAULO DOS SANTOS SOARES**

SÃO CARLOS - SP  
2024

# Respostas Metabólicas de Fungos Filamentosos a Fatores Ambientais: Abordagem por Análises Metabolômicas

**JOÃO PAULO DOS SANTOS SOARES**

**Trabalho de conclusão de curso  
apresentada ao Departamento de  
Química da Universidade Federal  
de São Carlos, para obtenção do  
título de Bacharel em Química**

**Orientador(a): Edson Rodrigues  
Filho**

**SÃO CARLOS - SP  
2024**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 7/2025/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO DOS SANTOS SOARES

**METABOLISMO ADAPTATIVO EM FUNGOS FILAMENTOSOS: COMO CONDIÇÕES AMBIENTAIS  
MOLDAM O PERFIL DE METABÓLITOS BIOATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 11 de fevereiro de 2025

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Membro da Banca 1	Dra. Glenda Santos de Oliveira
Membro da Banca 2	Dra. Jéssica Cristina Amaral



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 14/02/2025, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1747154** e o código CRC **C5910800**.

---

**Referência:** Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1747154

*Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019*

## Agradecimentos:

Agradeço meus pais, Pedro Eugenio Soares e Wanderleia Alcantara Soares, que me apoiaram e incentivaram durante todo meu desenvolvimento acadêmico, sem mencionar o apoio nos demais períodos da minha vida. Também agradeço meu irmão, Lucas Soares, que tenho tantas boas memórias. Sou grato a minha irmã, Sophia Soares e seu marido Philippe Moraes que me auxiliaram na minha formação tanto pessoal quanto profissional.

Agradeço ao meu orientador de iniciação científica, Dr. Edson Rodrigues, que me ensinou e acompanhou em toda minha jornada científica, assim como aos professores, Dr. Tiago Venancio e Dr. Antônio G. Ferreira, que também me auxiliaram na jornada.

Agradeço a Dara Bertoli Azevedo que não somente me auxiliou na escrita desse trabalho mas, em muito momentos pessoais difíceis, possibilitando que fosse capaz de realizar esse trabalho.

Um agradecimento especial ao Dr. José Valentim Vicente por ter me inspirado desde criança a buscar conhecimento científico e ao Dr. Matheus Soares, meu irmão, que se mostrou como a prova viva do potencial dos estudos.

*“É preciso imaginar Sísifo feliz.”*  
(Albert Camus)

**Resumo:**

Este artigo de revisão tem como objetivo discutir os meios de adaptação metabólica de fungos filamentosos, assim como, seus produtos subsequentes e como fatores ambientais influenciam as vias metabólicas, analisado pelo método metabolômico.

Fungos filamentosos são importantes enfoques de estudo, dado sua importância como sintetizadores de bioativos, suas capacidades biorremediadoras e sua vasta aplicabilidade. Isso ocorre devido à ampla gama de metabólitos produzidos pelos fungos, tornando essencial compreender seu funcionamento e as vias metabólicas envolvidas.

Nesse contexto faz-se necessário compreender como fatores ambientais podem influenciar as rotas sintetizantes, para tal objetivo aplicou-se estudos metabolômica utilizando as técnicas analíticas de RMN e LC-MS/MS.

**Palavras chaves:** Fungos. Metabolômica. Biossíntese. Interações fúngicas.

**Abstract:**

This review article aims to discuss the metabolic adaptation mechanisms of filamentous fungi, as well as their subsequent products and how environmental factors influence metabolic pathways, analyzed through metabolomic methods.

Filamentous fungi are important subjects of study due to their significance as bioactive compound synthesizers, their bioremediation capabilities, and their broad applicability. This is due to the wide range of metabolites produced by fungi, making it essential to understand their functioning and the metabolic pathways involved.

In this context, it is necessary to understand how environmental factors can influence the biosynthetic pathways. To achieve this, metabolomic studies were applied using analytical techniques such as NMR and LC-MS/MS.

**Keywords:** Fungi. Metabolomics. Biosynthesis. Fungal interactions.

## Lista de figuras:

- Figura 01 - Características morfológicas das espécies *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*
- Figura 02 - Esquema das vantagens do trabalho conjunto das técnicas
- Figura 03 - Validação por GC/MS da produção de Ergosterol por *Penicillium roqueforti* em relação a variação de temperatura
- Figura 04 - Esquema de regulamentação metabólica de LaeA
- Figura 05 - Comparação entre variação nas concentrações de cobre e ferro
- Figura 06 - Esquema de regulação gênica ao pH ambiente
- Figura 07 - NMDS de metabólitos encontrados sobre influências diversas
- Figura 08 - Relação patogênica de fungos no tomate
- Figura 09 - Relação entre os microrganismos em 'qu' e variação de aminoácidos
- Figura 10 - Esquematização para obtenção de amostras e espectros
- Figura 11 - Esquematização da identificação de compostos por LC-MS
- Figura 12 - Divisão de compostos orgânicos com base nas técnicas de análise
- Figura 13 - Principais aplicações da RMN
- Figura 14 - Bioativos de fungos isolados e caracterizados

## **Lista de Tabelas:**

- Tabela 01 - Medicamentos e fármacos produzidos por fungos
- Tabela 02 - Proteínas e metabólitos associados à adaptação fúngica ao calor
- Tabela 03 - Concentração de ferro e a formação de citrato
- Tabela 04 - Mecanismos de toxicidade e resistência de fungos filamentosos a metais
- Tabela 05 - Degradação de penicilina em diferentes temperaturas e pH
- Tabela 06 - Metabólitos oriundos da regulação de nitrogênio
- Tabela 07 - Efeitos dos aminoácidos em produção de esporos e produção de T-2 toxina
- Tabela 08 - Comparação entre os equipamentos analíticos utilizados para metabolômica

## Lista de siglas:

RMN	Ressonância magnética nuclear
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
OSMAC	'One strain many compounds'
HSPs	Proteínas de choque térmico
SLs	Esfingolipídios
ROS	Espécies reativas de oxigênio
HOG	'High osmolarity glycerol'
Yap1	'Yes associated protein 1'
Skn7	'Suppressor kinase null 7'
CWDEs	'Cell wall degrading enzymes'
HT	Degradação hidrotérmica
AMD	Drenagem ácida de mina
PCA	Análise de componentes principais
PLS-DA	Análise discriminante dos quadrados mínimos parciais
GC-MS	Cromatografia à gas acoplada à espectrometria de massas

## Sumário:

Resumo: .....	5
Abstract: .....	6
Lista de siglas: .....	9
1 - Introdução .....	11
1.1 - Fungos filamentosos: O que são e por que estudar .....	11
1.2 - Influências de condicionamento: Principais influentes .....	16
1.3 - Metabolômica: Como analisar e avaliar metabólitos .....	19
2 - Principais influências das condições ambientais .....	21
2.1 - Influência da temperatura no metabolismo .....	21
2.2 - Influência de sais metálicos no metabolismo .....	25
2.3 - Influência do pH no perfil metabólico .....	30
2.4 - Influência de aminoácidos no metabolismo .....	36
3 - Metabolômica aplicada ao estudo de fungos .....	42
3.1 - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas .....	42
3.2 - Ressonância magnética nuclear na metabolômica .....	48
3.3 - Perspectivas futuras .....	52
Integração dos dados ômicos e técnicas analíticas .....	52
Avanço dos métodos de processamento de bio-dados .....	52
Avanços biotecnológicos .....	53
Avanços ecológicos .....	53
4 - Conclusão .....	55
5 - Referências .....	56

## 1 - Introdução

### 1.1 - Fungos filamentosos: O que são e por que estudar

Fungos filamentosos são organismos multicelulares diversos e com altas capacidades adaptativas, sendo essenciais para os ecossistemas. Eles se caracterizam pela presença de estruturas alongadas chamadas hifas, que formam uma extensa rede de filamentos.<sup>1</sup> Essa morfologia permite uma grande diversidade funcional, aumentando a área de superfície do espécime, facilitando a exploração do ambiente e a liberação de enzimas para a decomposição da matéria orgânica, tornando esses organismos fundamentais em processos ecológicos e industriais.<sup>2</sup>

Sua versatilidade é evidente em setores como agricultura, indústria, e em aplicações farmacológicas e medicinais. Estudos modernos demonstram todos esses aspectos, evidenciando a responsabilidade dos fungos por uma série de processos vitais para a sociedade contemporânea, como a síntese de fármacos, a biodegradação de compostos, a biorremediação de ambientes, a produção de biofertilizantes e na nitrogenação do solo.<sup>1</sup> No entanto, ainda existem alguns desafios a serem estudados, como a possível geração de metabólitos tóxicos para plantas, humanos e o ambiente. Apesar disso, ainda há uma perspectiva de que os avanços científicos possam minimizar essas problemáticas.<sup>1</sup>

O crescente interesse por estudos relacionados à aplicação de fungos justifica-se pela sua capacidade destes em sintetizar antibióticos, imunossuppressores, enzimas farmacológicas, biocombustíveis, alimentos fermentados, entre outros produtos.<sup>2</sup> Essas pesquisas são benéficas para a ecologia, uma vez que, ao contrário dos métodos convencionais de síntese desses produtos, que exigem o uso intensivo de reagentes, solventes e catalisadores, os processos fúngicos oferecem uma alternativa dentro dos princípios da química verde. Para mais, ecologicamente os fungos representam parte vital na decomposição e bom condicionamento do solo, contribuindo com sua qualidade nutricional.<sup>3</sup>

Realizando todas essas aplicações, os fungos possuem um grande valor econômico, que torna o investimento nas pesquisas muito favorável. Como descrito na tabela 1, que apresenta o valor de mercado de alguns produtos naturais correlacionados, todos com elevados valores de mercado agregado. Ao longo dos

anos mais produtos fúngicos foram sendo incorporados no mercado e a perspectiva é uma valorização da área de estudo.<sup>2</sup>

Levando em consideração suas aplicações na agricultura, é possível observar diversas vantagens no uso do fungo *Trichoderma* no agronegócio. Quando aplicado de forma controlada nas plantações, ele compete por nutrientes com outros microrganismos, atuando como um biocontrole de pragas. Além disso, contribui para a melhoria da qualidade do solo, fornecendo nutrientes e auxiliando na imunidade das plantas. Contudo, ainda são realizados estudos para o aprimoramento genético da espécie para aumentar sua eficiência e reduzir os riscos de bioprodutos indesejados.<sup>3</sup>

A agricultura tem lidado com fungos ao longo de toda sua história. Estudos sobre as *Aspergillus*, por exemplo, mostram o lado problemático desse gênero de fungos em plantações, onde estes são responsáveis pela liberação de aflatoxinas, micotoxinas e outros contaminantes tóxicos para animais.<sup>4</sup> Algumas investigações sobre o cultivo destes e mostrou como os influentes como temperatura, umidade e local de armazenamento contribuem para tais substâncias serem geradas, além de indicarem que certos fatores no manejo dos produtos agrícolas devem ser rigorosamente monitorados e controlados para reduzir os riscos de contaminações fúngicas, prevenindo danos à saúde pública.<sup>4</sup>

O estudo dos fungos filamentosos, com ênfase em obtenção de produtos naturais específicos, chegou no âmbito industrial em prol de estudar formas que pudessem gerar uma otimização de produção, gerando o conceito de biofábrica de produtos.<sup>5</sup> Sobre esse tópico são abordadas as novas técnicas de engenharia metabólica, fazendo uso de técnicas de edição genética para controlar os produtos gerados em uma espécie do gênero *Penicillium*, reconhecido pela produção de penicilina, contudo, estudos demonstram que outros compostos produzidos possuem grandes potenciais fármacos não explorados.<sup>5</sup> Mesmo com as modificações genéticas, estudos adicionais foram realizados para determinar temperatura, pH e fontes de carbono ideais para produção.<sup>6</sup>

Muitos estudos recentes, buscam entender sobre a produção de produtos naturais, gerando diversos estudos sobre os mecanismos de produção e secreção de proteínas, enzimas e outros bioprodutos.<sup>7</sup> Enfatizam sobre enzimas, dando ênfase em enzimas industriais e bioativos utilizados em medicamentos e evidenciam as

limitações técnicas atuais na aplicação de cultivos em larga escala para a obtenção de bioativos. Além da necessidade de garantir a estabilidade dos compostos gerados, há desafios como o baixo rendimento e a possível geração de produtos tóxicos ou indesejados.<sup>7</sup>

A importância dos fungos também não está somente em seu serviço direto ao homem, eles desenvolvem grande papel ecológico, agem como decompositores, como bioremediadores, reguladores da fixação de nitrogênio no solo e estabelecendo relações mutualísticas em micorrizas, o que contribui diretamente para o desenvolvimento das plantas.<sup>8</sup>

Por fim, para melhor compreender todos esses fatores adaptativos dos fungos, incluindo suas relações ecológicas e respostas aos estímulos ambientais e meios de cultivo (temperatura, pH, umidade, etc.) são realizadas pesquisas sobre sua história evolutiva. Essas investigações utilizam sequenciamento genômico e análises filogenéticas para entender os processos evolutivos, melhorar a classificação das espécies e identificar, por meio de ferramentas de bioinformática, seus padrões adaptativos.<sup>9</sup> A figura 1, apresenta a distinção entre diferentes espécies de fungos observando suas características microscópicas, mostrando a morfologia diferente dos ascomas, ascósporos, que são estruturas reprodutoras responsáveis pela produção de esporos, a figura também apresenta as diferentes estruturas de hifas.<sup>10</sup>

O estudo aplicado de fungos tem sido desenvolvido, múltiplas áreas, gerando uma problemática no desenvolvimento de metodologias replicáveis, quantitativas, qualitativas e de análise, que auxiliam na descoberta de novos bioativos e na compreensão do funcionamento de vias metabólicas. Para resolver essa problemática desenvolveu-se os estudos analíticos ômicos: metabolômica, proteômica, lipidômica, transcriptômica, genômica, entre outros.<sup>10</sup>

Para cada tipo de análise ômica existem uma série de processos e métodos aplicáveis que podem assim mostrar como o potencial de trabalhar com um número elevado de dado amplia os potenciais de aplicação industriais e médicas. Com o auxílio das técnicas ômicas, diversas formas de estudar fungos podem ser realizadas permitindo a obtenção de resultados mais confiáveis e precisos.<sup>10</sup>

Em suma, fungos filamentosos têm sido e devem ser bastante estudados, suas múltiplas aplicações de forma industrial, alimentar, farmacêutica, biorremediadora, agro e mesmo todo seu valor econômico e ecológico, só demonstram o quanto a

humanidade ainda precisa aprender com esse reino biológico afim de obter um melhor um melhor sistema de aproveitamento deles.

**Tabela 1 - Medicamentos e fármacos produzidos por fungos**

<b>Categoria</b>	<b>Produtos</b>	<b>Fungos envolvidos</b>	<b>Valor de mercado (bilhões de USD)</b>	<b>Ano</b>
<b>Antibacterianos</b>	Penicilinas	<i>P. rubens</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. griseofulvum</i>	1,960	2022
	Cefalosporinas	<i>Acremonium</i> spp.	18,700	2022
	Ácido Fusídico	<i>Ramularia coccinea</i>	0,170	2021
	Pleuromutilina	<i>Clitopilus</i> spp.; <i>Basidiomycota</i>	0,267	2025
<b>Antimicóticos</b>	Equinocandinas	<i>Leotiomyces</i> , <i>Eurotiomyces</i>	0,510	2021
	Enfumafungina	<i>Hormonema</i> sp.	0,004	2022
	Griseofulvina	<i>Penicillium</i> spp.	(N/D)	-
<b>Medicamentos cardiovasculares</b>	Estatinas	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>Penicillium citrinum</i>	14,300	2021
<b>Agentes imunossupressores</b>	Ciclosporina	<i>Tolyposcladium inflatum</i>	1,990	2021
	Fingolimode	<i>Melanocarpus albomyces</i>	3,340	2018
	Ácido Micofenólico	<i>Penicillium stoloniferum</i> e espécies relacionadas de <i>Penicillium</i>	1,581	-
	Mizoribina	<i>P. brefeldianum</i>	(N/D)	-
<b>Nematicidas</b>	Emodepsida	<i>Rosellinia</i> spp.	(N/D)	-
<b>Medicinas Tradicionais Chinesas</b>	Cordyceps	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>C. guangdongensis</i>	1,500	2004
	Ganoderma	<i>Ganoderma</i> spp., principalmente <i>G. lingzhi</i>	3,100	2019

Fonte: ADAPTADO - (Niego, A.G.T., Lambert, C., Mortimer, P. *et al.* The contribution of fungi to the global economy. 2023)

**Figura 1 - Características morfológicas dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces***

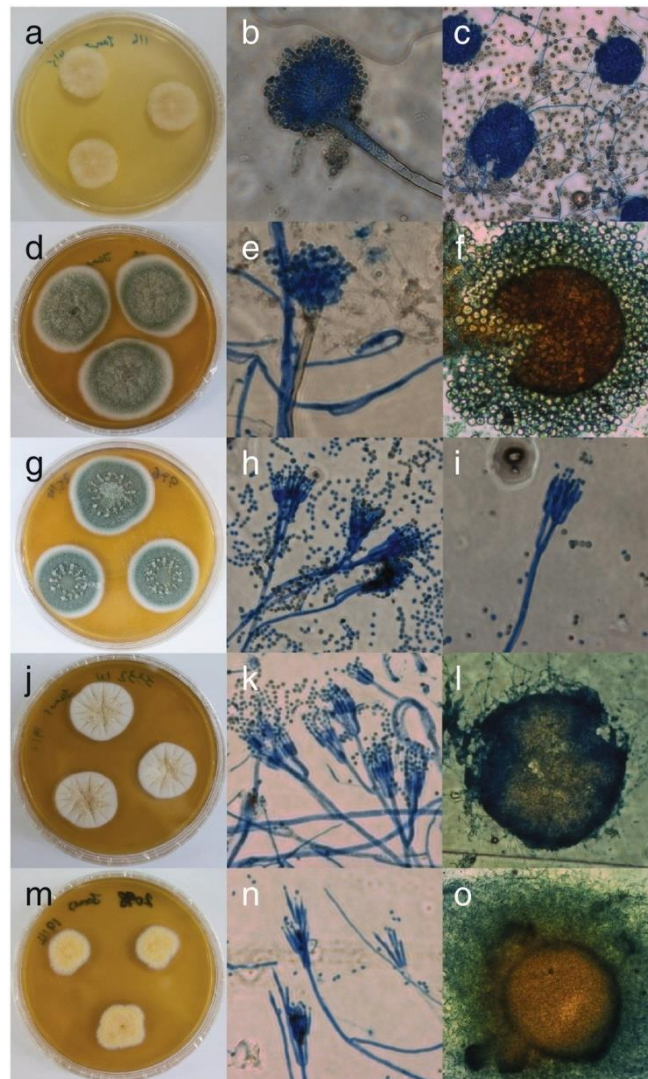
***A. glaucus* NRRL 116T:** (a) Morfologia da colônia após 7 dias de incubação; (b) Hifas (ampliação 400×) e (c) ascomas (ampliação 200×).

***A. nidulans* NRRL 187T:** (d) Morfologia da colônia após 7 dias de incubação; (e) Hifas (ampliação 400×) e (f) um ascocarpo (ampliação 100×).

***P. expansum* NRRL 976T:** (g) Morfologia da colônia após 7 dias de incubação e (h e i) hifas (ampliação 400×).

***P. kewense* NRRL 3332T:** (j) Morfologia da colônia após 7 dias de incubação; (k) Hifas (ampliação 400×) e (l) um ascocarpo (ampliação 100×).

***T. flavus* NRRL 2098T:** (m) Morfologia da colônia após 7 dias de incubação; (n) Hifas (ampliação 400×) e (o) um ascocarpo (ampliação 100×).



Fonte: (Chi-Ching Tsang, Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present and future, Computational and Structural Biotechnology 2018)

## 1.2 - Influências de condicionamento: Principais influentes

Os seres vivos são influenciados pelo meio em que se desenvolvem e sobrevivem, o que pode ser justificado por fatores como fontes de alimentação, tempo de exposição solar, umidade relativa do ar, entre outros aspectos. Entre os seres vivos, os microrganismos tendem a ser os mais sensíveis às alterações ambientais, o que se reflete na variação de seus bioprodutos, determinando quais e quantas substâncias serão produzidas. Esse fenômeno pode ser explicado pelo caráter evolutivo adaptativo desses organismos.<sup>11</sup>

Estudos demonstram que a variação de alguns parâmetros tem grandes impactos na produção de bioativos, tais como pH, disponibilidade de nutrientes no ambiente, temperatura e presença de sais metálicos. Estudos ômicos auxiliam na definição e direcionamento dos melhores parâmetros a serem utilizados para otimizar a produção de compostos, seja em contextos industriais, fármacos ou ecológicos.<sup>11</sup>

Cada parâmetro deve ser estudado separadamente dos demais, mas deve ser observado levando em consideração os demais parâmetros. Isso é possível pela prática de algumas metodologias, como a OSMAC, ‘One Strain Many Compounds’ em tradução livre, “Uma cepa, múltiplos compostos”, na qual se estabelece uma padronização dos parâmetros e variação única de um deles, permitindo estudos para parâmetros específicos.<sup>12</sup>

O primeiro parâmetro a ser bem estudado e levado em consideração na hora de realizar um cultivo é a temperatura. A taxa metabólica apresenta-se muito sensível à variação de temperatura, resultando numa interferência na adaptabilidade e tolerância ao meio.<sup>13</sup> Alguns estudos especializados em estudar esse parâmetro, focam em apresentar como uma otimização na temperatura de cultivo pode acelerar o crescimento e aumentar a produção dos metabólitos desejados.<sup>14</sup> Outros trabalhos interessantes no assunto buscam entender melhor como os fungos lidar com a variação de temperatura, numa perspectiva de compreender os mecanismos que os levam resistirem às elevadas temperaturas. É relevante ter uma compreensão dos mecanismos envolvidos, permitindo o estudo de inibições de rotas metabólicas/biossintéticas facilitando a erradicação de patógenos resistentes, por exemplo.<sup>15</sup> A tabela 2, apresenta alguns desses exemplos de

substâncias produzidas por fungos para lidar com os efeitos da temperatura e o papel na resposta ao estresse térmico. <sup>15</sup>

Estudos também apontam como outro parâmetro de extrema relevância, a variação do pH.<sup>16</sup> O pH varia com diversas coisas do ambiente, como, presença de sais no meio, oxigenação, presença de outros microrganismos, presença de matéria orgânica a ser decomposta, entre outros.<sup>17</sup> A influência de parâmetro é tão direta, que sua influência altera a capacidade do organismo de lidar com outros parâmetros, uma vez que o stress gerado pelo pH auxilia na manutenção metabólica.<sup>18;19;20</sup> Os estudos sobre os efeitos do pH, também observam como os fungos fazem a regulação do pH intra e extracelular, comportamento vital para sobrevivência do espécime.<sup>17</sup>

Diversos trabalhos reportados na literatura tem mostrado o efeito direto na relação entre o pH e a presença de sais metálicos,<sup>19</sup> como a presença de sais podem influenciar diretamente as vias das ATPases, que são as reguladoras de pH intracelular dos fungos, o que está diretamente correlacionado com a sobrevivência do ser vivo.<sup>21;17</sup> Mesmo com essa influência, pode se realizar estudos levando em consideração a variação única da presença de metais, alguns trabalhos levam em consideração que metais trabalham como agentes reguladores em inúmeras rotas metabólicas fúngicas portanto, alguns trabalhos estudaram como a presença , ausência ou larga quantidade de metais agem nessas regulações.<sup>22;23;24</sup>

O último parâmetro de grande relevância e certa notoriedade nos trabalhos publicados sobre fungos é a presença de aminoácidos. Aminoácidos, são reguladores metabólicos que assim como metais influenciam diretamente algumas rotas de síntese,<sup>25</sup> além de também serem responsáveis pela velocidade de desenvolvimento do fungo e comportamento como esporulação.<sup>26</sup> Alguns trabalhos já levam em consideração que para otimização de cultivos fúngicos em prol industrial é necessário levar em consideração e regulamentar a presença de aminoácidos em largas escalas.<sup>16;27</sup>

Em suma, cada parâmetro tem sua forma de influenciar as rotas metabólicas, regulamentar na produção de bioativos, assim como estabelecer a sobrevivência do ser vivo. Ainda é necessário realizar vários estudos para utilizá-los e aplicar com maior segurança e rentabilidade, no cultivo fúngico em escala industrial.

**Tabela 2 - Proteínas e metabólitos associados à adaptação fúngica ao calor**

Proteínas ou Metabólitos	Espécies de Fungos	Papel na Resposta ao Estresse Térmico
Lre1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aumenta o acúmulo de trealose, resistência ao calor e regula a expressão de genes ciclina
Grx3/Grx4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Grx4 é necessário para integridade da membrana e parede celular
BbThm1	<i>Beauveria bassiana</i>	Atua como fator de transcrição para integridade térmica e da membrana
CgSTE11	<i>Candida glabrata</i>	Intermede as interações entre vias de sinalização MAPK em resposta a desafios ambientais
Superóxido dismutase	A maioria dos fungos	Converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, respondendo ao estresse oxidativo
Catalase	A maioria dos fungos	Atua como antioxidante, chaperona molecular e regulador de transdução de sinais
Peroxirredoxina	A maioria dos fungos	Funciona como chaperona molecular e regulador de transdução de sinais
Ct1	<i>C. neoformans</i>	Substrato de calcineurina durante respostas ao estresse térmico
Cyr1 e PKA	<i>Candida auris</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i>	Promovem o crescimento de <i>C. auris</i> e aumentam a resistência ao estresse térmico e a drogas antifúngicas
Piruvato	<i>A. fumigatus</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reduz a carbonilação de proteínas, estabiliza o potencial de membrana mitocondrial e promove o crescimento fúngico
Glutationa	A maioria dos fungos	Protege o DNA mitocondrial contra danos oxidativos
Trealose	A maioria dos fungos	Atua como estabilizador de proteínas e promove a sobrevivência em condições extremas de calor

Fonte: ADAPTADO - (Response and regulatory mechanisms of heat resistance in pathogenic fungi, 2022)

### 1.3 - Metabolômica: Como analisar e avaliar metabólitos

Metabolômica é um conjunto de estudos que abordam os produtos e subprodutos de rotas metabólicas em seres vivos, permitindo uma compreensão aprofundada de seus processos biológicos.<sup>28</sup> Técnicas de metabolômica têm sido incorporadas a tempos no estudo de fungos filamentosos em prol de melhor compreendermos como eles produzem produtos/substâncias desejadas(os) e como é possível otimizar essas produções.<sup>28</sup>

Metabolômica é uma das técnicas analíticas envolvida nos estudos ômicos, que são os estudos responsáveis por integrar as relações entre os genes, proteínas e metabólitos, onde metabolômica em si, cobre a parte dos estudos referentes aos metabólitos. De todo modo, é uma técnica que reúne os conceitos multi-ômicos com auxílio de dados de bioinformática, criando uma abordagem que permite observar a ampla diversidade metabólica de um único espécime.<sup>28</sup>

Existem múltiplas formas de abordar e estudar metabolômica, contudo a mais usual e direta forma é com uso de espectrometria de massas acoplada técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC-MS/MS) ou mesmo com cromatografia gasosa (CG-MS/MS). Ambas são técnicas sensíveis e permitem a quantificação e identificação dos metabólitos.<sup>29</sup> Estudos direcionados a localização e identificação de biomarcadores depois de realizar bio-estímulos utilizam a espectrometria de massas como um instrumento chave de pesquisa por sua capacidade de lidar com grandes quantidades de informações e alta sensibilidade.<sup>30</sup>

Existe razões pelas quais ao iniciar um estudo metabolômico levamos em consideração o equipamento cromatográfico que será utilizado, UHPLC ou CG, isso se deve às diferentes características dos metabólitos a serem estudados, contudo, as informações de ambos os equipamentos em um mesmo estudo servem de trabalhos complementares.<sup>31</sup>

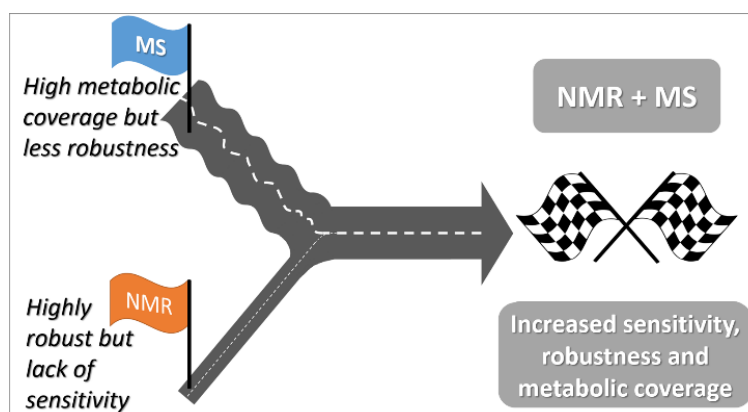
Outro equipamento que tem ganhado destaque nos estudos metabolômicos é o equipamento de ressonância magnética (RMN), que é um método não destrutivo que apresenta alta reprodutibilidade e tem serventia direta em estudos quantitativos e qualitativos, permitindo elucidação de compostos em misturas complexas.<sup>32</sup> Além disso existe uma outra vantagem na utilização dessa técnica, facilita alguns estudos sobre as dinâmicas moleculares com o uso de marcadores isotópicos, que permite rastrear as origens bio-sintéticas de alguns compostos.<sup>33</sup>

Existem trabalhos voltados a unificar a conversa, realizando a metabolômica com LC-MS/MS e RMN, uma técnica eficaz em estudar grandes conjuntos de informações e outro eficaz na caracterização estrutural de compostos, enriquecendo o estudo.<sup>34</sup>

A figura 2 representa as principais vantagens do uso conjunto das técnicas apresentadas de forma conjunta, no qual apresenta e descreve que as técnicas de espectrometria de massas possuem alta cobertura de metabólica, que significa grande banco de dados comparativos e alta sensibilidade contudo são menos robustas, que significa menor confiabilidade de caracterização, maior taxa de erro e quando comparamos com as anotações da figura sobre o RMN, como uma técnica robusta porém com baixa sensibilidade. Por fim, a figura conclui que o uso conjunto das técnicas permite alta sensibilidade, robustez e ampla cobertura metabólica.<sup>34</sup>

Em suma, o estudo de metabolômica é muito amplo, permitindo não só investigar quais metabólitos são produzidos, mas como são produzidos. E as principais técnicas de análise são amplas, com cada equipamento tendo seus pontos fortes e fracos, permitindo assim estudos variados para todo tipo de objetivo na pesquisa.

**Figura 2 - Esquema das vantagens do trabalho conjunto das técnicas**



Fonte: (Marine P. M. Letertre, Gaud Dervilly, and Patrick Giraudeau, Combined Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry Approaches for Metabolomics, 2021)

## 2 - Principais influências das condições ambientais

### 2.1 - Influência da temperatura no metabolismo

Em nosso cotidiano os principais produtos consumidos com auxílio microbiano são pães, bolos, cerveja e vinhos. Todos esses se baseiam na fermentação, geralmente oriunda de leveduras, que são fungos unicelulares consideravelmente mais simples que fungos filamentosos. Mesmo assim, é evidente as diferenças que podemos observar mudando a temperatura ambiente na fabricação dos fermentados tais como: diferenças táteis, como densidade das massas, quantidade de álcool nas bebidas e mesmo o sabor delas, por isso todos esses processos envolvem estudos sobre as influências térmicas no metabolismo.<sup>35</sup> Se podemos observar o impacto em leveduras, podemos esperar observar impactos muito maiores em filamentosos, uma vez que são seres multicelulares complexos.

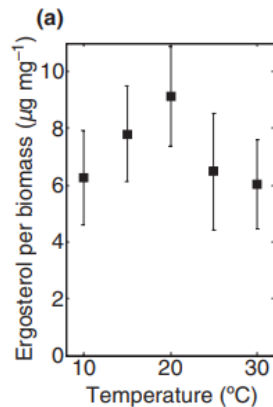
Em fungos filamentosos, um dos bioativos mais conhecidos e produzidos em âmbito de fármacos é a penicilina, produzida por membros do gênero *Penicillium*, que são estudados pelo alto potencial de produzir fármacos.<sup>14</sup> Ao longo de inúmeros estudos sobre a interferência da temperatura no cultivo desses fungos, explorou-se a temperatura ideal para que fosse cultivado, em prol de uma maximização de produção de penicilina.

Nesses estudos tanto temperaturas mais baixas quanto mais elevadas, quando comparadas à temperatura ideal, apresentam um desenvolvimento metabólico letárgico.<sup>36</sup> Outra diferença notável foi na eficiência metabólica, na qual fungos fora das condições ideais realizam sínteses indesejadas, voltadas ao desenvolvimento dos metabólitos primários, reduzindo a eficiência industrial desejada.<sup>14</sup>

Para melhor visualizar isso, a figura 3 descreve a variação na concentração de ergosterol no cultivo de um fungo *Penicillium* em diferentes temperaturas. A figura apresenta resultados obtidos na investigação do efeito da temperatura no desenvolvimento de *Penicillium roqueforti* cultivado em ágar de extrato de malte. O estudo monitorou o conteúdo de ergosterol, por GC/MS, e da biomassa em distintas temperaturas (10, 15, 20, 25 e 30°C).<sup>14</sup> Os resultados indicaram que, embora a maior taxa de desenvolvimento de biomassa tenha ocorrido a 25°C, a eficiência de conversão de carbono do substrato foi maior a 20°C. Assim, a

temperatura que favoreceu o crescimento mais rápido não foi a mesma que resultou na maior eficiência de crescimento.<sup>14</sup>

**Figura 3 - Valiação por GC/MS da produção de Ergosterol por *Penicillium roqueforti* em relação a variação de temperatura**



Fonte: ADAPTADO (Li Y, Wadsö L, Larsson L. Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti*--correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. J Appl Microbiol. 2009)

Entre fungos filamentosos, existem os termófilos, fungos capazes de suportar temperaturas elevadas, compreendê-los melhor permite determinar quais os principais meios de defesa e resposta a tais condições extremas que os tornam capazes de sobreviver.<sup>37</sup> Uma resposta, alcançada por proteômica, indica a produção de proteínas de choque térmico (HSPs), como principal modo de regulação térmica, auxiliando o desdobramento e reparo de proteínas. O impacto da temperatura também é significativo na regulação energética, onde existe uma demanda energética elevada para regular o stress sofrido. Isso gera uma regulação nas atividades enzimáticas do ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons para ocorrer uma compensação energética.<sup>37</sup>

Outra resposta ao condicionamento térmico evidente é a composição da membrana plasmática das células, que se altera majoritariamente pela variação dos esfingolipídios (SLs) e das ceramidas. Os SLs são responsáveis por diversos fatores celulares, como a fluidez e a estabilidade estrutural celular. Atuam como sinalizadores, levando a transformações e comportamentos como alteração no ciclo celular, tempo de esporulação, respostas autoimunes e apoptose.<sup>38</sup> Todos esses fatores se tornam essenciais para a sobrevivência do fungo nas condições extremas,

ou de alta variabilidade da temperatura, se mostrando como importantes aliados para uma compreensão dos efeitos do aquecimento global no mundo microbiano.<sup>38</sup>

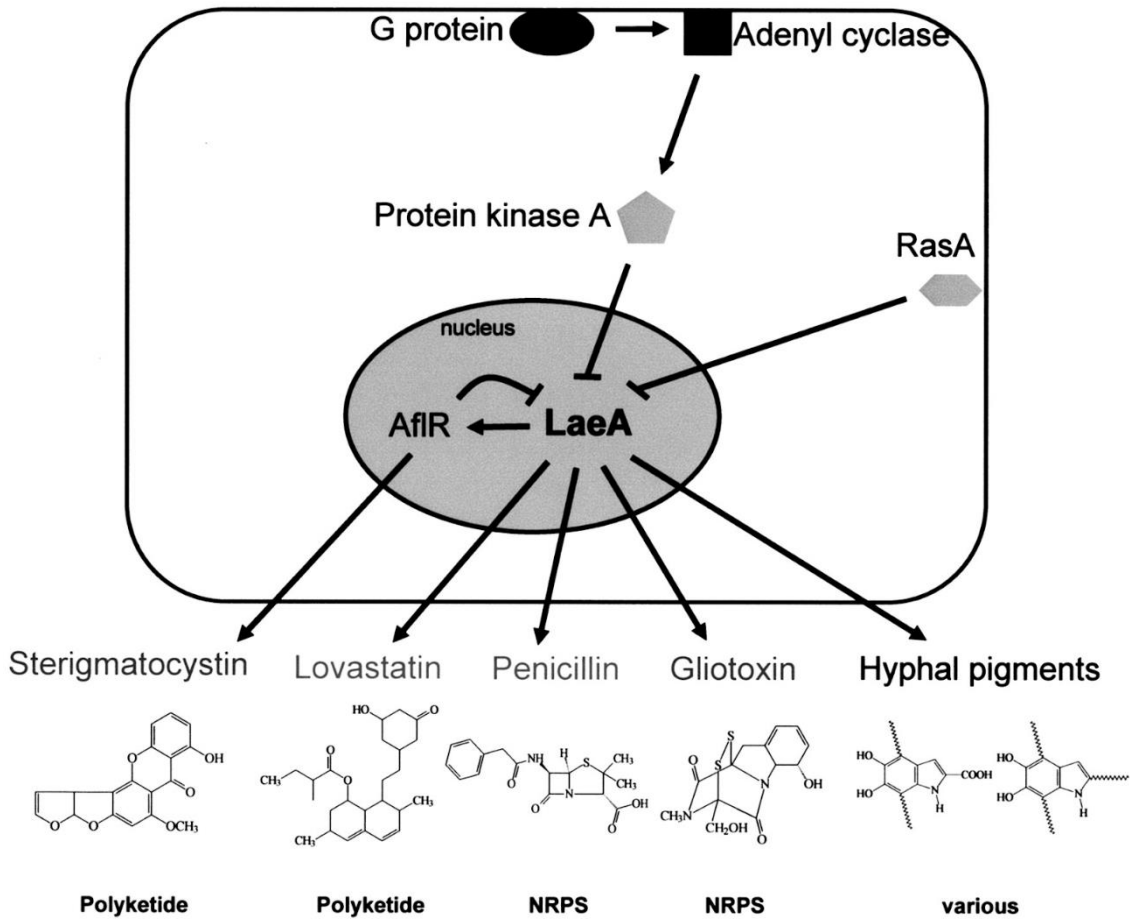
Se ocorrem diferenças grandes na proteômicas, espera-se que ocorram também diferenças na metabolômica, uma vez que a síntese dos metabólitos parte de proteínas, enzimas, para serem realizadas.<sup>39</sup> Alguns trabalhos sobre o metabolismo secundário revisam portanto o papel de regulação térmica em algumas proteínas de grande relevância para a síntese de metabólitos secundários.<sup>40</sup> As proteínas do complexo Velvet, por exemplo, demonstram uma faixa ideal de produção de metabólitos próximo a 30°C, fora desta faixa sua produção decai significativamente.<sup>41;42</sup>

A figura 4 apresenta um modelo que descreve como LaeA, uma proteína nuclear, regula o metabolismo secundário em fungos filamentosos, como *Aspergillus*.<sup>41</sup> LaeA é modulada por vias de sinalização que envolvem a proteína quinase A (PkaA) e a proteína RasA, que atuam como reguladores negativos. A expressão de LaeA, por sua vez, controla a produção de diversos metabólitos secundários, incluindo toxinas (esterigmatocistina e gliotoxina) e antibióticos (penicilina e lovastatina). Além disso, LaeA interage com o fator de transcrição AfIR, que regula negativamente sua expressão, formando um loop de retroalimentação. Esse modelo sugere que LaeA é um regulador global crucial para a produção de metabólitos secundários, atuando como um ponto de integração entre vias de sinalização e a expressão de clusters gênicos específicos.<sup>41</sup>

Outro fator importante sobre a influência da temperatura, são as relações da temperatura com os demais parâmetros, por exemplo, um estudo sobre solos contaminados demonstrou que a variação de temperatura permitiu ou não a existência de vida no ambiente. Realizando uma investigação de ambientes com drenagem ácida de mina (AMD) e verificando metabólitos presentes como biomarcadores para identificação dos gêneros fúngicos que vivem nos ambientes, demonstrou-se também que um dos fatores que possibilitou a sobrevivência do mesmo foi uma temperatura ideal, fora dessa temperatura a presença fúngica é reduzida.<sup>43</sup>

Em suma, a temperatura influencia não somente o metabolismo fúngico, influencia as chances de sobrevivência do indivíduo, a velocidade de desenvolvimento, sua esporulação, assim como suas relações com o meio.

Figura 4 - Esquema de regulamentação metabólica de LaeA



Fonte: (Bok JW, Keller NP 2004. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* 3)

## 2.2 - Influência de sais metálicos no metabolismo

Sendo um dos maiores grupos da tabela periódica, os metais, detém diversos representantes com propriedades diferentes entre si, e isso se reflete nas suas interações no ambiente bioquímico. Atuando em regulações enzimáticas, biossíntese de metabólitos e fazendo regulações para ambientes extremos, metais realizam inúmeras funções no desenvolvimento fúngico.<sup>24</sup>

Estudos com ênfase em compreender como metais comuns (zinco, ferro e cobre) atuam nos sistemas metabólicos, demonstraram seus papéis como reguladores da síntese de compostos bioativos, sideróforos e enzimas redox, também suas influências marcantes na pigmentação e formação de micotoxinas.<sup>24</sup> Sobre a regulação enzimática, metais atuam auxiliando nas enzimas presentes como lactases, peroxidases e outras associadas a decomposição de compostos complexos, nesses cenários, os metais atuam como cofatores enzimáticos.<sup>44</sup>

Mesmo que estes metais possam apresentar papéis metabólicos fundamentais deve ser levado em consideração um limite toxicológico dos mesmos, uma vez que em elevadas concentrações irão atrapalhar ou mesmo matar o espécime.<sup>21</sup> Cobre por sua vez gera um elevado estresse oxidativo no metabolismo fúngico em quantidades elevadas, contudo, estudos concluem que outros fatores podem auxiliar a resistência fúngica, como a presença de ferro e/ou aminoácidos no meio.<sup>21</sup> Podemos observar esse comportamento na figura 5, que apresenta como o fungo *Aspergillus* resistiu melhor à presença de cobre com a adição do ferro.<sup>21</sup>

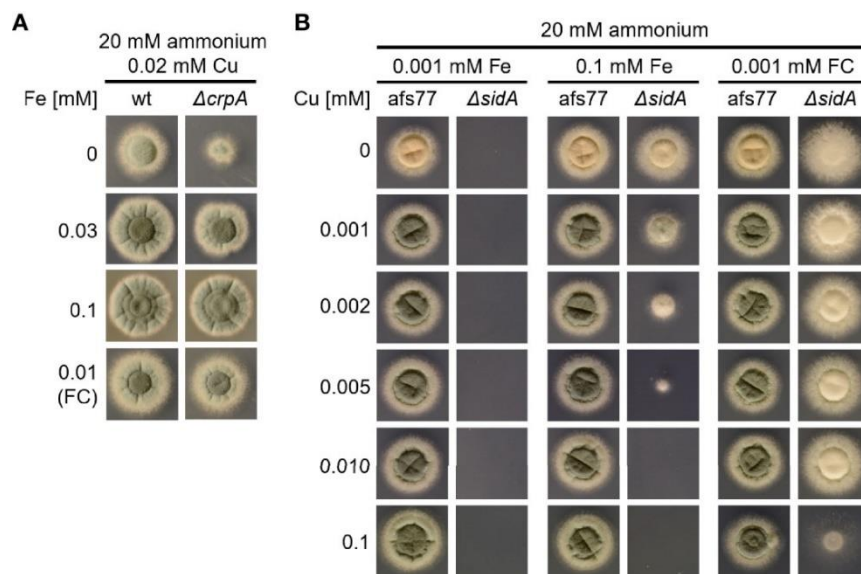
A figura 5.A, apresenta o desenvolvimento de duas cepas de um espécime de fungo lidando com concentração fixa de cobre e variada de ferro, as cepas em questão são a 'wt' (cepa selvagem sem alterações) e a '*Δcrpa*' (Cepa geneticamente modificada para apresentar maior sensibilidade ao cobre). Essa figura em questão trás como conclusão a influência da presença de ferro na tolerância toxicológica do fungo ao cobre, representando que a maior concentração de ferro auxilia na tolerância ao cobre.<sup>21</sup>

No caso, a figura 5.B, apresenta o desenvolvimento fúngico em concentração variadas de cobre e presença fixa de ferro: uma concentração considerada baixa de ferro, uma concentração alta e um complexo de ferro. As cepas utilizadas são '*Afs77*' (cepa selvagem) e '*ΔsifA*' (cepa com deficiência na produção de sideróforos). Muitas conclusões podem ser observadas na imagem, a princípio podemos descrever

como a falta de sideróforos limitou o desenvolvimento da cepa '*ΔsifA*', assim como a concentração alta de ferro auxiliou na resistência a toxicidade do cobre e por fim, o complexo de ferro provou-se como suplementação ideal para reduzir a toxicidade da presença de cobre. <sup>21</sup>

**Figura 5 - Comparação entre variação nas concentrações de cobre e ferro**

(A) Apresenta o desenvolvimento dos fungos numa concentração de cobre fixa com variação na concentração de ferro. (B) Apresenta quantidades fixas de ferro, lidando com variação nas quantidades de cobre



Fonte: ADAPTADO (Yap Annie , Talasz Heribert , Lindner Herbert , Würzner Reinhard , Haas Hubertus, Ambient Availability of Amino Acids, Proteins, and Iron Impacts Copper Resistance of *Aspergillus fumigatus*, 2022)

Muitos estudos apontam uma relação entre cátions metálicos e o estresse oxidativo. Isso ocorre devido ao desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os antioxidantes.<sup>45</sup> Alguns estudos sobre a influência da quantidade de glicose e/ou presença de ferro já se demonstram como ambos auxiliam no combate contra o estresse oxidativo, onde o ferro se mostra crucial para formação de sideróforos, que auxiliam a conter a alta quantidade de metais causadores do estresse oxidativo. Além disso, ferro também gera clusters Ferro-Enxofre responsáveis por responder ao estresse de uma baixa concentração de íons de ferro no meio.<sup>46</sup> A baixa concentração de ferro também gera estresse oxidativo, para lidar

com isso algumas espécies de fungos aumentam a liberação de citrato em prol de torná-lo biodisponível.<sup>47</sup>

A tabela 3, apresenta a biomassa (g/l) de diferentes cepas do fungo *Aspergillus*, cada cepa geneticamente modificada para limitar os produtos produzidos e liberados, como a NW186 cepa modificada para produzir exclusivamente citrato, a cepa NW305 produz oxalato e citrato e por fim, a cepa N402 que produz gluconato, oxalato e citrato.<sup>47</sup> A tabela também varia a concentração de ferro (-Fe, Sem ferro; +Fe, Concentração limitada; ++Fe, Concentração Abundante) e fonte de nitrogênio (NaNO<sub>3</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).<sup>47</sup> Como conclusão, a tabela 3 demonstra como a presença de ferro aumentou o desenvolvimento de biomassa de todas as cepas, assim como a cepa NW186 aumentou de forma significativa a biomassa produzida mesmo sem a produção de outros compostos orgânicos. Outra conclusão dada tabela é dada pelo melhor desenvolvimento observado pelas cepas em meio nitrogenado por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.<sup>47</sup>

**Tabela 3 - Concentração de ferro e a formação de citrato**

Cepa (principais ácidos orgânicos produzidos)	Fonte de N: NaNO <sub>3</sub>			Fonte de N: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
	- Fe	+ Fe	++ Fe	- Fe	+ Fe	++ Fe
N402 (gluconato, oxalato, citrato)	0.39	0.66	1.52	0.51	1.48	2.34
NW305 (oxalato, citrato)	0.97	1.08	1.73	0.91	1.97	3.45
NW186 (citrato)	1.09	1.58	1.84	0.89	2.17	3.39

Fonte: Adaptado (Odoni Doretta I. , van Gaal Merlijn P. , Schonewille Tom , Tamayo-Ramos Juan A. , Martins dos Santos Vitor A. P. , Suarez-Diez Maria , Schaap Peter J. *Aspergillus niger* Secretes Citrate to Increase Iron Bioavailability 2017)

Ainda sobre o estresse oxidativo, devemos pensar nos sinais que são gerados no fungo e quais suas relações com a presença dos metais. Fungos possuem algumas vias de regulação voltadas ao estresse oxidativo, dentre elas, as mais estudadas são, ‘High Osmolarity Glycerol’ (HOG), ‘yes associated protein 1’ (Yap1) e ‘supressor kinase null 7’ (Skn7).<sup>45</sup> As vias que atuam diretamente em resposta ao estresse oxidativo gerado pelos metais são a Yap1 e Skn7, responsáveis pela transcrição e expressão de genes antioxidantes.<sup>45</sup>

Compreendendo o modo operante de fungos a metais comuns e em larga concentração, podemos ter uma base melhor para entender o modo com os quais metais pesados interagem com o metabolismo. Fungos filamentosos têm sido alvo de estudos de remediação para lidar com ambientes contaminados.<sup>48</sup>

Isso se explica porque fungos possuem grande poder de homeostase e detoxificação por seus potenciais de produzirem enzimas redox e seus processos de biossorção capazes de capturar e transformar metais pesados.<sup>48</sup> Além disso, para lidar com metais pesados, fungos regulam de diferentes formas as atividades de transporte ativo, produção de sideróforos e bioacumulação.<sup>49</sup> A tabela 4 apresenta alguns mecanismos de resistência a metais dos fungos e quais danos os metais geram.

Os fungos do grupo *Basidiomycota*, por exemplo, são reconhecidos por sua alta capacidade degradativa usados para decompor lignina, substância que dificulta a fermentação de biodiesel de segunda geração. Esses se apresentam com elevada tolerância a presença de metais e estratégias enzimáticas capazes de conter, reduzir ou bioacumulá-los.<sup>50</sup>

**Tabela 4 - Mecanismos de toxicidade e resistência de fungos filamentosos a metais**

<b>Metal</b>	<b>Mecanismo de Toxicidade</b>	<b>Mecanismo de Resistência ao Metal</b>
<b>Zinco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento da deposição de quitina na parede celular, prevenindo a extensão das hifas</li> <li>- Aumento da ramificação das hifas e inchaço apical</li> <li>- Interrupção no desenvolvimento de conídios e conidióforos (interferência na reprodução)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Armazenamento de zinco em excesso em vacúolos e paredes celulares de esporos e hifas</li> <li>- Efluxo de zinco</li> <li>- Metalotioneínas de zinco</li> </ul>
<b>Cobre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Geração de espécies reativas de oxigênio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Up-regulação de <i>crpA</i></li> <li>- Aumento da produção de quelante oxalato de cobre</li> </ul>
<b>Ferro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incapacidade de adquirir ferro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desconhecido, mas pode estar associado à redução na biossíntese de sideróforos</li> </ul>
<b>Manganês</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potencialmente associado à redução da funcionalidade da peroxidase de manganês</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deleção do gene <i>PcPHO84</i></li> <li>- Expressão do gene <i>PcMNT</i></li> </ul>

Fonte: Adaptado (Robinson, J.R.; Isikhuemhen, O.S.; Anike, F.N. Fungal-Metal Interactions: A Review of Toxicity and Homeostasis. J. Fungi 2021)

Outra forma de biorremediação é a ação fúngica em rizosferas, essa interação fúngica permite que espécies de plantas possam sobreviver em ambientes hostis. O fungo em tal ambiente libera metabólitos que protegem as plantas dos metais pesados, entre outros contaminantes.<sup>43</sup>

De todo modo, metais pesados influenciam a compartimentalização celular assim como o tráfego molecular, em outras palavras, a presença de sais metálicos influencia na capacidade celular de organização das organelas, que desempenham funções no metabolismo secundário. Logo, outra forma de explicar a diferença metabólica apresentada pela presença de sais metálicos é a distinta atuação das organelas, influenciada pela variação no funcionamento das proteínas de transporte e no gradiente químico.<sup>51</sup>

Em suma, as possíveis interações entre fungos e metais ainda precisa de maiores pesquisas, contudo apresentam resultados claros sobre como uma aplicação otimizada dessa combinação gera uma otimização em produções metabólicas, possibilidade biorremediação, melhor proveito de enzimas e geração de novos bioativos a serem estudados e aplicados.

## 2.3 - Influência do pH no perfil metabólico

A variação no pH do ambiente modula o funcionamento celular pois influencia diretamente o comportamento das organelas celulares. Para lidar com isso, uma das regulações fúngicas para o funcionamento correto das organelas é o controle do pH intra e extracelular por meio de bombas de prótons ATPases, que regulam a entrada e saída de prótons pela membrana celular.<sup>17</sup>

A regulação do pH celular se mostra relevante para expressão gênica. Estudos sobre ajustes genéticos fúngicos relacionados a influência do pH ambiente, revelam que ocorre a liberação de enzimas e metabólitos correlacionados, gerando formação de novos metabólitos secundários.<sup>52</sup> Estudos apontam que a expressão genética influencia o comportamento de virulência, liberação de micotoxinas e enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs), a figura 6 representa isso para *A. nidulans*; *S. cerevisiae* e *C. albicans*.<sup>53</sup>

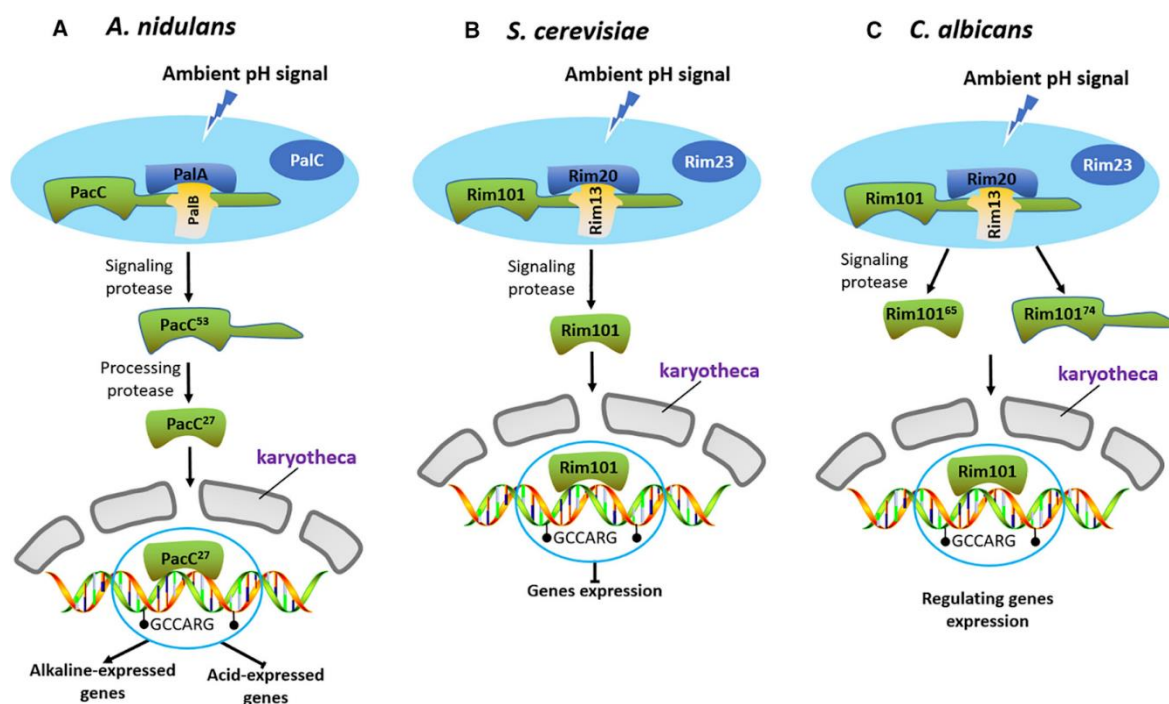
A figura 6 ilustra os diferentes modos de ação do fator de transcrição PacC em três espécies de fungos: *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Em *A. nidulans*, o PacC é clivado em duas etapas, resultando em uma forma ativa (PacC<sup>27</sup>) que se transloca para o núcleo e regula genes expressos em pH alcalino. Em *S. cerevisiae*, o homólogo Rim<sup>101</sup> é clivado em uma única etapa, atuando principalmente como um repressor. Já em *C. albicans*, o Rim<sup>101</sup> é processado em diferentes formas dependendo do pH, atuando tanto em condições ácidas quanto alcalinas.

Esse estudo só demonstra as diferentes formas de lidar e responder a estímulos e estresse gerado por influencia do pH no desenvolvimento fúngico, no qual podemos observar que o modo regulatório do PacC é geralmente conservado nos fungos, mas alterações específicas de espécie podem ocorrer.

Em adicional o controle extracelular sobre o pH, em uma ação conjunta com aminoácidos, influencia na liberação de enzimas responsáveis pela produção de peptidases, muito estudadas para degradação de proteínas para estudos biomédicos.<sup>54</sup>

## Figura 6 - Esquema de regulação gênica ao pH ambiente

Esquema de regulação gênica de alguns fungos ao estresse do pH. O esquema apresenta que como os fatores de transcrição de diferentes fungos, tornam o estímulo de pH em expressão genética



Fonte: (Li, B., Chen, Y. and Tian, S. (2022), Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi.)

Estudos sobre as influências no pH explicam suas influências no desenvolvimento de bebidas, como baijiu. Essa bebida é feita realizando uma fermentação por meio da aplicação de ‘qu’, um conjunto de microrganismos, incluindo fungo filamentosos, leveduras e bactérias, que ajudam a quebrar o amido e outras substâncias presentes nos grãos, transformando-os em açúcares fermentáveis e, posteriormente, em álcool.<sup>55</sup>

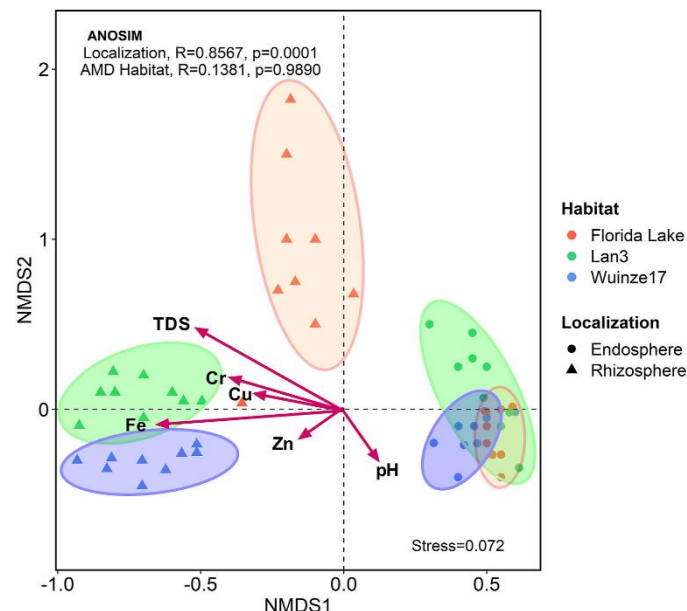
A produção dessa bebida utiliza um pH fixo e estudado pois, observou-se que a variação do pH alterava a composição do produto, explicada pela influência gerada nas relações e interações entre os microrganismos. Com o pH correto, os fungos filamentosos se desenvolviam de forma marcante na bebida, liberando maior quantidade de compostos aromáticos.<sup>55</sup> Levando em consideração que estudos já apresentam a influência do pH no metabolismo secundário atuando diretamente nas

vias de biossíntese de antibióticos, toxinas e aromáticos, é coeso concluir que a diferença no produto de baiju está diretamente relacionada com os metabólitos secundários.<sup>40</sup>

Outro aspecto sobre a influência do pH é sua relação direta com a resistência e capacidade adaptativa de fungos a condições diversas. Trabalhos envolvidos em biorremediação apontam como o pH em ambientes contaminados é relevante para a biodiversidade fúngica na remediação dos ambientes.<sup>43</sup> Variações extremas de pH permitem a sobrevivência de poucos espécimes, enquanto que em ambientes com o pH controlado podemos observar uma maior diversidade de indivíduos.<sup>43</sup>

A figura 7, apresenta um NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) que permite observar como o pH influencia os metabólitos observados. Neste exemplo, a inspeção dos dados mostrou que a variabilidade nos metabólitos primários foi mais significativa na rizosfera do que na endosfera radicular, com as amostras da rizosfera dos locais contaminados por AMD (Wuinze17 e Lan3) agrupando-se mais próximas entre si do que as do local não contaminado por AMD (Florida Lake). Há variabilidade significativa ocorrendo dentro da rizosfera, correlacionada às mudanças no pH, TDS, conteúdo de Fe, Cr, Cu e Zn.<sup>43</sup>

**Figura 7 - NMDS de metabólitos encontrados sobre influências diversas**



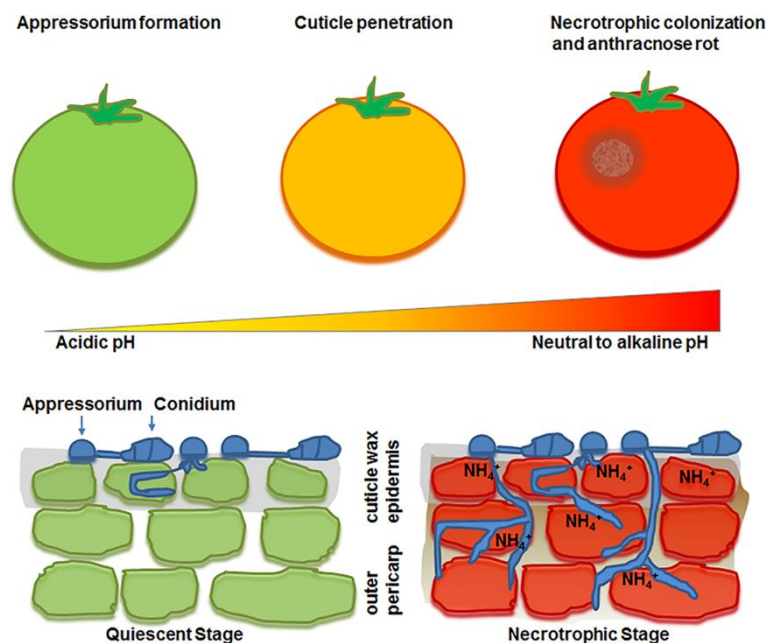
Fonte: (Kalu, Chimdi Mang et al. Fungal and metabolome diversity of the rhizosphere and endosphere of *Phragmites australis* in an AMD-polluted environment. 2021)

De todo modo, fungos endofíticos, que vivem em tecidos de plantas, são reconhecidos pelo seu forte potencial de ajuste de pH do ambiente, liberando metabólitos que ajudam na regulação do pH ou na resistência da planta que ele hospeda. Isso implica que seus estudos são relevantes para aplicações agrícolas, e possivelmente sobre aplicações bio-remediativas.<sup>56</sup>

A relação de fungos com hospedeiros nem sempre são relações mutualísticas, como os descritos anteriormente, um exemplo são os fungos patogênicos, responsáveis por causar doenças e infecções, tanto em animais quanto plantas.<sup>57;58</sup> Para melhor se condicionar dentro do hospedeiro, esses indivíduos conseguem moldar o pH do ambiente, liberando compostos de amônia e ácidos orgânicos, no intuito de manter o ambiente com um pH apropriado para sua maior esporulação.<sup>59</sup>

A figura 8, apresenta como o fungo patogênico, *Colletotrichum gloeosporioides*, faz a infecção no tomate, atuando no amadurecimento prematuro do tomate para facilitar sua futura penetração. Uma vez dentro do hospedeiro, o fungo modula o pH interno da fruta para agilizar o processo de necrose e esporulação do fungo.<sup>59</sup>

**Figura 8 - Relação patogênica de fungos no tomate**



Fonte: (Slavena Vylkova. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. 2017)

Estudos mostraram que algumas substâncias oriundas de fungos apresentam alta estabilidade e necessitam de condições extremas para serem degradáveis, por

exemplo, um pH mais ácido.<sup>20</sup> Dessa maneira a estabilidade de metabólitos está correlacionada ao pH do meio em que se encontra, logo, uma compreensão sobre os bioativos possibilita gerar ambientes favoráveis para preservar metabólitos desejados produzidos por microrganismos e degradar indesejados.<sup>20</sup>

Outra aplicabilidade do estudo dos efeitos do pH, descrevem sobre a estabilidade de alguns fármacos fúngicos, como a penicilina, que para serem descartadas de forma correta devem passar pelo processo de degradação hidrotérmica (HT), esse processo se baseia em temperatura e pressão para degradação de compostos orgânicos, gerando em seu resultado, produtos muito mais degradáveis, pouco nocivos, e/ou até favoráveis para o solo.<sup>20</sup>

Nesse contexto, a tabela 5 apresenta a velocidade de degradação da penicilina, que é produzida por diversos microrganismos, em diferentes temperaturas e diferentes pH. Observando a tabela podemos observar que existe uma forte influência da temperatura, contudo uma influência mais significativa do pH, que muito ácido ou muito básico.<sup>20</sup>

**Tabela 5 - Degradação de penicilina em diferentes temperaturas e pH**

pH	Temperatura (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	R2	Aproximação t1/2 (min)	Observado t1/2 (min)
pH = 4.	80	0.0514	0.9918	13.48	13.61
	90	0.0654	0.9942	10.59	10.14
	100	0.1603	0.9955	4.32	4.26
pH = 6	80	0.0032	0.9946	216.56	209.01
	90	0.0056	0.9975	123.75	131.92
	100	0.0127	0.9963	54.57	57.85
pH = 7	80	0.0008	0.9984	866.25	>240.00
	90	0.0012	0.9983	577.50	>240.00
	100	0.0039	0.9999	177.69	174.88
pH = 8	80	0.0032	0.9957	216.56	215.41
	90	0.0050	0.9952	138.60	127.74
	100	0.0126	0.9647	55.00	34.01
pH = 10	80	0.0169	0.9752	41.01	31.11
	90	0.0234	0.9713	29.62	20.21
	100	0.0485	0.9447	14.29	12.62

Fonte: (Zhang, Q.; Ren, J. Effects of pH and Metal Ions on the Hydrothermal Treatment of Penicillin: Kinetic, Pathway, and Antibacterial Activity. Int. J. Environ. Res. Public Health 2022,)

Para concluir, o pH é um fator envolvido em diversos processos e etapas metabólicas, sínteses enzimáticas, expressões gênicas e na biossíntese de metabólitos secundários como na estabilidade deles. A própria produção de penicilina, metabólito proveniente de fungo de maior histórico de uso humano, demonstrou a relevância do controle de pH na otimização de sua produção.<sup>60</sup> Mais estudos são necessários para compreender todas as rotas de influência desse parâmetro e todos os trabalhos fúngicos devem levar em consideração tal, no momento de realizar um cultivo de estudo ou industrial.

## 2.4 - Influência de aminoácidos no metabolismo

Aminoácidos são compostos nitrogenados orgânicos e atuam como fontes de nutrientes, na regulação de rotas metabólica e na construção de proteínas e enzimas.<sup>61</sup>

Para compreender a formação de aminoácidos, devemos entender como o nitrogênio é absorvido pelos organismos e é incorporado ao esqueleto de compostos orgânicos. O nitrogênio atmosférico,  $N_2$ , é convertido para uma versão biodisponível, como amônia, por meio de processos bacterianos, atmosféricos ou pelo processo industrial Haber-Bosch.<sup>61</sup> Com isso a nitrogenação do solo prossegue pela ação de decompositores microbianos, que irão reciclar todo nitrogênio presente no solo.<sup>61</sup>

Fungos filamentosos metabolizam o nitrogênio, de diferentes formas, dependendo do composto nitrogenado a ser decomposto ou processado. Seja na forma de aminoácidos, amônia ou nitrato, cada uma dessas fontes é metabolizada pelos fungos por vias distintas.<sup>61</sup> Dependendo da fonte de nitrogênio, o metabolismo fúngico muda, isso pode ser explicado pela forma de atuação regulatória do nitrogênio no complexo AreA, que libera e regula inúmeros metabólitos secundários.<sup>61</sup>

Podemos observar mais sobre a regulação gerada pelo complexo AreA (Activator of nitrogen regulatory genes A) pela tabela 6 que descreve os metabólitos secundários gerados por meio das regulações de nitrogênio em diferentes espécies de fungos.<sup>61</sup>

Quando é utilizado aminoácidos como fonte de nitrogenação, obtemos uma regulação gênica alterada levando a compostos diversos como micotoxinas, enzimas e outros bioativos.<sup>62</sup> Logo, podemos utilizar aminoácidos como suplementação e nesse caso a regulamentação gerada para cada aminoácido pode ser estudada separadamente. Por exemplo, uma pesquisa demonstrou a função regulatória da glutamina na produção de celulases, compostos enzimáticos responsáveis pela degradação de compostos orgânicos e com grande valor industrial.<sup>25</sup>

Outro trabalho no respeito a suplementação de aminoácidos revelou que suplementação com glutamina e arginina em fungos *Aspergillus* geram produção acentuada de peptidases com diversas aplicações industriais e farmacêuticas.<sup>54</sup>

Contudo, a aplicação desses compostos nitrogenados não se limita ao uso apenas como suplementos, também podem ser aplicados como antifúngicos.<sup>63</sup> Um trabalho sobre aplicação de aminoácidos em fungos fitopatogênicos mostrou que a aplicação de L-glutamina e ácido aspártico gera inibição na produção de patogênicos, a toxina T-2.<sup>63</sup>

A toxina T-2, que pertence a classe dos tricotecenos do tipo A, caracterizados pela presença de um anel epóxido, seu estudo inibitório é relevante pois, é uma das principais toxinas prejudiciais, em alimentos, ao ser humano e animais.

A tabela 7 demonstra a variação da produção de toxina T-2 e esporulação, para diferentes cepas do fungo *Fusarium oxysporum* em meios de cultivo com variação de cada aminoácido. As cepas utilizadas foram: Fo17 (cepa selvagem),  $\Delta$ FoTap42 (cepa com deleção do gene *Tap42*) e  $\Delta$ FoTap42-C (cepa complementada com o gene *Tap42*).<sup>63</sup>

Os dados da tabela 7 passaram também por avaliação estatística e agrupamento de variabilidade, ou seja, os dados agrupam com letras valores calculados como similares os distintos.<sup>63</sup>

Os resultados da tabela 7, mostram que a deleção do gene *Tap42* ( $\Delta$ FoTap42) reduz significativamente a produção de esporos e altera a síntese de T-2 em resposta a diferentes aminoácidos, enquanto a complementação do gene ( $\Delta$ FoTap42-C) restaura parcial ou totalmente esses efeitos, dependendo do aminoácido. Isso indica que o gene *Tap42* é crucial para a regulação do metabolismo de aminoácidos e para a patogenicidade de *F. oxysporum*.<sup>63</sup>

Contudo, fungos patogênicos demonstram a capacidade de promover mudanças metabólicas e regulatórias que permitem a utilização de aminoácidos como fontes de nitrogênio e carbono. Os fungos ajustam sua expressão gênica, transporte e metabolismo enzimático de acordo com a disponibilidade e o tipo de aminoácido presente no ambiente. Fungos patogênicos possuem métodos de detecção de aminoácidos em seus hospedeiros podendo assim otimizar seu processo de absorção nutricional, para isso utilizam receptores de membrana PTH11 e Hgt4.<sup>65</sup>

**Tabela 6 - Metabólitos oriundos da regulação de nitrogênio**

Metabólito Secundário	Fungo	Regulação por Nitrogênio	Reguladores de Nitrogênio Envolvidos
Aflatoxina	<i>A. parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Repressão por NO <sub>3</sub> , indução por NH <sub>4</sub>	AreA se liga ao promotor de AflR
Apicidina F	<i>F. fujikuroi</i>	Indução por nitrogênio	Independente de AreA; dependente de AreB
Beauvericina	<i>F. oxysporum</i>	Indução por nitrogênio	Dependente de AreA
Bikaverina	<i>F. fujikuroi</i>	Repressão por nitrogênio	AreA não é essencial; GS, MeaB, MepB e TOR envolvidos
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Repressão por nitrogênio	Dependente de AreA
Carotenoides	<i>F. fujikuroi</i>	Repressão por nitrogênio	Sem dados
Fumonisina	<i>F. verticillioides</i>	Repressão por nitrogênio	Dependente de AreA
Fumonisina	<i>F. proliferatum</i>	Repressão por nitrogênio	Regulado por estresse de fome de nitrogênio via HOG MAP quinase
Ácido Fusárico	<i>F. fujikuroi</i>	Indução por nitrogênio	Independente de AreA; dependente de AreB
Fusarielina H	<i>F. graminearum</i>	Repressão por nitrogênio	Dependente de AreA
Fusarina C	<i>F. fujikuroi</i>	Indução por nitrogênio	Independente de AreA e AreB; dependente de GS
Fusarubinas	<i>F. fujikuroi</i>	Repressão por nitrogênio	Sem dados
Giberelinas	<i>F. fujikuroi</i>	Repressão por nitrogênio	Dependente de AreA e AreB
Ácido Orselínico	<i>Aspergillus nidulans</i>	Induzido por fome de nitrogênio	Sem dados
Patulina	<i>P. urticae</i>	Repressão por nitrogênio	Sem dados
Penicilina	<i>P. chrysogenum</i>	Repressão por nitrogênio	Nre se liga ao promotor de ACV-IPN
Espiroantronas	<i>Aspergillus nidulans</i>	Induzidas por fome de nitrogênio	Sem dados
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus nidulans</i>	Repressão por NH <sub>4</sub> , indução por NO <sub>3</sub>	Sem dados
Tricotecenos	<i>F. graminearum</i>	Repressão por nitrogênio	Dependente de AreA
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>	Repressão por nitrogênio	Resultados contraditórios sobre dependência de AreA

Fonte: Adaptado (Tudzynski Bettina; Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi; 2014)

**Tabela 7 - Efeitos dos aminoácidos em produção de esporos e produção de T-2**

Grupo	Concentração de Esporos (10 <sup>5</sup> CFU/L)			Concentração de toxina T-2 (ng/mL)		
	Fo17	$\Delta$ FoTap42	$\Delta$ FoTap42-C	Fo17	$\Delta$ FoTap42	$\Delta$ FoTap42-C
Control	12.35 ± 1.32 c	3.51 ± 1.12 e*	8.24 ± 1.62 bc*	22.86 ± 3.54bc	30.82 ± 3.41 b*	20.69 ± 1.82bc
L-Ala	11.11 ± 2.25 c	3.31 ± 0.76 e*	7.61 ± 1.24 bc*	23.85 ± 4.34bc	20.73 ± 4.61 c	25.63 ± 4.41 b
L-Asp	6.52 ± 0.64 d	8.75 ± 3.83 de	4.25 ± 0.71 c	14.87 ± 2.94 c	6.68 ± 2.65 e*	14.43 ± 3.66 d
L-Arg	18.80 ± 1.35 b	6.25 ± 1.70 de*	12.50 ± 1.13ab	23.19 ± 4.01bc	24.32 ± 3.83 c	23.39 ± 3.64 b
L-Cys	7.50 ± 1.32 d	2.75 ± 1.11 e*	4.62 ± 0.92 c*	33.64 ± 1.41 a	22.23 ± 2.08 c*	28.21 ± 4.36ab
L-Glu	10.52 ± 2.10 c	14.80 ± 4.62 c*	6.75 ± 0.35 c*	12.64 ± 1.40 c	2.09 ± 1.61 e*	17.03 ± 5.27 c
Gly	5.56 ± 0.61 de	4.00 ± 1.23 de	5.64 ± 0.95 c	22.39 ± 0.36bc	19.43 ± 4.05 c	19.08 ± 2.03 c
L-His	11.59 ± 2.46 c	2.50 ± 0.64 e*	13.88 ± 1.66ab	23.67 ± 3.72bc	36.38 ± 0.64 a*	23.87 ± 4.08 b
L-Ile	18.30 ± 3.65 b	35.80 ± 4.87 a*	16.05 ± 1.45 a	28.49 ± 1.32ab	28.03 ± 5.46 b	26.15 ± 4.47ab
L-Leu	3.02 ± 0.57 e	1.25 ± 0.36 e*	4.25 ± 1.04 c	27.07 ± 2.25ab	11.22 ± 1.54 d*	26.81 ± 1.44ab
L-Lys	22.30 ± 3.55 a	14.85 ± 0.98 c*	16.32 ± 3.52 a*	21.51 ± 2.77bc	27.78 ± 1.39bc	18.71 ± 2.92 c
L-Met	17.20 ± 1.28 b	24.21 ± 1.16 b*	10.84 ± 2.69 b*	20.19 ± 1.54bc	29.25 ± 2.02 b*	19.43 ± 3.91 c
L-Phe	19.34 ± 13.35b	10.01 ± 2.06 d*	14.30 ± 0.98 a*	30.49 ± 1.54 a	30.84 ± 3.05 b	26.95 ± 2.98ab
L-Pro	18.05 ± 4.21 b	36.26 ± 4.53 a*	15.80 ± 3.36 a	30.95 ± 5.17 a	24.29 ± 5.37 c	34.78 ± 4.19 a
L-Ser	12.24 ± 2.17 c	2.56 ± 0.53 e*	14.32 ± 4.39 a	29.61 ± 2.97 a	22.02 ± 0.64 c	25.79 ± 4.33 b
L-Thr	4.01 ± 0.75 e	6.32 ± 1.27 de	5.11 ± 1.24 cd	25.96 ± 1.54 b	23.58 ± 1.36 c	24.85 ± 1.57 b
L-Try	7.25 ± 0.69 d	3.21 ± 0.28 e*	6.25 ± 0.35 c	25.75 ± 1.61 b	26.41 ± 2.62bc	26.56 ± 5.17ab
L-Tyr	14.30 ± 3.22 c	17.25 ± 3.54 c*	14.5 ± 2.12 a	25.26 ± 1.88 b	31.22 ± 4.92 b*	28.03 ± 1.68ab
L-Val	3.14 ± 0.53 e	5.25 ± 1.20 e	4.51 ± 1.31 d	25.54 ± 3.91 b	38.15 ± 0.64 a*	23.93 ± 3.02 b

Fonte: Adaptado (Deng, Y.; Wang, R.; Zhang, Y.; Li, J.; Gooneratne, R. Effect of Amino Acids on *Fusarium oxysporum* Growth and Pathogenicity Regulated by TORC1-Tap42 Gene and Related Interaction Protein Analysis. *Foods* 2023

Considerando a influência de aminoácidos na produção de micotoxinas e sobre esporulação, podemos concluir a importância de serem realizados estudos nas vias fúngicas biossintetizantes de aminoácidos reguladores. Compreender as rotas de síntese desses aminoácidos permite a geração de medicamentos antifúngicos que interferem na síntese de aminoácidos essenciais a partir das diferenças metabólicas encontradas entre fungo e o hospedeiro.<sup>66</sup>

A suplementação por aminoácidos em fungos já é aplicada na fermentação de bebidas. Cervejas, que são produzidas por leveduras, foram estudadas e testadas ao longo da história humana com várias abordagens, sendo já comprovado os efeitos da suplementação de diferentes aminoácidos ao sabor e textura da cerveja.<sup>67</sup>

Outra bebida baijiu, popular bebida fermentada chinesa sofre processo de fermentação por uma colônia de microrganismos em bloco, chamado 'qu'. Dentre esses microrganismos, são catalogados alguns fungos filamentosos descritos com a responsabilidade de realizar a sacarificação dos aminoácidos.<sup>55</sup> Estudos sobre a influência de aminoácidos em baijiu só demonstraram como a variação de aminos gera a produção de diferentes metabólitos compostos aromáticos como também levam a alteração significativa do sabor da bebida.<sup>55</sup>

O estudo sobre essa colônia de microbiana, 'qu', mostrou significativa mudança nos metabólitos finais da bebida. A fim de justificar isso investigou-se de forma separada os microrganismos responsáveis, a Figura 9 exibe quatro gráficos que mostram a correlação entre a variação metabólica observada e os microrganismos presentes, evidenciando as contribuições tanto de bactérias quanto de fungos.<sup>55</sup>

Em conclusão, a imagem apresenta que a mudança majoritariamente foi causada pelos fungos presentes no 'qu', além de demonstrar uma maior variação filogenética de fungos.<sup>55</sup>

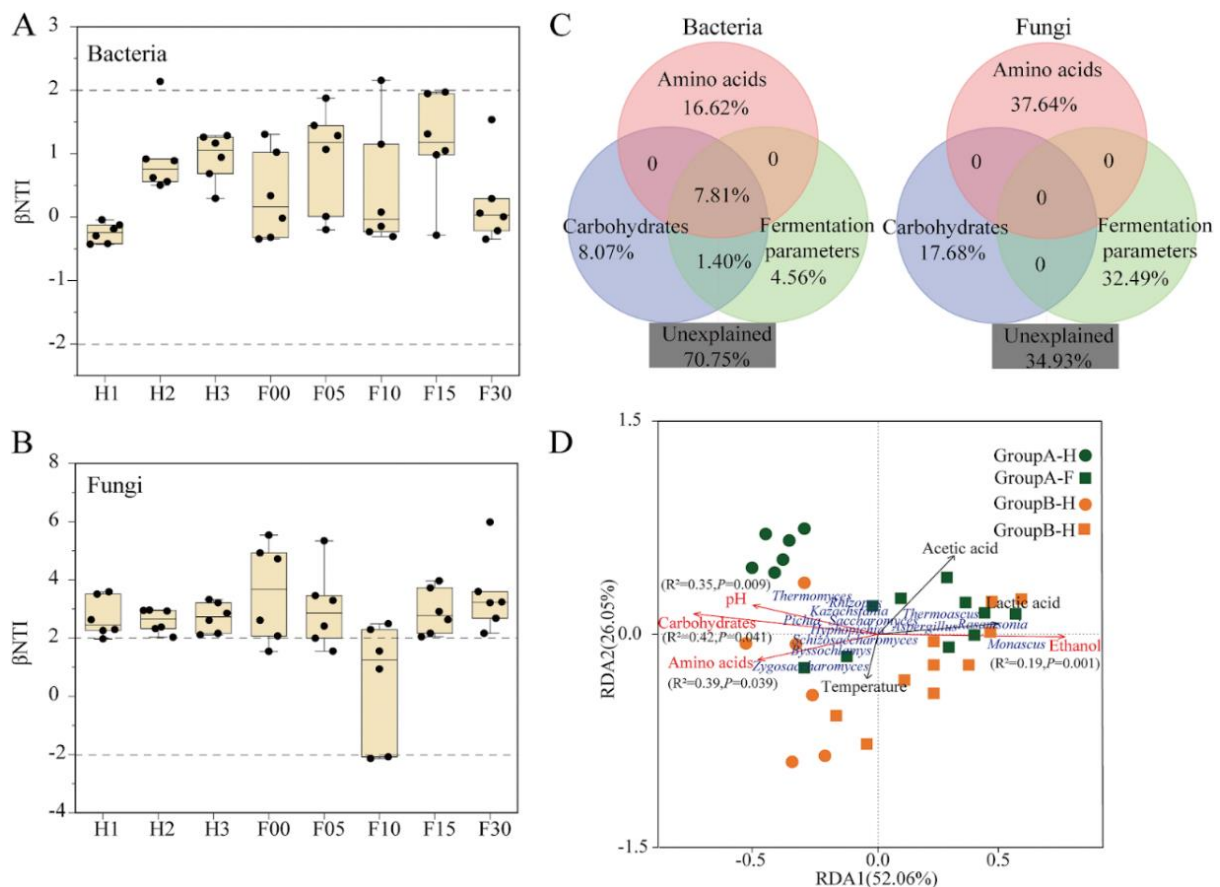
Outras abordagens sobre aminoácidos concluem sua responsabilidade na sobrevivência fúngica. Como caso análogo, temos os termófilos, que para lidarem com elevadas temperaturas necessitam de reguladores metabólicos (aminoácidos) para as vias de síntese responsáveis pela adaptação térmica, por exemplo a formação de HSPs.<sup>15</sup> Em adição, fungos termófilos sobre ambiente de estresse, dão preferência a aminoácidos hidrofóbicos carregados além de liberarem resíduos pequenos como alanina, glicina e valina.<sup>15</sup>

Outra característica marcante sobre a presença dos ácidos aminados é sua influência na capacidade rejuvenescente de fungos, interferindo na fase esporogênese, acelerando o processo de reprodução. A priori experimentos comprovaram que determinados aminoácidos em proporção ideal auxiliam fungos a regenerar linhagens degradadas, postergando o tempo de patogenicidade prolongando o desenvolvimento fúngico.<sup>26</sup>

Em suma, os aminoácidos desempenham papéis importantes além do papel na formação de proteínas. possuem funções de regulação metabólica, influenciam na tolerância e toxicidade do meio, assim como auxiliam na maximização produtiva de determinadas substâncias, como peptídeos e outros metabólitos com utilidades farmacêuticas, industriais ou na agroprodução.<sup>16</sup>

**Figura 9 - Relação entre os microrganismos em 'qu' e variação de aminoácidos**

A figura (A) bactéria e (B) fungo, representam um índice de turnover filogenético beta, em suma um índice de variação microbiana onde no eixo x apresenta tempos de cultivo e o modo de fermentação de baijiu H ou F. (C) Apresenta uma análise da partição de variação, que representa o quanto cada grupo determinado influência na diferença observada. (D) é uma análise de redundância, que indica como os grupos estão relacionados às mudanças avaliadas.



Fonte: (Wei J, Lu J,, Xu Y. 2023. Amino Acids Drive the Deterministic Assembly Process of Fungal Community and Affect the Flavor Metabolites in Baijiu Fermentation.)

### 3 - Metabolômica aplicada ao estudo de fungos

#### 3.1 - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Cromatografia é uma técnica de separação e análise de misturas complexas que se baseia na interação competitiva entre uma fase estacionária e uma fase móvel com os compostos analisados. Portanto a separação cromatográfica é promovida através das diferentes interações entre ambas as fases, gerando diferentes tempos de retenção entre os compostos durante o percurso cromatográfico.<sup>68</sup>

A espectrometria de massas geralmente trabalha em conjunto com a cromatografia, é um sistema de detecção que ioniza e fragmenta os compostos estudados. Existem diversos tipos de espectrômetros de massa, cada um com características específicas, oferecendo vantagens e desvantagens dependendo da aplicação.<sup>69</sup>

De todo modo, a metabolômica por LC-MS/MS baseia-se na aquisição e análises dos dados espectrais gerados, por meio de plataformas, softwares, algoritmos e programas para quantificar, identificar e caracterizar os compostos.<sup>70</sup> Por meio dos bancos de dados mais modernos é possível descrever e visualizar as possíveis rotas de formação metabólica que foram estimuladas e utilizadas pelo espécime em uma condição específica.<sup>70</sup>

Para apropriadamente iniciar a discussão sobre metabolômica por LC-MS devemos observar a tabela 8 a qual descreve diferentes equipamentos analíticos, suas vantagens e desvantagens na metabolômica, auxiliando assim, uma melhor a visualização das aplicabilidades assim como das compatibilidades das técnicas.<sup>70</sup>

Existem diferentes abordagem para se iniciar um estudo metabolômico, uma abordagem possível é a '*untargeted metabolomics*' que se baseia em estudos exploratórios, sem compostos, rotas metabólicas ou bioativos específicos como base investigativa.<sup>71</sup> Essa abordagem ampla serve em muitos estudos como um ponto inicial de descoberta dos potenciais metabolômicos, como a descoberta de novas bioativos, antibióticos e micotoxinas.<sup>72</sup>

Inúmeros compostos com altos potenciais de aplicação industrial, agrícola e farmacológica foram descobertos nessa abordagem '*untargeted*', tais como compostos com potenciais antimicrobianos, citotóxicos entre outros.<sup>73</sup> De todo

modo, para aplicar o estudo de forma ‘untargeted’, deve se escolher técnica de cromatografia líquida aplicada, essas são classificadas pela fase estacionária utilizada, ou seja, o modo de separação química aplicado.<sup>73</sup>

**Tabela 8 - Comparação entre os equipamentos analíticos utilizados para metabolômica**

<b>Tecnologia Metabolômica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>GC-MS</b>	Alta sensibilidade; Fácil de operar; Econômica; Permite busca em bibliotecas de espectros de materiais desconhecidos; Adequada para compostos voláteis e não termossensíveis.	O composto pode sofrer alterações; Não é adequada para compostos menos voláteis.
<b>LC-MS</b>	Adequada para metabólitos com baixa volatilidade; Pouca estabilidade térmica e análise de misturas; Alta sensibilidade; Ampla faixa de análise; Rápida; Permite análise qualitativa e quantitativa.	Baixa capacidade de distinguir isômeros e estereoquímica; Baixa reprodutibilidade; Condições operacionais rigorosas; Efeitos de memória e contaminação da fonte de íons; Operação complexa e cara; Efeito na discriminação de qualidade.
<b>ES-MS</b>	Não requer tratamento especial para amostras; Baixa dosagem; Econômica; Rápida; Alta sensibilidade; Alto rendimento; Curto tempo de teste; Vários modos.	Baixa capacidade de preparação; Sensibilidade reduzida em alguns métodos de detecção; Baixa reprodutibilidade de separação.
<b>MSI</b>	Não requer fluorescência ou marcação com radioisótopos; Ampla faixa de massas; Alto rendimento; Alta eficiência; Resolução espacial; Especificidade molecular.	Necessidade de desenvolvimento e aplicação de novas matrizes em MALDI-MSI.
<b>NMR</b>	Amostra não destrutiva; Quantificação direta; Alta intensidade de sinal NMR com abundância isotópica natural; Linhas espectrais extraordinariamente estreitas; Ampla faixa de deslocamento químico (~200 ppm).	Apenas para núcleos magnéticos; Baixa sensibilidade; Maior probabilidade de picos sobrepostos; Baixa sensibilidade.

Fonte: Adaptado (Liu, R.; Bao, Z.-X.; Zhao, P.-J.; Li, G.-H. Advances in the Study of Metabolomics and Metabolites in Some Species Interactions. Molecules 2021)

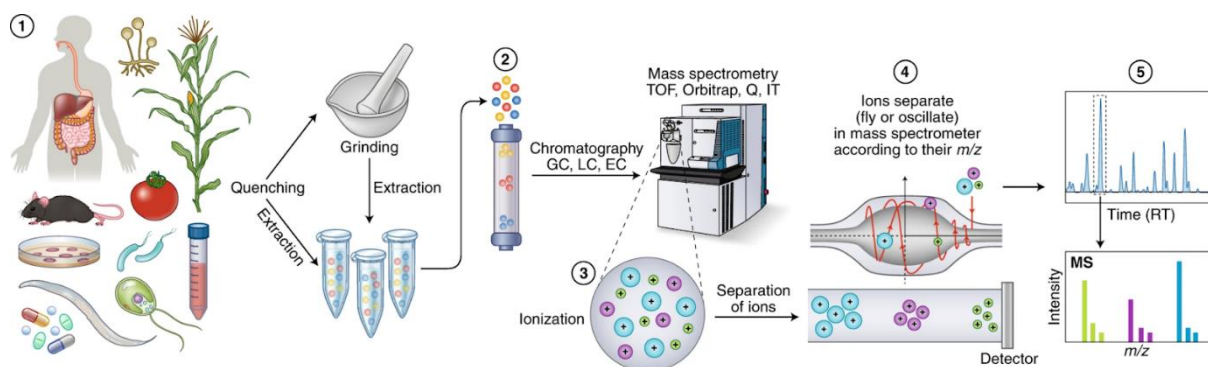
A abordagem diretamente oposta a ‘untargeted’ é a ‘targeted’, essa metodologia baseia-se na investigação de metabólitos já caracterizados, muitas vezes oriundos de um trabalho ‘untargeted’. Essa investigação quantitativa, é aplicada para analisar tanto o consumo de compostos específicos, como aparecimento de algum biomarcador, ou seja, um composto resultante de um estímulo específico pelo qual o espécime passou.<sup>74</sup>

Outra abordagem possível é o rastreamento isotópico, que utiliza baseia-se na adição de compostos marcados com isótopos no cultivo fúngico. Esses serão consumidos e metabolizados, demonstrando quais as rotas foram utilizadas para a produção deste metabólito em específico, através do acompanhamento das marcações nos intermediários e produto final.<sup>29</sup> Essa abordagem tem como objetivo principal definir rotas metabólicas, assim como localizar as origens de metabólitos.<sup>75</sup> Existem outras abordagens possíveis, contudo essas que foram abordadas são as mais recorrentes.<sup>70</sup>

Além de compreender as abordagens possíveis, é necessário entender como são obtidas as amostras a serem analisadas. Para isso a figura 10 apresenta um esquema de extração e preparo de amostras para aquisição de dados confiáveis e reproduzíveis em metabolômica. Contudo, também devemos entender como ocorre o processamento e análise dos dados. A figura 11, apresenta a maneira que são realizadas identificações de compostos através do perfil de fragmentação obtido.

### Figura 10 - Esquematização para obtenção de amostras e espectros

(1) Coleta e preparo da amostra. (2) Separação cromatográfica dos compostos. (3) Ionização por meio de fonte iônica. (4) Separação iônica. (5) Detecção.

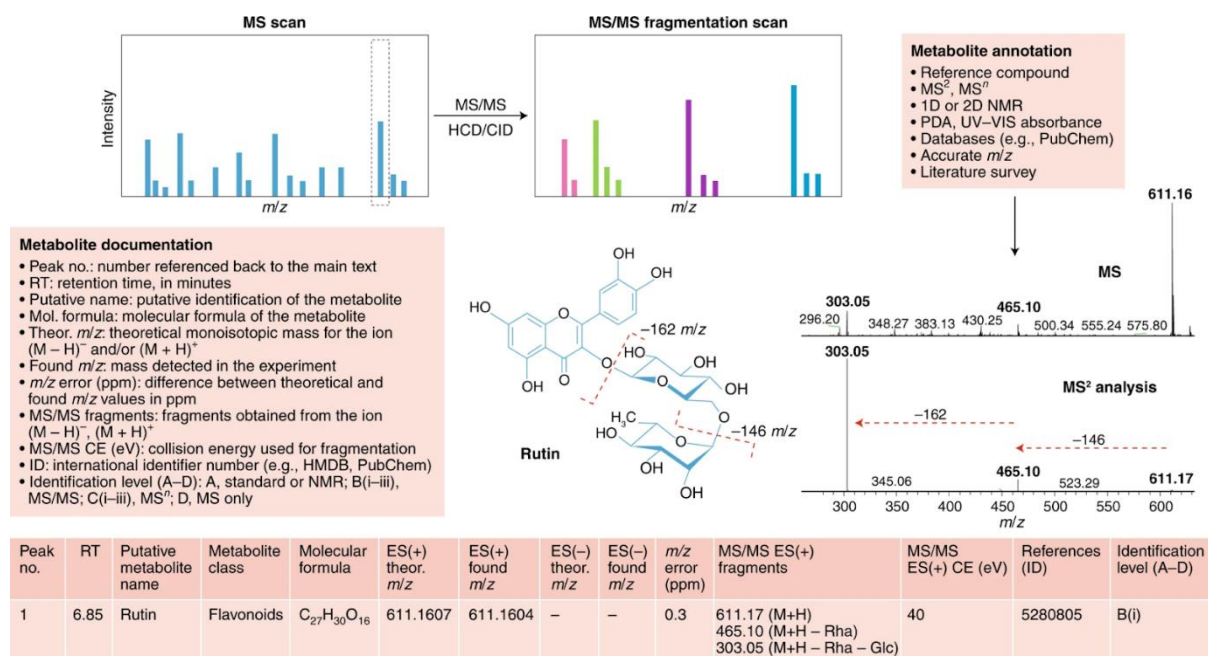


Fonte: (Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices).

Metabolômica fúngica por LC-MS é aplicável em múltiplas áreas, para exemplificar podemos apresentar sua relevância em pesquisas ecológicas sobre aplicação de fungos como mediadores ambientais, onde atuam tanto como decompositores de matéria orgânica, como na atuação em micorrizas assim como muitas outras regulações ambientais.<sup>76</sup>

Fungos atuam em interações multiespécie regulando os ecossistemas, onde cada interespecie gera a liberação de metabólitos reguladores provenientes destas interações.<sup>76</sup>

**Figura 11 - Esquematisação da identificação de compostos por LC-MS**  
Workflow da elucidação de compostos. Conjunto das informações geradas pelos equipamentos de espectrometria de massas.



Fonte: Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices.

Esse tipo de trabalho classificado como eco-metabolômico, faz proveito da técnica de LC-MS/MS para encontrar e classificar as interações como patogênicas ou simbióticas, e de todo modo desvendando mais sobre os ecossistemas e revelando metabólitos bioativos relevantes para serem estudados.<sup>77</sup>

Ainda no âmbito de eco-metabolômica, estudos no campo da biorremediação aplicam técnicas de LC-MS/MS devido a sua versatilidade podendo registrar um número grande de compostos, o uso de um banco de dados integrado facilita a

comparação direta entre amostras, além de possibilitar a realização de estudos metabolômicos e proteômicos no mesmo equipamento, promovendo uma abordagem mais abrangente e eficiente na análise de dados.<sup>43</sup>

Em aplicações industriais, a metabolômica por LC-MS/MS, pode ser aplicada em estudos de monitoramento de fluxos metabólicos, através de marcação isotópica de substratos iniciais, o que gera uma massa alterada nos compostos, identificando-os com certa facilidade nos espectros de massas ao usar softwares adequados.<sup>78</sup>

Outro trabalho mostrou como o uso de LC-MS/MS facilitou a identificação das rotas nitrogenadas reguladas por fungos, onde a fonte de nitrogênio fúngico era conhecida, facilitando o rastreo de compostos nitrogenados pelo dado de massas.<sup>27</sup>

A espectrometria de massas nas técnicas ômicas também possibilitaram estudos taxonômicos, contribuindo para as evoluções de biotecnologia, mapeando as vias de ação metabólica e classificando as espécies fúngicas, visto que ainda existe uma grande problemática de distinção até entre gêneros inteiros de fungos.<sup>10; 11</sup>

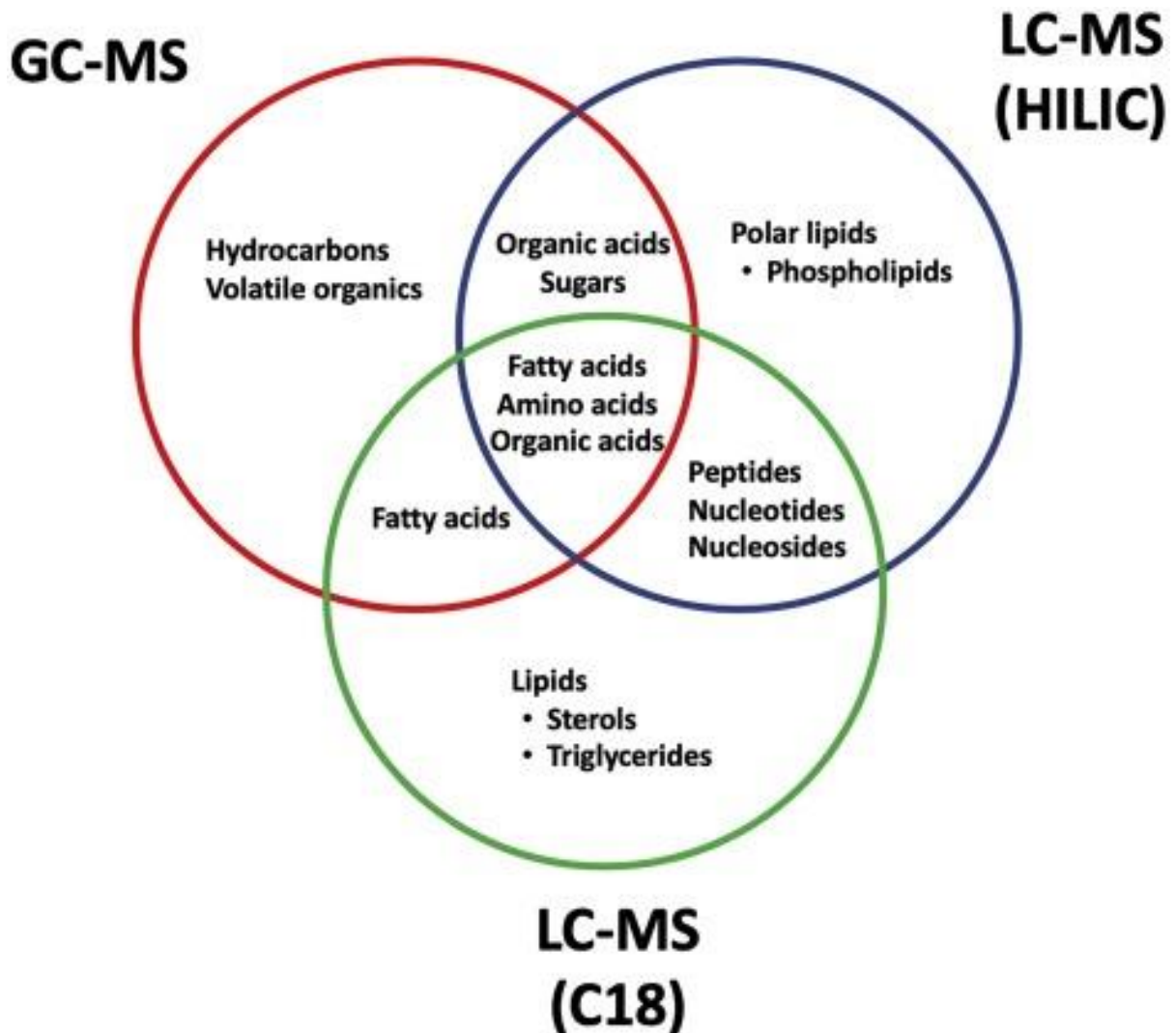
Ademais, outra perspectiva possível de estudo é a aplicação conjunta da técnica com outras, por exemplo, o uso do equipamento de cromatografia gasosa acoplada com espectro de massas (CG-MS/MS).<sup>31</sup> A marcante diferença entre os equipamentos de CG e LC, são os tipos de compostos que ambos permitem analisar, a figura 12 esclarece exemplificando classes de compostos para as determinadas técnicas. De forma geral, CG serve de forma direta para análise de compostos voláteis, termo resistentes e caráter mais apolar, enquanto o LC tem problemas com compostos de caráter apolar.<sup>79</sup> Por tanto, trabalhos que envolvam utilização de ambas as técnicas conseguem abranger melhor a variabilidade de metabólitos e compostos bioativos.<sup>31</sup>

De todo modo, outra técnica analítica que pode ser utilizada de maneira complementar ao LC-MS/MS é o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no intuito de obter melhores respostas sobre as estruturas moleculares.<sup>80</sup> Ambas técnicas se mostram como complementares, onde RMN demonstra capacidade aprimorada na caracterização estrutural de compostos e o LC auxilia com alta sensibilidade.<sup>80</sup>

Trabalhos metabólicos com auxílio de LC-MS/MS mostram-se versáteis e sensíveis, auxiliando em melhor compreensão metabólica em áreas de estudo

industrial, farmacêutico ou mesmo ecológico, sendo uma técnica fundamental para o estudo metabólico.

Figura 12 - Divisão de compostos orgânicos com base nas técnicas de análise



Fonte: (Özge Cansın Zeki, Cemil Can Eylem, Tuba Reçber, Sedef Kır, Emirhan Nemutlu, Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. 2020)

### 3.2 - Ressonância magnética nuclear na metabolômica

RMN é um equipamento analítico que permite análises não destrutivas de amostras orgânicas com base na interação dos spins com o campo magnético do equipamento, que gera respostas espectrais referentes aos núcleos dos átomos.<sup>81</sup>

Um RMN é capaz de gerar vários tipos de espectros sobre uma mesma amostra, retirando diversas informações sobre o estado químico dos núcleos presentes, suas possíveis interações com outros núcleos, assim como vizinhança atômica. Os diversos experimentos possíveis geram muitas informações que podem ser aplicadas no estudo metabolômico.<sup>81</sup>

Trabalhos sobre metabolômica em RMN assim como em LC-MS/MS possuem um banco de dados para usar de base comparativa e analítica. Alguns softwares, por exemplo, são capazes de realizar comparações diretas entre um dado de amostra real contra um apresentado com seus bancos de dados, ou mesmo, utilizando espectros simulados.<sup>82;83</sup> A figura 13 apresenta de maneira simplificada as principais aplicações para técnica de RMN em estudos biológicos.<sup>82</sup>

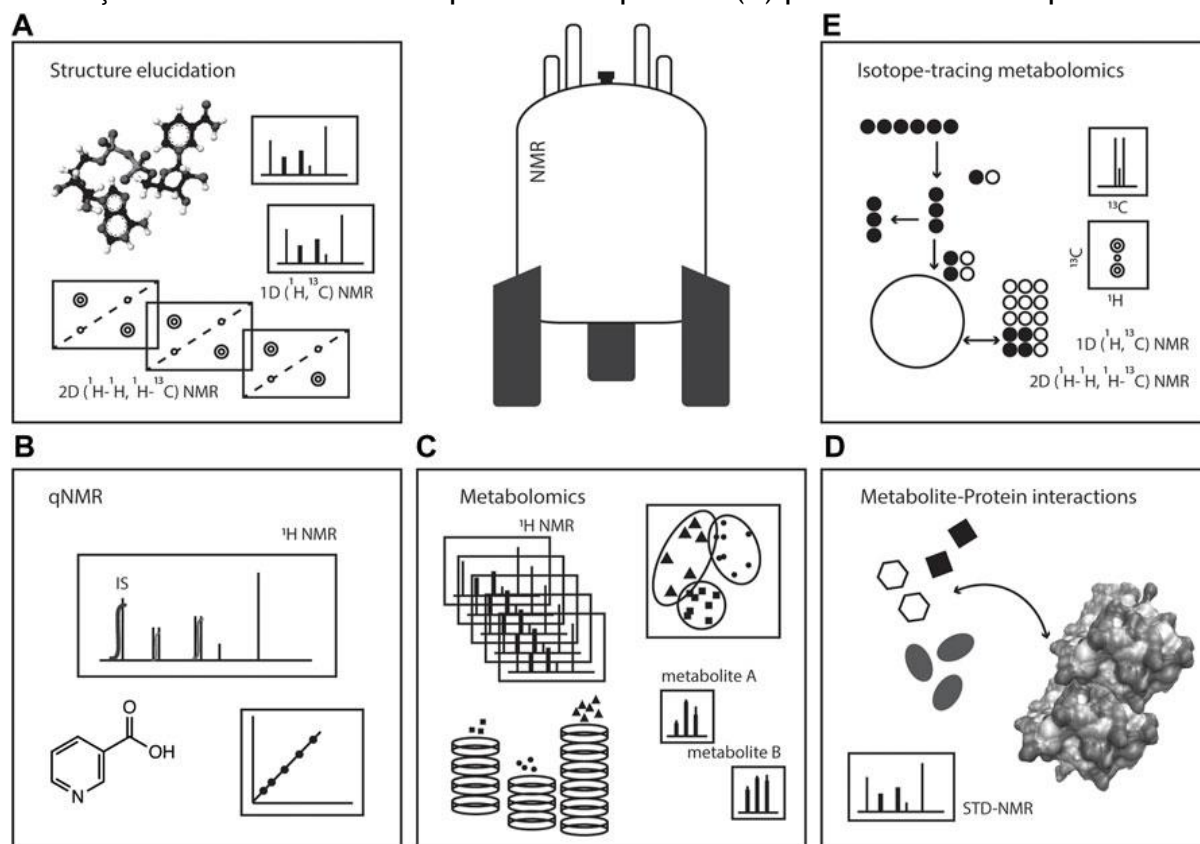
Dos experimentos possíveis, a combinação de técnicas 1D e 2D, tornam as anotações estruturais precisas, reduzindo falsas identificações, aumentando assim a precisão da técnica. Técnicas 1D e 2D são nomeadas assim por uma questão de dimensionalidade de espectros, enquanto experimentos 1D observam a interação de uma espécie atômica com o campo, técnicas 2D observam duas espécies atômicas similares ou distintas simultaneamente, gerando um espectro de correlações.<sup>32</sup> Outra abordagem moderna utilizada, para auxiliar os estudos, é a hiperpolarização dinâmica e micro bobinas para reforçar a sensibilidade do equipamento.<sup>33</sup>

Trabalhos de RMN para metabolômica são capazes de traçar o fluxo metabólico assim como descrever o dinamismo molecular com base em compostos marcados com isótopos, podendo ajudar a compreender melhor as origens de determinado bioativo.<sup>82</sup>

Além disso, como descrito anteriormente, trabalhos que associam informações de RMN com outras técnicas como LC-MS/MS, conseguem estabelecer maior certeza nas configurações estruturais dos compostos, resolvendo uma problemática da aplicação de espectrometria de massas, que envolve no geral, determinados problemas de isomeria.<sup>34</sup>

### Figura 13 - Principais aplicações da RMN

A figura apresenta diferentes utilizações do equipamento de RMN. (a) Para elucidar estruturas, (b) para quantificar substâncias, (c) para metabolômica, (d) para avaliar interação de metabólitos com proteínas e por fim (e) para rastreamento isotópico. <sup>82</sup>



Fonte: (Moco Sofia. Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. 2022)

O equipamento de RMN pode ser usado como técnica única de análise, contudo, integrando seus conhecimentos com alguns conceitos analíticos como quimiometria, podemos realizar uma abordagem mais profunda e precisa como análise de biofluidos, investigação metabólica e avaliação de biomarcadores. Esse tipo de trabalho metabolômico com RMN tem se desenvolvido bastante em áreas de saúde humana indicação de doenças, problemas neurológicos e mesmo em âmbito nutricional do indivíduo. <sup>84;85</sup>

A sua aplicação na área de metabolômica fúngica está em rápido desenvolvimento. Um trabalho de revisão sobre o assunto já apresentou a pauta que a metabolômica de RMN com informações conjuntas de genômica e transcriptômica garante verificações precisas das vias metabólicas em estudo, além de possibilitarem estudos rápidos entorno das relações microbianas como as parasitárias, mutualísticas ou cooperativas, observadas por perfil metabólico e biomarcadores. <sup>86</sup> Além disso, ferramentas analíticas estatísticas, como a análise de componentes

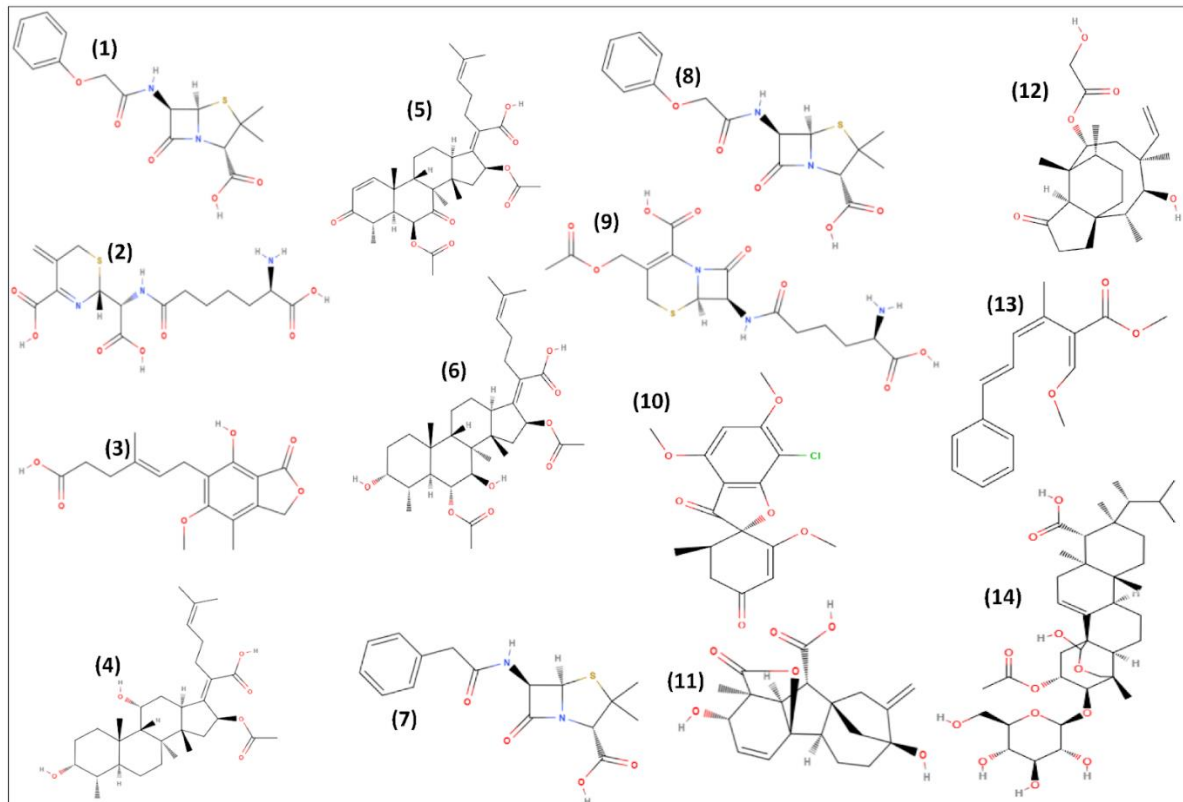
principais (PCA) e a discriminante de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) permitem verificar padrões metabólicos, assim como verificar variações nas vias metabólicas.<sup>87</sup>

Sobre bioativos, o equipamento de RMN se faz indispensável para caracterização de metabólitos secundários complexos, essa complexidade dificulta uma caracterização precisa pelo uso exclusivo de espectrometria de massas.<sup>73</sup> Contudo, a replicabilidade da técnica permite estudar e analisar produções alimentares constantes, como produtos fermentados, cogumelos e outros, comparando lotes e estações de cultivo com precisão.<sup>88</sup>

A figura 14, apresenta alguns dos bioativos já descobertos e caracterizados por meio de RMN, das quais possuem atividades farmacológicas e são considerados moléculas com grau de complexidade considerável, possuindo múltiplos centros de quiralidade assim como ramificações distintas.<sup>88</sup>

#### Figura 14 - Bioativos de fungos isolados e caracterizados

(1) penicilina, (2) cefalosporina, (3) ácido micofenólico, (4) ácido fusídico, (5) ácido helvólico, (6) cefalosporina P1, (7) penicilina G, (8) penicilina V, (9) cefalosporina C, (10) grisefulvina, (11) ácido giberélico, (12) pleuromutilina, (13) estrobilurinas A e (14) oudemansinas.



Fonte: (Conrado, R.; Gomes, T.C.; Roque, G.S.C.; De Souza, A.O. Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. Antibiotics 2022)

Contabilizando tudo, podemos concluir que a aplicação de RMN em metabolômica, permitem estruturação de moléculas complexas, estudos quantitativos, qualitativos, investigação de vias metabólicas, assim como verificações de precursores marcados. Em conjunto com técnicas bioinformáticas, dados analíticos como quimiometria e as técnicas ômicas, se torna possível trabalhar e tratar grandes quantidades de dados metabólicos.<sup>28;88;84</sup> Em suma, a técnica demonstra grandes resultados no estudo fúngico, assim como se tornou essencial para compreensão dos metabólitos, portanto espera-se que com novos estudos alcancemos um conhecimento aprimorado dos compostos e formas de aplicá-los na farmacêutica, tratamentos médicos e na agricultura.

### 3.3 - Perspectivas futuras

Os estudos metabólicos de fungos apresentam grandes perspectivas futuras, com os estudos modernos já podemos constatar o valor dos conhecimentos fúngicos assim como suas aplicabilidades. Fungos estão por todo lugar e atuam na remediação de ambientes, como controles eco microbianos assim como são bons indicadores das condições ambientais, eles também são responsáveis pela produção de compostos de alto valor, bioativos, que servem em aplicações médicas, agrícolas e industriais. Podemos observar essas perspectivas em diversos campos de estudo:

#### Integração dos dados ômicos e técnicas analíticas

O futuro de integrações de dados por meio de *Workflows* elaborados, que compreendem fluxos de trabalho desenvolvidos com uma visão completa e aprofundada dos objetivos de pesquisa e como alcançá-los da melhor forma possível, permitiram uma compreensão aprimorada da produção dos bioativos. A capacidade de reunir e interagir os dados de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, assim como o uso das técnicas quimiométricas e computacionais possibilitaram uma compreensão aprofundada das vias metabólicas, tornando viável uma manipulação das mesmas em prol de desenvolver metodologias de produção otimizada dos bioativos desejados.<sup>28;89</sup>

Para isso, o desenvolvimento aprimorado dos estudos '*untargeted*' e '*targeted*' se faz crucial, para localizar e identificar os bioativos, biomarcadores ou outros compostos de interesse, além de permitirem estudos aprofundados das rotas de produção, tudo utilizando como base a interação dos dados de LC-MS/MS e RMN.<sup>34;74</sup>

#### Avanço dos métodos de processamento de biodados

Os avanços nos sistemas computacionais e metodologias de análise permitem usufruir de dados mais complexos de forma mais íntegra e concisa, viabilizando análises de biofluidos e biomarcadores de forma rápida e dinâmica.<sup>83;90</sup> O processamento dos dados se torna complexo com o acréscimo elevado de informações como dados brutos de extratos, biofluidos entre outros, contudo, o enriquecimento de bancos de dados, assim como softwares modernos permitem realizar associações e otimizam as conclusões de estudos.<sup>91</sup>

Fluxo de trabalho otimizados para análise de dados entre múltiplos equipamentos também são de extrema importância. Por exemplo, para tornar os dados espectrais de CG-MS e LC-MS/MS de fácil integração, faz-se necessário estudo prévio das amostras, assim como padronização na coleta de dados e análise, tornando o estudo replicável, conciso e abrangendo uma gama maior de metabólitos.<sup>31</sup>

### **Avanços biotecnológicos**

Estudos em torno de manipulação genética ou de sistemas regulatórios em prol de otimizar a produção de determinadas moléculas em seres vivos, conhecidos como estudos de engenharia metabólica, se tornam de forma direta o próximo passo industrial para produção de bio-compostos.<sup>92;93</sup> O enriquecimento dos conhecimentos de vias possibilita a manipulação das vias primárias e secundárias, otimizando produção desejada e reduzindo gastos energéticos com processos indesejáveis.<sup>93</sup>

O avanço dos estudos ômicos permitem descobertas genéticas de extrema importância, como a revelação dos genes-chave, genes responsáveis pela síntese dos compostos de interesse, uma vez descobertos, eles se tornam os motrizes para manipulação genética levando a otimização na produção.<sup>94</sup>

Outra aplicação para esses estudos está na implementação alimentar e suplementar de bioativos fúngicos. Estudos sobre regulação genética descrevem os parâmetros de cultivo fúngico a serem otimizados para obtenção de produtos, seja no ajuste de temperatura e pH, seja na suplementação de aminoácidos para melhor obtenção de produtos.<sup>55;95</sup>

### **Avanços ecológicos**

Estudos sobre a condição microbiana dos solos também mostram avanços promissores como a identificação de biomarcadores, atuando na biorremediação e nas relações microbianas (competitiva, mutualística ou simbiótica).<sup>96</sup> A identificação dessas informações permitem uma avaliação ampla sobre a qualidade do solo, possibilitando a compreensão apropriada do assunto e permitindo o uso aplicado de fungo filamentosos para o aumento da qualidade do solo, seja para agricultura, seja para remediação de terrenos.<sup>96</sup>

Além disso, estudos sobre as interações microbianas entre diferentes organismos e a influência da variação de temperatura têm levado à descoberta de metabólitos com ação antibacteriana, bem como ao desenvolvimento de estratégias antifúngicas aplicáveis.<sup>38;37</sup> Estudos nesse âmbito já possibilitam a aplicação de fungos geneticamente alterados para controle de pragas agrícolas assim como na fabricação de bioinseticidas.<sup>97;98</sup>

Para sumarizar tudo apresentado, os estudos metabólicos de fungos filamentosos têm excelentes perspectivas futuras. Só com estudos modernos já se encontrou inúmeras aplicações possíveis em diferentes campos de estudos. Espera-se com modernos estudos e técnicas que seja possível otimizar as aplicações atuais e gerar novas formas de aplicar os conhecimentos, assim como a descoberta de novos bioativos.

## 4 - Conclusão

A elevada resistência fúngica a condições extremas é justificada pela sua alta capacidade adaptativa, liberando variados compostos com propriedades distintas, e essas substâncias podem ser aplicadas de diversas formas, seja na agricultura, indústria ou na produção de fármacos. Acerca disso, esta revisão permitiu a avaliação da diversidade do metabolismo sob diferentes variáveis, evidenciando suas respostas adaptativas e as modificações nas vias metabólicas envolvidas. Além disso, foram descritos diversos metabólitos resultantes dessas interferências e suas potenciais aplicações, ressaltando a importância desses estudos para avanços na biotecnologia e na estratégia para o aproveitamento desses compostos.

Através da descrição do conhecimento mais atualizado sobre o metabolismo adaptativo em fungos filamentosos e da relevância dos estudos metabolômicos, foi possível concluir que as abordagens mais utilizadas são as de LC-MS/MS, que se destacam pela sua alta sensibilidade e as de RMN com caracterização mais eficiente de compostos quirais. A integração dessas técnicas potencializa suas vantagens, minimizando as limitações individuais e tornando a abordagem analítica mais eficiente e robusta.

Como resultado, observou-se que condições ambientais distintas geram respostas metabólicas específicas, que influenciam na sobrevivência fúngica. Fatores como a variação de temperatura interferem na velocidade metabólica do organismo. Condições como alterações no pH modificam o funcionamento das organelas celulares e influências de cátions metálicos e aminoácidos presentes no meio de cultura são responsáveis pela regulação das vias metabólicas.

Conclui-se que a aplicação adequada das condições ambientais e de meios de cultivo são essenciais para maximizar o potencial de utilização dos fungos, permitindo sua aplicação eficaz em áreas importantes para a humanidade. A sua utilização não apenas reduz os impactos ambientais gerados por métodos tradicionais, mas também promove diversas inovações, como a criação de bioinseticidas eficientes, a proteção agrícola avançada e a síntese “verde” de fármacos. Por isso, avanços científicos contínuos são fundamentais para reduzir os desafios atuais como a baixa produtividade e a produção de toxinas e micotoxinas, garantindo que o potencial dos fungos seja plenamente explorado para beneficiar a sociedade e o meio ambiente.

## 5 - Referências

1. Corbu, V. M., Gheorghe-Barbu, I., Dumbravă, A. Ștefania, Vrâncianu, C. O., & Șesan, T. E. (2023). Current Insights in Fungal Importance—A Comprehensive Review. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061384>
2. Niego, A. G. T., Lambert, C., Mortimer, P., Thongklang, N., Rapior, S., Grosse, M., Schrey, H., Charria-Girón, E., Walker, A., Hyde, K. D., & Stadler, M. (2023). The contribution of fungi to the global economy. In *Fungal Diversity* (Vol. 121, Issue 1, pp. 95-137). Institute for Ionics. <https://doi.org/10.1007/s13225-023-00520-9>
3. Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-ściseł, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
4. Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakamchanakul, W., & Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53-66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
5. Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2018). Engineering of the filamentous fungus *penicillium chrysogenum* cell factory for natural products. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>
6. Correia, J., Borges, A., Simões, M., & Simões, L. C. (2023). Beyond Penicillin: The Potential of Filamentous Fungi for Drug Discovery in the Age of Antibiotic Resistance. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081250>
7. Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2021). Turning inside out: Filamentous fungal secretion and its applications in biotechnology, agriculture, and the clinic. *Journal of Fungi*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/jof7070535>
8. Kendrick, B. (2011). Fungi: Ecological Importance and Impact on Humans. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000369.pub2>
9. Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
10. Tsang, C. C., Tang, J. Y. M., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present

- and future. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 16, pp. 197-210). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>
11. Arshadi, N., Nouri, H., & Moghimi, H. (2023). Increasing the production of the bioactive compounds in medicinal mushrooms: an omics perspective. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02013-x>
  12. Hewage, R. T., Aree, T., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2014). One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry*, 108, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.013>
  13. Rippon, J. W., & Anderson, & D. N. (n.d.). *METABOLIC RATE OF FUNGI AS A FUNCTION OF TEMPERATURE AND OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL (EH) 1* by.
  14. Li, Y., Wadsö, L., & Larsson, L. (2009). Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti*- correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1494-1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04110.x>
  15. Xiao, W., Zhang, J., Huang, J., Xin, C., Li, M. J., & Song, Z. (2022). Response and regulatory mechanisms of heat resistance in pathogenic fungi. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 106, Issue 17, pp. 5415-5431). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12119-2>
  16. Ahmed, T., Juhász, A., Bose, U., Shiferaw Terefe, N., & Colgrave, M. L. (2024). Research trends in production, separation, and identification of bioactive peptides from fungi - A critical review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106343>
  17. Kane, P. M. (2016). *Proton Transport and pH Control in Fungi* (pp. 33-68). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_3)
  18. Howard, D. H. (1999). Acquisition, Transport, and Storage of Iron by Pathogenic Fungi. In *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* (Vol. 12, Issue 3).
  19. Jingyi, D., Chaoyang, L., Yu, S., Yunlin, Z., Huimin, H., Yingzi, M., & Zhenggang, X. (2023). Adsorption capacity of *Penicillium amphipolaria* XK11 for cadmium and antimony. *Archives of Microbiology*, 205(4). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03484-1>
  20. Zhang, Q., Niu, D., Ni, S., An, W., Li, C., Huhe, T., Wang, C., Jiang, X., & Ren, J. (2022). Effects of pH and Metal Ions on the Hydrothermal Treatment of Penicillin:

- Kinetic, Pathway, and Antibacterial Activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph191710701>
21. Yap, A., Talasz, H., Lindner, H., Würzner, R., & Haas, H. (2022). Ambient Availability of Amino Acids, Proteins, and Iron Impacts Copper Resistance of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.847846>
  22. Seo, H., Kang, S., Park, Y. S., & Yun, C. W. (2019). The role of zinc in gliotoxin biosynthesis of *aspergillus fumigatus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246192>
  23. Ghosh, S., Rusyn, I., Dmytruk, O. v., Dmytruk, K. v., Onyeaka, H., Gryzenhout, M., & Gafforov, Y. (2023). Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1106973>
  24. Dubey, M. K., Meena, M., Aamir, M., Zehra, A., & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation and role of metal ions in secondary metabolite production by microorganisms. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (pp. 259-277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00019-0>
  25. Pang, A. P., Zhang, F., Hu, X., Luo, Y., Wang, H., Durrani, S., Wu, F. G., Li, B. Z., Zhou, Z., Lu, Z., & Lin, F. (2021). Glutamine involvement in nitrogen regulation of cellulase production in fungi. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02046-1>
  26. Yang, H., Qiu, H. L., Tian, L. Y., Xiao, L. N., Ling, S. Q., Qin, C. S., & Xu, J. Z. (2024). Amino acids promote the rejuvenation of degenerated *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105639>
  27. op de Beeck, M., Troein, C., Siregar, S., Gentile, L., Abbondanza, G., Peterson, C., Persson, P., & Tunlid, A. (2020). Regulation of fungal decomposition at single-cell level. *ISME Journal*, 14(4), 896-905. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0583-9>
  28. Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
  29. Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepois, K., D'Auria, J., Ewald, J., C. Ewald, J., Fraser, P. D., Giavalisco, P., Hall, R. D., Heinemann, M., Link, H., Luo, J., Neumann, S., Nielsen, J., Perez de Souza, L., Saito, K., Sauer, U., Schroeder, F.

- C., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. In *Nature Methods* (Vol. 18, Issue 7, pp. 747-756). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>
30. Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ransom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. In *Molecular BioSystems* (Vol. 8, Issue 2, pp. 470-481). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>
31. Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kir, S., & Nemutlu, E. (2020). Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 190). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509>
32. Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2021). NMR-Based Metabolomics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1280, pp. 19-37). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_2)
33. Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). Nmr spectroscopy for metabolomics research. In *Metabolites* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
34. M Letertre, M. P., Dervilly, G., & Giraudeau, P. (n.d.). Combined Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry Approaches for Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 2021(1), 500-518. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04371i>
35. Jesús Torija, M., Rozè, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (n.d.). *Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae*. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)
36. Owen, S. P., & Johnson, M. J. (n.d.). *The Effect of Temperature Changes on the Production of Penicillin by Penicillium chrysogenum W49-1331*.
37. Bakar, N. A., Karsani, S. A., & Alias, S. A. (2020). Fungal survival under temperature stress: A proteomic perspective. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.10423>
38. Fabri, J. H. T. M., de Sá, N. P., Malavazi, I., & del Poeta, M. (2020). The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101063>
39. Wanichthanarak, K., Fahrman, J. F., & Grapov, D. (2015). Genomic, proteomic, and metabolomic data integration strategies. *Biomarker Insights*, 10, 1-6. <https://doi.org/10.4137/BMI.S29511>

40. Yu, J. H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 43, pp. 437-458). <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
41. Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 527-535. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.527-535.2004>
42. Lind, A. L., Smith, T. D., Saterlee, T., Calvo, A. M., & Rokas, A. (2016). Regulation of secondary metabolism by the velvet complex is temperature-responsive in *aspergillus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(12), 4023-4033. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033084>
43. Kalu, C. M., Oduor Ogola, H. J., Selvarajan, R., Tekere, M., & Ntushelo, K. (2021). Fungal and metabolome diversity of the rhizosphere and endosphere of *Phragmites australis* in an AMD-polluted environment. *Heliyon*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06399>
44. El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., & El-Fakharany, E. M. (2022). A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. In *Journal of Fungi* (Vol. 8, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
45. Yaakoub, H., Mina, S., Calenda, A., Bouchara, J. P., & Papon, N. (2022). Oxidative stress response pathways in fungi. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 79, Issue 6). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04353-8>
46. Emri, T., Antal, K., Varga, K., Gila, B. C., & Pócsi, I. (2024). The Oxidative Stress Response Highly Depends on Glucose and Iron Availability in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/jof10030221>
47. Odoni, D. I., van Gaal, M. P., Schonewille, T., Tamayo-Ramos, J. A., Martins dos Santos, V. A. P., Suarez-Diez, M., & Schaap, P. J. (2017). *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01424>
48. Ghosh, S., Rusyn, I., Dmytruk, O. v., Dmytruk, K. v., Onyeaka, H., Gryzenhout, M., & Gafforov, Y. (2023). Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1106973>

49. Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., & Anike, F. N. (2021). Fungal-metal interactions: A review of toxicity and homeostasis. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof7030225>
50. Schmidt-Dannert, C. (2016). Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 31, pp. 40-49). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.002>
51. Roze, L. v., Chanda, A., & Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 35-48). <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.006>
52. Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 426-446. <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.426-446.2002>
53. Li, B., Chen, Y., & Tian, S. (2022). Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi. In *FEBS Journal* (Vol. 289, Issue 7, pp. 1723-1730). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.15808>
54. da Rosa-Garzon, N. G., de Siqueira, A. C. R., Hirano, V. N., Rodrigues, A., Pessela, B. C., & Cabral, H. (2020). Amino acid supplementation improves the production of extracellular peptidases by *Aspergillus section flavi* and their ionic immobilization. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190127>
55. Wei, J., Lu, J., Nie, Y., Li, C., Du, H., & Xu, Y. (2023). Amino Acids Drive the Deterministic Assembly Process of Fungal Community and Affect the Flavor Metabolites in Baijiu Fermentation. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02640-22>
56. Morales-Vargas, A. T., López-Ramírez, V., Álvarez-Mejía, C., & Vázquez-Martínez, J. (2024). Endophytic Fungi for Crops Adaptation to Abiotic Stresses. In *Microorganisms* (Vol. 12, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071357>
57. Grishkan, I. (2024). Soil as a Source of Fungi Pathogenic for Public Health. *Encyclopedia*, 4(3), 1163-1172. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4030075>
58. Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Tennakoon, D. S., Jayatunga, D. P. W., Hongsanan, S., & Xie, N. (2024). Humans vs. Fungi: An Overview of Fungal Pathogens against Humans. In *Pathogens* (Vol. 13, Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pathogens13050426>

59. Vylkova, S. (2017). Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. In *PLoS Pathogens* (Vol. 13, Issue 2). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006149>
60. Springer-Verlag, ©, Kluge, M., Siegmund, D., Diekmann, H., & Thoma, M. (1992). Applied Microbiology Biotechnology A model for penicillin production with and without temperature shift after the growth phase. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 36).
61. Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00656>
62. Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.3.447-459.2002>
63. Deng, Y., Wang, R., Zhang, Y., Li, J., & Gooneratne, R. (2023). Effect of Amino Acids on *Fusarium oxysporum* Growth and Pathogenicity Regulated by TORC1-Tap42 Gene and Related Interaction Protein Analysis. *Foods*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/foods12091829>
64. Silao, F. G. S., & Ljungdahl, P. O. (2022). Amino acid sensing and assimilation by the fungal pathogen *Candida albicans* in the human host. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010005>
65. Johns, L. E., Goldman, G. H., Ries, L. N. A., & Brown, N. A. (2021). Nutrient sensing and acquisition in fungi: mechanisms promoting pathogenesis in plant and human hosts. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 36, pp. 1-14). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.01.002>
66. Amich, J., & Bignell, E. (2016). Amino acid biosynthetic routes as drug targets for pulmonary fungal pathogens: What is known and why do we need to know more? In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 32, pp. 151-158). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.003>
67. FONTANA, Marta; BUIATTI, Stefano. Amino acids in beer. In: PREEDY, Victor R. (Ed.). *Beer in health and disease prevention*. Academic Press, 2009. p. 273-284. ISBN 9780123738912. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00025-0>.
68. Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

69. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009 Feb;30(1):19-34. PMID: 19224008; PMCID: PMC2643089.
70. Liu, R., Bao, Z. X., Zhao, P. J., & Li, G. H. (2021). Advances in the study of metabolomics and metabolites in some species interactions. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26113311>
71. Sequeira, P., Rothkegel, M., Domingos, P., Martins, I., Leclercq, C. C., Renaut, J., Goldman, G. H., & Silva Pereira, C. (2022). Untargeted Metabolomics Sheds Light on the Secondary Metabolism of Fungi Triggered by Choline-Based Ionic Liquids. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.946286>
72. Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 167-180). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
73. Conrado, R., Gomes, T. C., Roque, G. S. C., & de Souza, A. O. (2022). Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111604>
74. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.98). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
75. Chokkathukalam, A., Kim, D. H., Barrett, M. P., Breitling, R., & Creek, D. J. (2014). Stable isotope-labeling studies in metabolomics: New insights into structure and dynamics of metabolic networks. In *Bioanalysis* (Vol. 6, Issue 4, pp. 511-524). <https://doi.org/10.4155/bio.13.348>
76. Bahram, M., & Netherway, T. (2022). Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 46, Issue 2). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>
77. Sardans, J., Gargallo-Garriga, A., Urban, O., Klem, K., Holub, P., Janssens, I. A., Walker, T. W. N., Pesqueda, A., & Peñuelas, J. (2021). Ecometabolomics of plant-herbivore and plant-fungi interactions: a synthesis study. *Ecosphere*, 12(9). <https://doi.org/10.1002/ecs2.3736>
78. Gao, J., Qian, Y., Wang, Y., Qu, Y., & Zhong, Y. (2017). Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei* Michael Wang. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0963-1>

79. Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
80. Wasilewicz, A., Areesanan, A., Kirchweger, B., Nicolay, S., Waltenberger, E., Beniddir, M. A., Gründemann, C., Rollinger, J. M., & Grienke, U. (2024). Combining the Strengths of MS and NMR in Biochemometrics: A Case Study on *Buddleja officinalis*. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c00847>
81. Marion, D. (2013). An introduction to biological NMR spectroscopy. In *Molecular and Cellular Proteomics* (Vol. 12, Issue 11, pp. 3006-3025). <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239>
82. Moco, S. (2022). Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.882487>
83. Wishart, D. S., Cheng, L. L., Copié, V., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Hoch, J. C., Gouveia, G. J., Pathmasiri, W., Powers, R., Schock, T. B., Sumner, L. W., & Uchimiya, M. (2022). NMR and Metabolomics—A Roadmap for the Future. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12080678>
84. Wang, X., Peng, R., & Zhao, L. (2024). Multiscale metabolomics techniques: Insights into neuroscience research. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 198). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106541>
85. Savorani, F., Rasmussen, M. A., Mikkelsen, M. S., & Engelsen, S. B. (2013). A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*, 54(1), 1131-1145. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.025>
86. Tang J. Microbial metabolomics. *Curr Genomics*. 2011 Sep;12(6):391-403. doi: 10.2174/138920211797248619. PMID: 22379393; PMCID: PMC3178908.
87. Li, G., Jian, T., Liu, X., Lv, Q., Zhang, G., & Ling, J. (2022). Application of Metabolomics in Fungal Research. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27217365>
88. Sousa Silva, M., & Cordeiro, C. (2024). New findings in metabolomics in food mycology. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101175>
89. Wijayawardene, N. N., Boonyuen, N., Ranaweera, C. B., de Zoysa, H. K. S., Padmathilake, R. E., Nifla, F., Dai, D. Q., Liu, Y., Suwannarach, N., Kumla, J., Bamunuarachchige, T. C., & Chen, H. H. (2023). OMICS and Other Advanced

- Technologies in Mycological Applications. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof9060688>
90. Metz, T. O., Zhang, Q., Page, J. S., Shen, Y., Callister, S. J., Jacobs, J. M., & Smith, R. D. (2007). Future of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Metabolic Profiling and Metabolomic Studies for Biomarker Discovery. *Biomarkers in Medicine*, 1(1), 159-185. <https://doi.org/10.2217/17520363.1.1.159>
91. Banimfreg, B. H., Shamayleh, A., & Alshraideh, H. (2022). Survey for Computer-Aided Tools and Databases in Metabolomics. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12101002>
92. Chroumpi, T., Mäkelä, M. R., & de Vries, R. P. (2020). Engineering of primary carbon metabolism in filamentous fungi. In *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107551>
93. Tamano, K., & Yoshimi, A. (2021). Metabolic Engineering Techniques to Increase the Productivity of Primary and Secondary Metabolites Within Filamentous Fungi. In *Frontiers in Fungal Biology* (Vol. 2). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.743070>
94. Amiri, F., Moghadam, A., Tahmasebi, A., & Niazi, A. (2023). Identification of key genes involved in secondary metabolite biosynthesis in *Digitalis purpurea*. *PLoS ONE*, 18(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277293>
95. de Mattos-Shiple, K. M. J., Ford, K. L., Alberti, F., Banks, A. M., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2016). The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology*, 85, 125-157. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.002>
96. Anderson, T. H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98(1-3), 285-293. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00088-4)
97. Liu, Y. J., Liu, J., Ying, S. H., Liu, S. S., & Feng, M. G. (2013). A fungal insecticide engineered for fast per os killing of caterpillars has high field efficacy and safety in full-season control of cabbage insect pests. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6452-6458. <https://doi.org/10.1128/AEM.01594-13>
98. Verma, M. L., Kumar, A., Chintagunta, A. D., Samudrala, P. J. K., Bardin, M., & Lichtfouse, E. (2024). Microbial Production of Biopesticides for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 16(17), 7496. <https://doi.org/10.3390/su16177496>