



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC IV

**PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS DE INTERESSE AGRONÔMICO  
EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Penicillium***

Kathiane Reboucas de Souza

MANAUS – AM  
2021

KATHIANE REBOUÇAS DE SOUZA

**PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS DE INTERESSE AGRONÔMICO  
EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Penicillium***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Biologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

MANAUS – AM

2021

## Ficha Catalográfica

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

**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S729p Souza, Kathiane Reboucas de  
Prospecção de agentes antifúngicos de interesse agrônomo em espécies do gênero *Penicillium* / Kathiane Reboucas de Souza. Manaus : [s.n], 2021. 53 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Koolen, Hector Henrique Ferreira

1. *Penicillium*. 2. metabolismo secundário. 3. agentes de biocontrole. 4. espectrometria de massas. I. Koolen, Hector Henrique Ferreira (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Prospecção de agentes antifúngicos de interesse agrônomo em espécies do gênero *Penicillium*

**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**

*Dedico este trabalho ao meu pai Edson, quem tanto almejou que eu chegasse a esta etapa de minha vida, mas que por circunstâncias da mesma não pôde estar presente para presenciar este momento.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador, Deus, que por diversas vezes recorri como conforto nos momentos mais difíceis e que de certa forma foi de grande ajuda para não me fazer desistir.

À minha família, os quais amo incondicionalmente, e que foram meu sustento desde o início de minha vida e principalmente nos períodos iniciais da graduação, em especial a minha mãe Lindalva, que mesmo após a perda de seu marido e meu pai Edson, teve forças e sustentou a nossa família juntamente com meu irmão Elzo, ambos garantindo a mim a oportunidade de continuar estudando na Universidade.

Agradeço ao meu pai, o seu José Edson, que apesar de rígido, foi um ótimo pai da forma que podia, infelizmente a vida nos separou mais cedo do que o esperado, logo nos meus primeiros anos de graduação, mas o grande desejo dele de me ver estudando em uma Universidade pública e tendo uma profissão me fizeram continuar mesmo que com dores por sua perda neste caminho que hoje me encontro, e sinceramente, sou eternamente grata por esse desejo.

Ao meu avô Jurandir por ter cuidado de mim desde pequena, quando meus pais precisavam sair para trabalhar e eu e meu irmão não tínhamos com quem ficar, sempre foi um segundo pai pra mim, mais ainda atualmente.

Ao grande amor da minha vida, meu marido Ivan, que se tornou um grande companheiro, amigo, confidente e parceiro de jogatinas. Seu carinho e amor me fizeram mais feliz e mais forte, todos os dias vejo o quanto sou grata por tê-lo em minha vida, afinal, além do amor me deu forças e coragem para não desistir dos meus objetivos.

Ao meu orientador Dr. Hector Koolen, que é um grande mentor e exemplo de cientista para mim. E apesar de eu ter fraquejado muitas vezes por devaneios da vida, o professor sempre se mostrou paciente e disposto a me ajudar, por isso sou muito grata por ter aprendido tanto com ele, e pelo mesmo não ter desistido de mim.

Aos meus amigos Weider, Kalynne e Fernanda e em especial a minha amiga Vivi, que sempre foi muito companheira, rimos, choramos, nos desesperamos, mas sempre uma ajudando a outra a não desistir.

Aos professores da Universidade do Estado do Amazonas por todos os ensinamentos e preparos para uma profissão tão nobre que é a de professor de Biologia.

***“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, mas sim para a humanidade”.***

Louis Pasteur

## RESUMO

O gênero *Penicillium* possui diversas espécies já identificadas como produtoras de moléculas bioativas oriundas de seu metabolismo secundário, apresentando destaque em diversas atividades biológicas de interesse como a atividade antifúngica. Cada vez mais, diversos países vêm utilizando microrganismos, principalmente os fungos como agentes de biocontrole de doenças causadas por fungos fitopatogênicos, já que estes são considerados agentes naturais e com grande eficiência na proteção de culturas de valor econômico em todo o mundo. Tendo em vista a preocupação no emprego de técnicas que visem preservar culturas de valor econômico, como é o caso da cultura do guaraná, planta amplamente cultivada para comercialização em diversos setores industriais no estado do Amazonas e atrelando a capacidade dos fungos, principalmente do gênero *Penicillium* em produzir substâncias bioativas e sua capacidade de atuar como agente de biocontrole este trabalho tem por objetivo verificar o potencial antifúngico de diferentes espécies de fungos do gênero *Penicillium* (MMSRG-020) no combate do fungo fitopatogênico *Fusarium decemcellulare* (MMSRG-110) através de ensaios de antibiose, bem como analisar quimicamente os metabólitos secundários envolvidos nas atividades a serem descobertas. Os ensaios de antibiose demonstraram que o fungo MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) atuou como um micoparásita frente ao fungo fitopatogênico MMSRG-110 (*Fusarium decemcellulare*), impedindo o seu crescimento e fazendo com que o fitopatógeno perdesse uma de suas principais características que é a coloração de seu micélio, tal atividade evidencia a capacidade de MMSRG-020 em atuar como um importante agente de biocontrole frente ao principal fitopatógeno do guaraná através do processo de micoparasitismo. As análises por espectrometria de massas demonstraram que nos diferentes meios de cultura em que MMSRG-020 foi cultivado, este, no ponto de retenção 6.28 apresentou um valor de massa 299.2 ( $m/z$ ), identificado como a molécula 4-Aminophyscion ( $C_{16}H_{13}NO_5$ ), uma antraquinona, primeiramente registrada como um produto natural isolado do fungo *Dermocybe canaria* (ordem Agaricales) e que neste trabalho foi identificada pela primeira vez no gênero *Penicillium*, identificação esta que corrobora para a elucidação de possíveis atividades biológicas importantes oriundas desta antraquinona.

**Palavras-chave:** *Penicillium*; metabolismo secundário; agentes de biocontrole; espectrometria de massas.

## ABSTRACT

The genus *Penicillium* has several species already identified as producers of bioactive molecules derived from their secondary metabolism, showing prominence in several biological activities of interest such as antifungal activity. More and more, several countries have been using microorganisms, especially fungi, as agents for the biocontrol of diseases caused by phytopathogenic fungi, since these are considered natural agents and with great efficiency in protecting economically valuable crops worldwide. Bearing in mind the concern with the use of techniques that aim to preserve cultures of economic value, such as the guarana crop, a plantation widely cultivated for commercialization in several industrial sectors in the state of Amazonas and harnessing the capacity of fungi, mainly of the genus *Penicillium* in producing bioactive substances and its ability to act as a biocontrol agent this work aims to verify the antifungal potential of different species of fungi of the genus *Penicillium* (MMSRG-020) in combating the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* (MMSRG-110) through tests of antibiosis, as well as chemically analyzing the secondary metabolites involved in the activities to be discovered. Antibiosis assays showed that the fungus MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) acted as a mycoparasite against the phytopathogenic fungus MMSRG-110 (*Fusarium decemcellulare*), preventing its growth and causing the phytopathogen to lose one of its main characteristics, which is the color of its mycelium, such activity demonstrates the ability of MMSRG-020 to act as an important biocontrol agent against the main phytopathogen of guarana through the process of mycoparasitism. The analysis by mass spectrometry showed that in the different culture media in which MMSRG-020 was cultivated, at retention point 6.28 it presented a mass value of 299.2 (m/z), identified as the 4-Aminophycion molecule (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>), an anthraquinone, first recorded as a natural product isolated from the fungus *Dermocybe canaria* (order Agaricales) and which in this work was identified for the first time in the genus *Penicillium*, an identification that corroborates the elucidation of possible important biological activities arising from this anthraquinone.

**Keywords:** *Penicillium*; secondary metabolism; biocontrol agentes; mass spectrometry



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. REINO FUNGI .....	12
1.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS .....	15
1.2.1. Produtos naturais de fungos.....	18
1.3. GÊNERO <i>PENICILLIUM</i> .....	21
1.4. <i>FUSARIUM DECEMCELLULARE</i> COMO AGENTE PATOGÊNICO DO GUARANAZEIRO.....	25
1.5. ANTIFÚNGICOS DE USO AGRONÔMICO.....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DAS CEPAS FÚNGICAS .....	30
3.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANTIBIOSE.....	32
3.3. CULTIVO LÍQUIDO E SEMISSÓLIDO DE <i>PENICILLIUM SP.</i> .....	33
3.4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>PENICILLIUM SP.</i> .....	35
3.4.1. Filtração .....	35
3.4.2. Centrifugação .....	35
3.4.3. Rotoevaporação .....	36
3.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CL-EMAR) .....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>39</b>
4.1. ATIVIDADE DE ANTIBIOSE DE MMSRG-020 ( <i>PENICILLIUM SP.</i> ).....	39
4.2. TRATAMENTO DE DADOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CL-EMAR) .....	41
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características dos filos pertencentes ao Reino fungi .....	12
<b>Figura 2.</b> Representação dos tipos de hifas e seu desenvolvimento. ....	13
<b>Figura 3.</b> Estruturas dos fungos em geral.....	12
<b>Figura 4.</b> Representação ilustrativa da morfologia de um fungo evidenciando suas principais estruturas .....	14
<b>Figura 5.</b> Estruturas químicas de compostos bioativos presentes em fungos: <b>(1)</b> citrinina; <b>(2)</b> ciclosporina A; <b>(3)</b> giberelina A1; <b>(4)</b> ergotamina.....	17
<b>Figura 6.</b> Compostos bioativos presentes em fungos: <b>(5)</b> penicilina; <b>(6)</b> griseofulvina; <b>(7)</b> lovastatina; <b>(8)</b> ergometrina. ....	19
<b>Figura 7.</b> Macro e micromorfologia de <i>Penicillium</i> sp.....	22
<b>Figura 8.</b> Padrões de ramificação de conidióforo observados em <i>Penicillium</i> .....	23
<b>Figura 9.</b> Substâncias bioativas presentes em espécies do gênero <i>Penicillium</i> : <b>(9)</b> mevastatina; <b>(10)</b> ácido micofenólico. ....	24
<b>Figura 10.</b> Modelo ilustrativo do ensaio de antibiose .....	32
<b>Figura 11.</b> MMSRG-020 após a inoculação nos meios sólidos e líquidos.....	34
<b>Figura 12.</b> Meio semissólido sendo macerado.....	35
<b>Figura 13.</b> Caldo sendo filtrado .....	35
<b>Figura 14.</b> Amostras após centrifugação .....	36
<b>Figura 15.</b> Processo de rotoevaporação.....	36
<b>Figura 16.</b> Amostra sendo rotoevaporada.....	36
<b>Figura 17.</b> Frasco de penicilina contendo extrato bruto .....	37
<b>Figura 18.</b> Equipamento utilizado para análise por CL-EMAR .....	37
<b>Figura 19.</b> Filtros do banco de dados npAtlas.....	39
<b>Figura 20.</b> Ensaio de antibiose - Semana 01 e 02 .....	39
<b>Figura 21.</b> Ensaio de antibiose - Semana 01 e 02 .....	40
<b>Figura 23.</b> Segunda semana de antibiose .....	40
<b>Figura 22.</b> Primeira semana de antibiose .....	40

**Figura 24.** Cromatogramas obtidos em diferentes meios de culturas da amostra MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) ..... 43

**Figura 25.** Espectro de massas da substância 1 ( $m/z$  299.2), Tr 6.28 min – Meio Arroz. .... 44

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Fungos produtores de metabólitos secundários .....	17
<b>Quadro 2.</b> Bioatividades de substâncias produzidas por fungos.....	20
<b>Quadro 3.</b> Micofungicidas comercializados para biocontrole. ....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos fungos registrados na coleção do grupo MMSRG .....	30
<b>Tabela 2.</b> Quantidades para a produção dos meios de culturas líquidos .....	33
<b>Tabela 3.</b> Quantidades para a produção dos meios de culturas sólidos .....	33


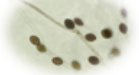
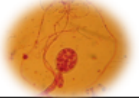
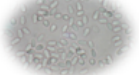



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Reino fungi

Os fungos são microrganismos popularmente conhecidos como mofos ou bolores, sendo anteriormente classificados como pertencentes ao reino Plantae, subdivisão Thallophyta (AZEVEDO & BARATA, 2018). A mudança que criou um reino próprio para os fungos ocorreu em 1969 quando Robert Whittaker através de seus estudos propôs uma nova classificação dos reinos que considera o tipo de nutrição dos seres e a organização de suas células (RICHARDS *et al.*, 2018). Com isso, os fungos foram removidos do reino das plantas e colocados em seu próprio reino, denominando-o de reino Fungi (WHITTAKER, 1969).

Com o passar dos anos, os fungos sofreram várias reorganizações taxonômicas dentro de seu próprio reino, levando-os até a sua classificação mais atual que os dividem em sete filios: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBET, *et al.*, 2007). Nesses filios é possível encontrar uma variedade de representantes, características morfológicas, fisiológicas e reprodutivas (Figura 1).

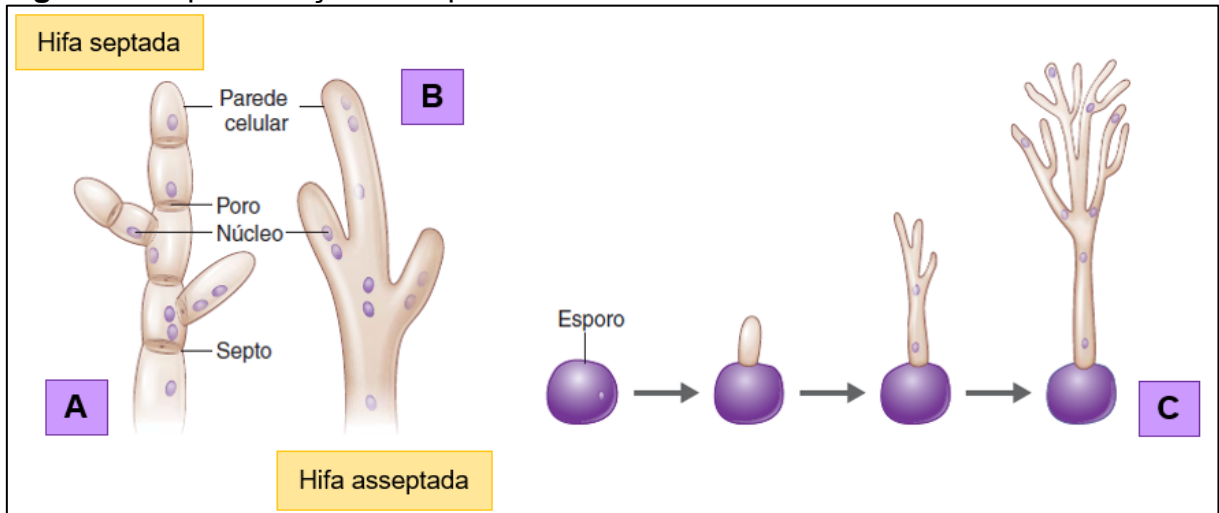
**Figura 1.** Características dos filios pertencentes ao Reino fungi

Filo	Gênero/ espécie representante	Características das hifas	Método de reprodução assexuada	Método de reprodução sexuada
Chytridiomycota	 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	asseptadas	zoósporos	nenhum
Blastocladiomycota	 <i>Allomyces macrogynus</i>	asseptadas	zoósporos	zoósporos
Neocallimastigomycota	 <i>Neocallimastix frontalis</i>	asseptadas	zoósporos	nenhum
Microsporidia	 <i>Microsporidium sp.</i>	unicelulares	esporos imóveis	esporos imóveis
Glomeromycota	 <i>Glomus sp.</i>	asseptadas	esporos imóveis	nenhum
Ascomycota	 <i>Morchella elata</i>	septadas ou unicelulares	brotamento, conídios, fragmentação	ascósporos
Basidiomycota	 <i>Amanita muscaria</i>	septadas	brotamento, conídios, fragmentação	basidiósporo

Fonte: Adaptado de Raven, 2014.

Os fungos possuem estruturas em forma de filamentos denominadas de hifas, estas, se alongam formando uma estrutura maior chamada de micélio. As hifas na maioria dos fungos apresentam paredes cruzadas denominadas septos, as quais dividem esses filamentos em distintas unidades celulares denominadas de hifas septadas (Figura 2).

**Figura 2.** Representação dos tipos de hifas e seu desenvolvimento.

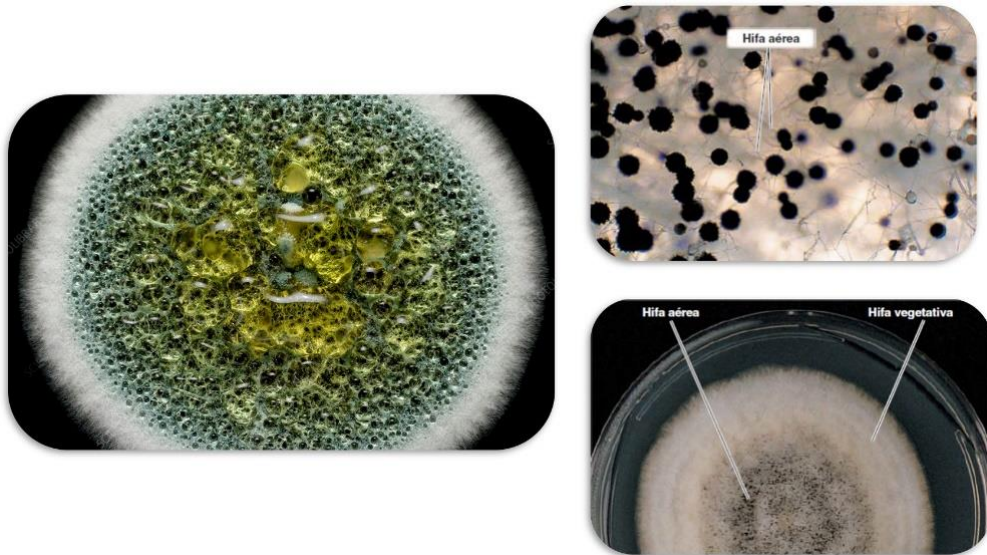


**Legenda:** **A** – Representação de uma hifa septada, onde as paredes separam as hifas em unidades semelhantes a células. **B** – Representação de uma hifa asseptada, sem presença de paredes delimitantes. **C** – Crescimento e desenvolvimento de uma hifa a partir de um esporo. É possível notar o alongamento da hifa através de suas extremidades.

**Fonte:** Adaptado de Tortora, 2017.

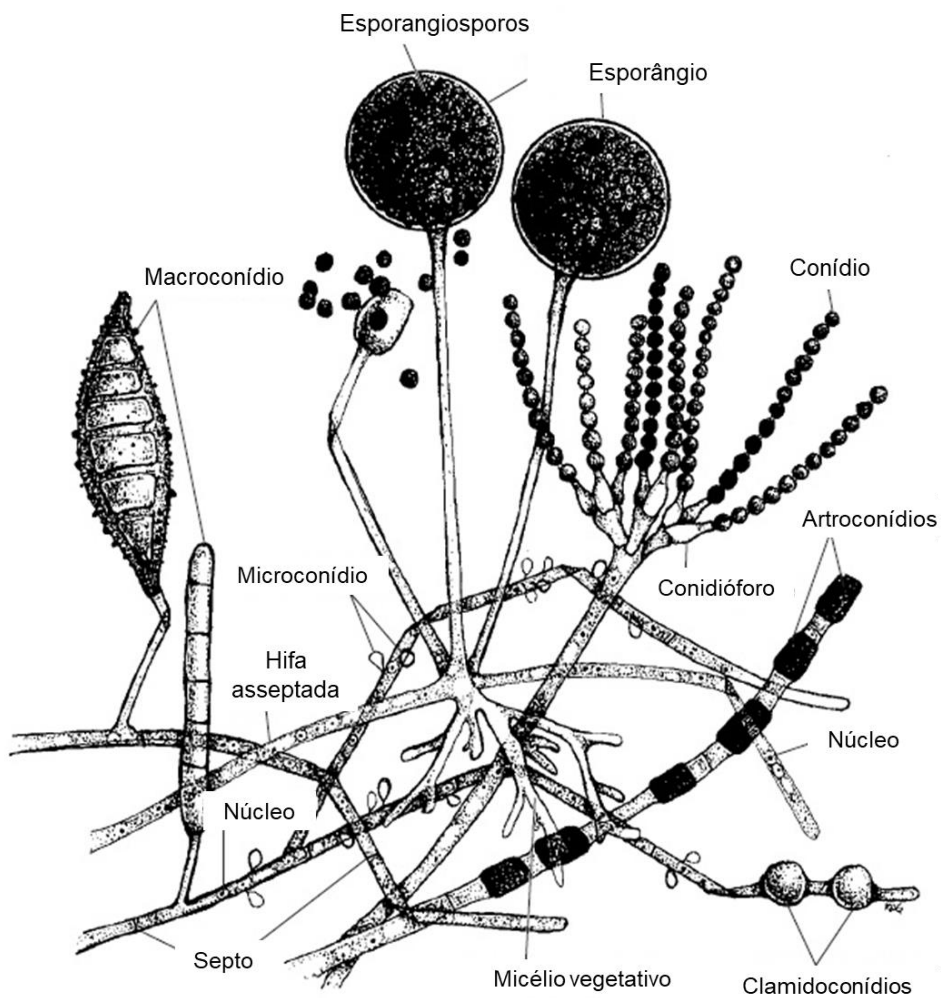
Algumas classes de fungos possuem hifas que não contêm septos, apresentando-se como células longas e contínuas com muitos núcleos, chamadas de hifas cenocíticas (STEPHESON, 2010). As hifas possuem duas porções vegetativas e áreas, a porção vegetativa é responsável pela obtenção dos nutrientes e a porção aérea é encarregada pelos processos de reprodução do fungo (Figura 3) (TAKAHASHI et al., 2017). A figura 4 apresenta as principais estruturas de um fungo.

**Figura 3.** Estruturas dos fungos em geral



**Fonte:** Adaptado de Tortora, 2017.

**Figura 4.** Representação ilustrativa da morfologia de um fungo evidenciando suas principais estruturas



**Fonte:** Adaptado de Ryan e Ray, 2003

Como mecanismos de nutrição, os fungos realizam a absorção dos nutrientes dissolvidos no ambiente em forma de matéria morta ou viva para sua alimentação, sendo considerados organismos quimio-heterotróficos (TORTORA, 2017). Ao contrário de outros microrganismos, como as bactérias, os fungos possuem necessidades ambientais e características nutricionais diferenciadas, tais como: melhor crescimento em ambientes com pH próximo a 5; são organismos aeróbicos em sua maioria, sendo grande parte das espécies de leveduras anaeróbicas facultativas e ainda, necessitam de baixas quantidades de nitrogênio para um crescimento razoável, dentre outros fatores que explicam as necessidades nutricionais desses seres (WALKER & WHITE, 2017).

## 1.2. Metabólitos secundários de fungos

Historicamente, os fungos estão entre os microrganismos que mais têm contribuído com produtos e processos de grande importância para o bem-estar da população, tal fato tem origem na capacidade desses seres em produzirem moléculas de grande valor biológico oriundas de seu metabolismo secundário, a essas moléculas dá-se o nome de metabólitos secundários (MACHELEIDT *et al.*, 2016). Os metabólitos secundários são caracterizados como substâncias de baixo peso molecular produzidas por um amplo espectro de organismos e capazes de apresentar várias potencialidades biológicas (Quadro 1), sendo então alvo de estudos em todo o mundo (HYDE *et al.*, 2019).

Os metabólitos secundários fúngicos são divididos em quatro classes principais: policetídeos, peptídeos não-ribossômicos, terpenos e os alcalóides (DEWICK, 2009; KELLER *et al.*, 2005). Os policetídeos constituem uma das classes mais abundantes de metabólitos secundários fúngicos. São detentores de uma variedade estrutural entre os produtos naturais e ainda, são compostos que em sua maioria possuem uma ampla gama de bioatividades (PASTRE *et al.*, 2007). Esses compostos são sintetizados por policetídeo-sintases através de sucessivas condensações de moléculas de ácidos graxos de cadeia curta, normalmente acetil-coenzima A ou malonil-coenzima A (DEWICK, 2009). Dentre os policetídeos produzidos por fungos pode-se destacar a citrinina (**1**), uma substância isolada do

fungo *Penicillium janthinellum* com atividade inibitória de crescimento de *Leishmania mexicana* (MARINHO *et al.*, 2005).

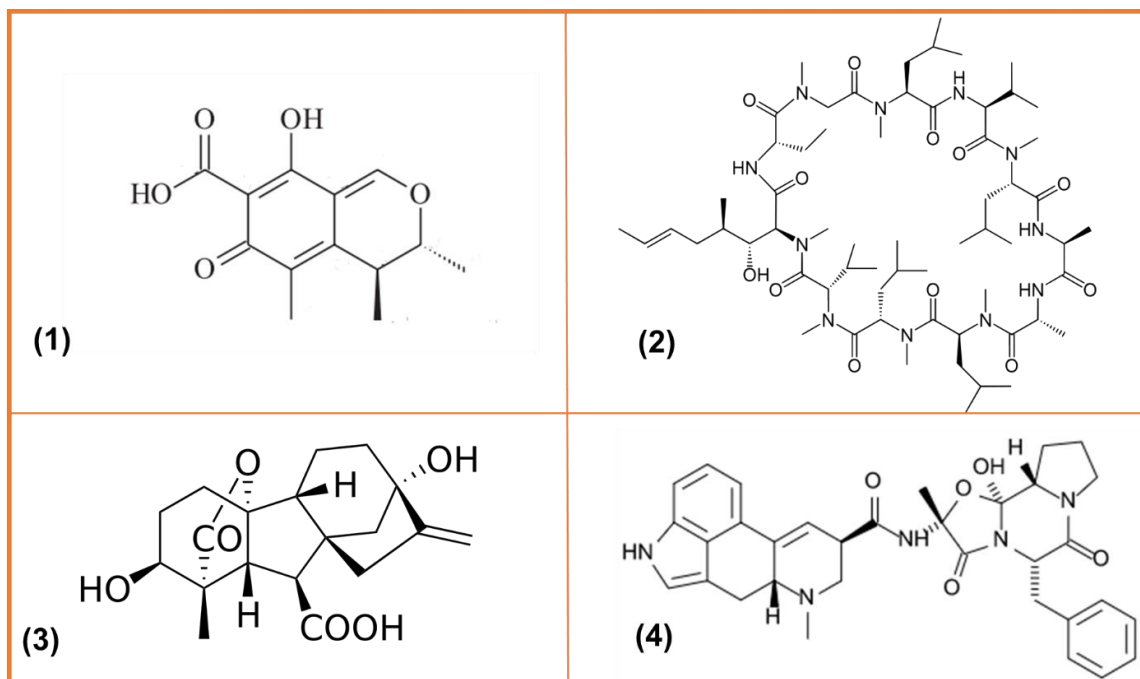


Os peptídeos não-ribossomais são uma classe de metabólitos secundários produzidos em sua grande parcela por bactérias, porém podendo ser produzidos por organismos eucarióticos como os fungos a partir de vias biossintéticas nas quais não ocorre a participação dos ribossomos (GONZALEZ *et al.*, 2016). Nesta classe é possível encontrar compostos altamente promissores para produção de fármacos com diversas atividades biológicas (FELNAGLE *et al.*, 2008). Como exemplo de compostos pertencentes a esta classe tem-se a ciclosporina A (**2**) isolada do fungo *Tolypocladium inflantum* com atividade imunossupressora (YANG *et al.*, 2018).

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários amplamente conhecidos por serem sintetizados em sua maioria por plantas, entretanto, os fungos também são responsáveis pela produção de terpenos contendo atividades biológicas importantes (CIMMINO *et al.*, 2014). Estes compostos possuem duas ou mais unidades isoprênicas (C<sub>5</sub>), dando origem aos monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), além dos carotenoides e esteroides (KITAOKA *et al.*, 2015). Dentre os terpenoides, estão as giberelinas (**3**), hormônios vegetais envolvidos em processos de desenvolvimento de estruturas das plantas e germinação. Apesar de ser um hormônio vegetal, este é sintetizado pelo fungo *Fusarium fujikuroi* (TUDZYNSKI, 2005).

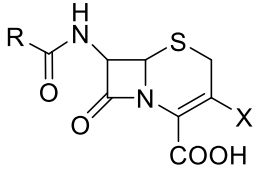
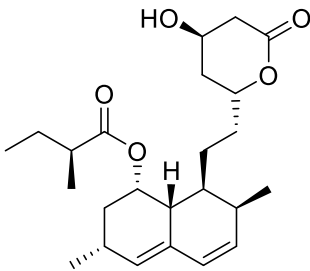
Os alcaloides é uma classe de substâncias de caráter básico, devido a sua estrutura química apresentarem um ou mais átomos de nitrogênio em forma de anel. Estes compostos podem ser sintetizados por plantas, fungos e bactérias. Como exemplo de fungo produtor de alcaloides tem-se *Claviceps purpurea*, este produz a ergotamina (**4**), um alcaloide atualmente utilizado como fármaco para o tratamento de enxaquecas (MATUSCHECK, *et al.*, 2011).

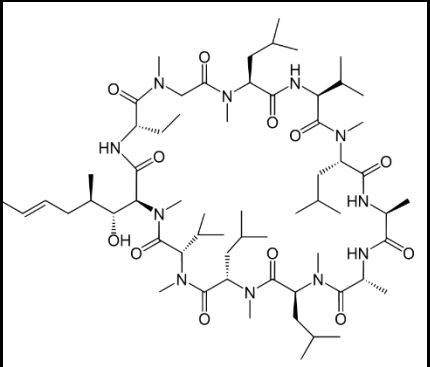
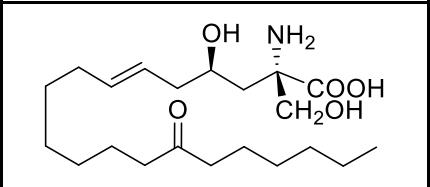
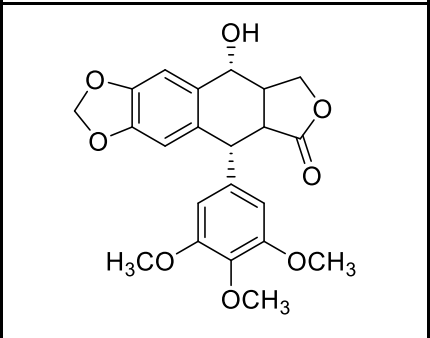
**Figura 5.** Estruturas químicas de compostos bioativos presentes em fungos: **(1)** citrinina; **(2)** ciclosporina A; **(3)** giberelina A1; **(4)** ergotamina.



Fonte: Adaptado de MARINHO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2018; TUDZYNSKI, 2005; MATUSCHECK, *et al.*, 2011

**Quadro 1.** Fungos produtores de metabólitos secundários

Espécie produtora	Metabólito secundário	Ano de descoberta	Referência
<i>Cephalosporium acremonium</i>	 cefalosporina	1945	GOHAR <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus terreus</i>	 lovastatina	1970	BORUTA & BIZUKOJC, 2017

<p><i>Tolypocladium inflatum</i></p>	 <p>ciclosporina A</p>	1971	BOREL, 2016
<p><i>Isaria sinclairii</i></p>	 <p>miriocina</p>	1992	SCHIPPLING, 2016
<p><i>Trametes hirsuta</i></p>	 <p>podofilotoxina</p>	1880	MEDRADO <i>et al.</i> , 2015

### 1.2.1. Produtos naturais de fungos

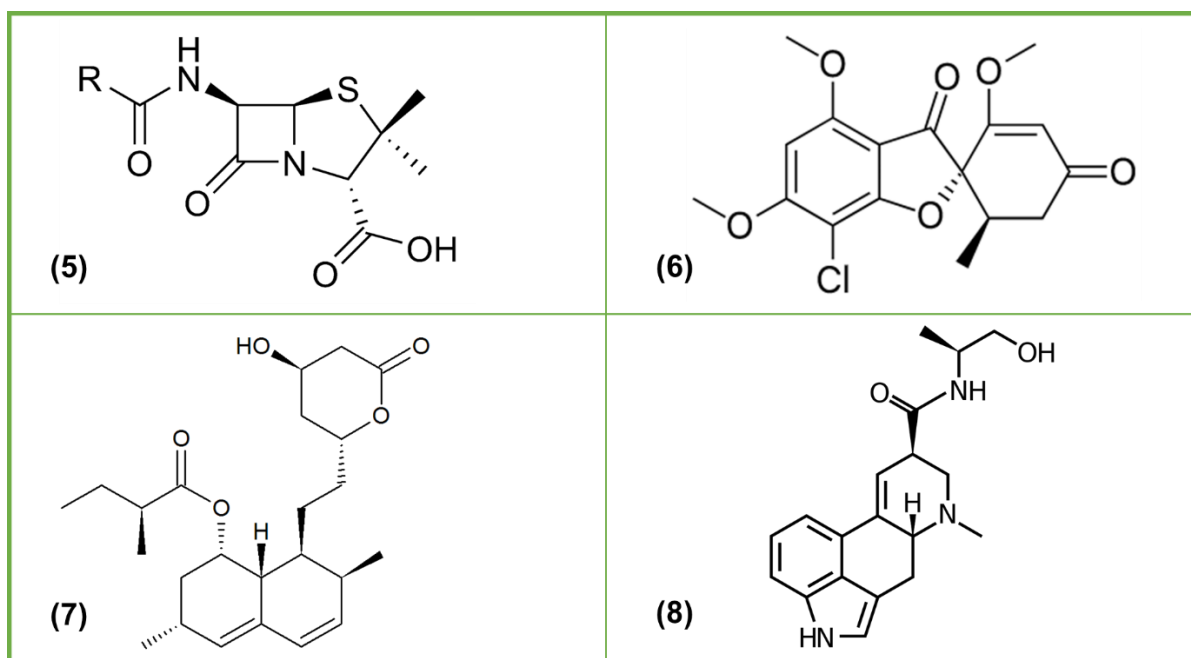
O início da metabolômica de fungos se deu através da descoberta da penicilina **(5)**, uma substância isolada do fungo *Penicillium chrysogenum* em 1928 por Alexander Fleming (CALIXTO & CAVALHEIRO, 2012). A partir deste acontecimento, cientistas no mundo todo se viram instigados a investigar a possibilidade da produção de substâncias por fungos com atividades biológicas (assim como a penicilina) (PEREIRA & PITA, 2018).

Como resultados de diversos estudos comprovou-se a eficaz capacidade desses microrganismos em produzir substâncias que poderiam no futuro serem utilizados como produtos pela humanidade. A esses produtos deu-se o nome de produtos

naturais, já que estes advêm dos seres vivos, como neste caso, os fungos (SPECIAN *et al.*, 2014)

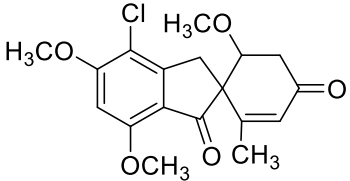
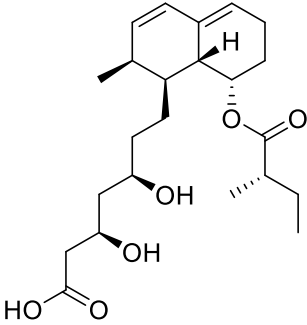
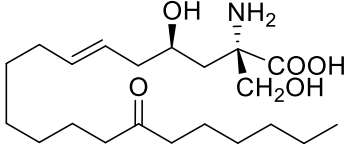
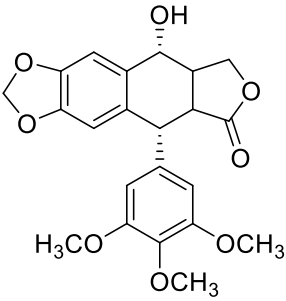
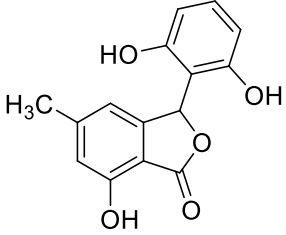
Como exemplo de substâncias bioativas produzidas por fungos, tem-se: griseofulvina **(6)**, substância isolada do fungo *Penicillium griseofulvum* e atualmente utilizada como um dos principais fármacos no tratamento de micoses epiteliais (RUBENICK *et al.*, 2013); lovastatina **(7)**, substância isolada do fungo *Aspergillus terreus*, utilizada no tratamento de hipercolesterolemia (aumento na concentração de colesterol no sangue) e prevenir doenças cardiovasculares (CAMPBELL & VEDERAS, 2010); ergometrina **(8)**, uma substância isolada do fungo *Claviceps purpurea*, utilizada como fármaco no controle o sangramento vaginal intenso após o parto através do estímulo das contrações (MAJRASHI *et al.*, 2017). A partir do isolamento das substâncias anteriormente citadas, foi possível evidenciar a descoberta de outras substâncias com potencial farmacológico produzidas por fungos (quadro 2).

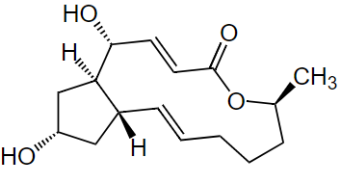
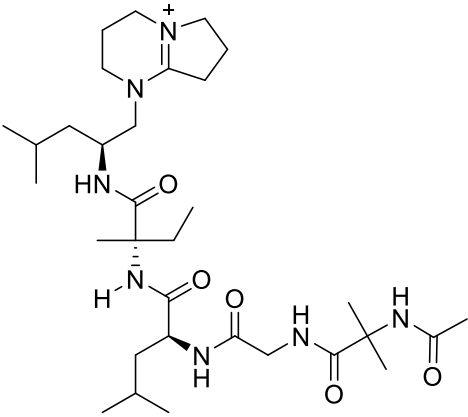
**Figura 6.** Compostos bioativos presentes em fungos: **(5)** penicilina; **(6)** griseofulvina; **(7)** lovastatina; **(8)** ergometrina.



**Fonte:** Adaptado de CALIXTO & CAVALHEIRO, 2012; RUBENICK *et al.*, 2013; CAMPBELL & VEDERAS, 2010; MAJRASHI *et al.*, 2017

**Quadro 2.** Bioatividades de substâncias produzidas por fungos

Metabólito secundário	Atividade biológica	Referência
 <p>ácido ambuico</p>	antifúngica	LI <i>et al.</i> , 2001
 <p>ácido mevinico</p>	anti-inflamatória	UDAYANGA <i>et al.</i> , 2011
 <p>miriocina</p>	imunossupressora	SCHIPPLING, 2016
 <p>podofilotoxina</p>	anticancerígena	MEDRADO <i>et al.</i> , 2015
 <p>isopestacina</p>	antioxidante	STROBEL <i>et al.</i> , 2002

 <p style="text-align: center;">brefeldina A</p>	antiviral	ALVES <i>et al.</i> , 2018
 <p style="text-align: center;">efraeptina A</p>	inseticida	ANKE, 2011

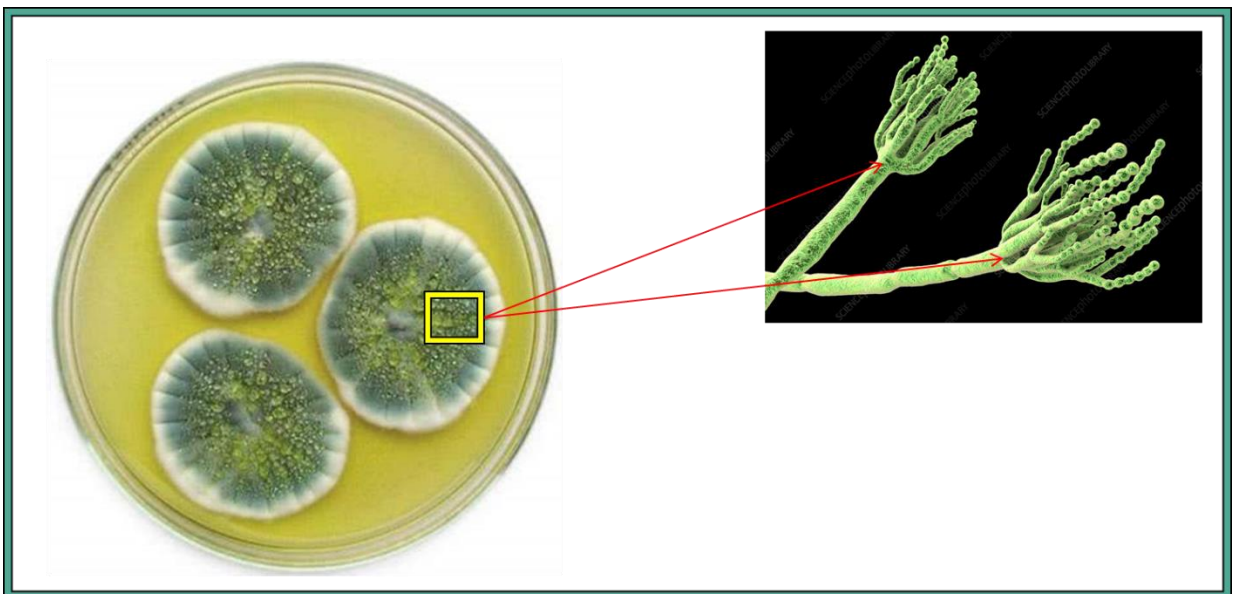
Dessa forma, é possível evidenciar a importância de diversas substâncias com grande potencial biológico produzidas por fungos, sendo necessário a investigação de novas moléculas, visto que existe uma diversidade química de metabólitos bioativos a serem descobertos. Vale ressaltar que há uma infinidade de fungos biotecnologicamente promissores a serem descobertos. Nesse sentido, fungos como os pertencentes ao gênero *Penicillium*, os quais são altamente diversos, exibem grande potencial em fornecer substâncias com ampla variedade de atividades biológicas.

### 1.3. Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Compreende fungos conhecidos popularmente como bolores de pães, frutas e outros alimentos (HOUBRAKEN *et al.*, 2016). Estima-se que este gênero possua aproximadamente 360 espécies amplamente distribuídas no mundo inteiro, resultado da grande diversidade de espécies presentes em ambientes tanto terrestre quanto aquático (AINSWORTH, 2008).

Relacionado a sua morfologia, este gênero possui amplas redes altamente ramificadas de hifas multinucleadas, estas, possuem cada par de célula separada por um septo caracterizando-as como hifas septadas. Essas redes se conectam formando então o micélio fúngico (figura 7). Possuem conidióforos os quais estão no final de cada ramo, acompanhados por unidades esféricas verdes contraídas denominadas de conídios. Esses propágulos exercem um papel significativo na reprodução desses fungos, pois são a principal estratégia de dispersão desses microrganismos (WEBSTER & WEBER, 2007).

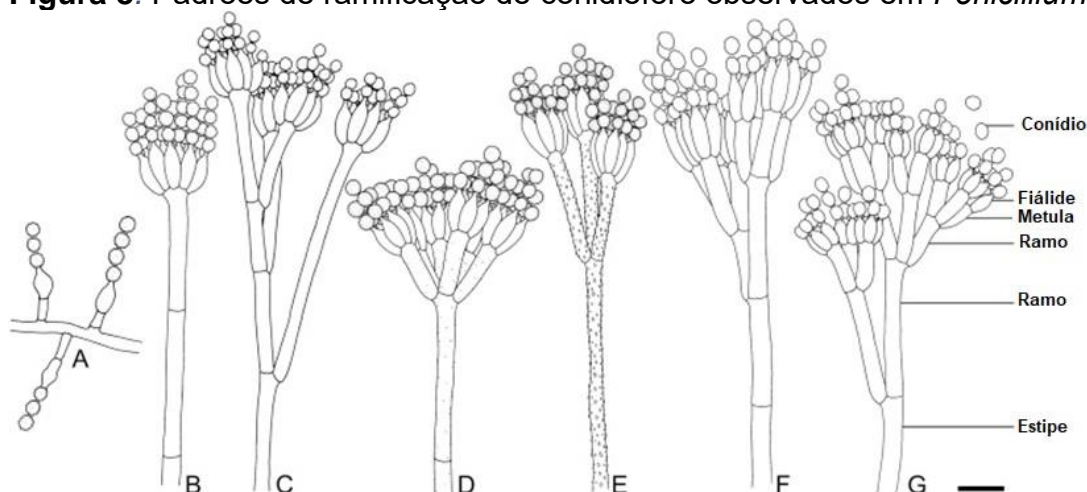
**Figura 7.** Macro e micromorfologia de *Penicillium* sp.



**Fonte:** Adaptado de SCIENCE PHOTO, 2018.

Os conídios apresentam-se em forma de longas cadeias a partir dos verticilos das fiálides, as quais são conhecidas como células especializadas na produção de propágulos vegetativos (conídios) (VISAGIE *et al.*, 2014). As fiálides caracterizam-se pela presença de um pescoço curto e paredes lisas e seu formato, podem variar de padrões simples (fiálides solitárias) a padrões muito complexos (fiálides quaterverticilado), com vários níveis de ramificação, resultando em padrões gerais simétricos ou assimétricos (figura 8) que por vezes são utilizados na identificação de espécies (GUPTA & RODRIGUEZ-COUTO, 2018).

**Figura 8.** Padrões de ramificação de conidióforo observados em *Penicillium*.



**Legenda:** A – Conidióforos com fiáides solitárias. B – Monoverticilado. C – Divaricado. D, E – Biverticilado. F – Terverticilado. G – Quaterverticilado.

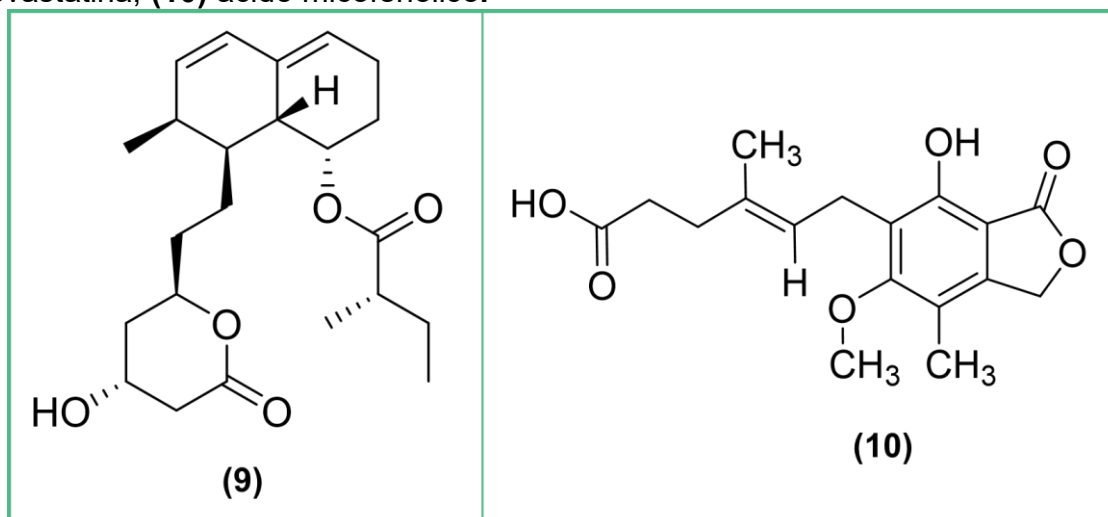
**Fonte:** Adaptado de VISAGIE *et al.*, 2014

Neste gênero encontram-se espécies de grande valor econômico e científico, as quais historicamente ganharam seu destaque com a descoberta da substância biologicamente ativa penicilina (5). Tal substância é produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e após anos de pesquisas, é atualmente utilizada como um dos principais fármacos no combate a infecções bacterianas. Após anos de pesquisas, vem-se descobrindo uma ampla variedade de substâncias isoladas a partir destes microrganismos e identificadas quimicamente, sendo algumas já utilizadas como produtos naturais de uso comum pela sociedade.

Como exemplo dessas substâncias tem-se a griseofulvina, uma substância antifúngica isolada de *Penicillium griseofulvum* e atualmente utilizada como um dos principais fármacos no combate de micoses (KUMAR *et al.*, 2018); mevastatina (9), molécula inicialmente isolada como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinum*, em 1976. Esta substância atua diminuindo as taxas de colesterol no sangue e é utilizada como medicamento no tratamento de doenças cardiovasculares (ZHENG *et al.*, 2014); ácido micofenólico (10), fármaco imunossupressor isolado de *Penicillium brevicompactum* e utilizado para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos (REGUEIRA *et al.*, 2011). A partir desses e de outros trabalhos foi possível então reconhecer este gênero como um potencial produtor de uma infinidade de biomoléculas, as quais podem ser utilizadas em diversos setores industriais.



**Figura 9.** Substâncias bioativas presentes em espécies do gênero *Penicillium*: **(9)** mevastatina; **(10)** ácido micofenólico.



**Fonte:** Adaptado de ZHENG *et al.*, 2014; REGUEIRA *et al.*, 2011

O gênero *Penicillium* também é relatado em pesquisas como bioprodutores de enzimas de importância industrial, um exemplo é a enzima amilase, a qual foi evidenciada como sendo produzida pelas espécies *P. brunneum*, *P. fellutanum*, *P. expansum* e *P. chrysogenum* podendo serem utilizados em diversos setores industriais, um exemplo de aplicabilidade das amilases é a sua utilização na indústria de limpeza onde é utilizada na produção de detergentes. (SUNDARRAM & MURTHY, 2014). Outras enzimas produzidas por *Penicillium* são as proteases, também chamadas de enzimas proteolíticas, são consideradas enzimas bastante versáteis pois possuem ampla aplicabilidade em diversos setores industriais, tais como: farmacêutica, alimentícia, cosmética, têxtil, etc (SANA *et al.*, 2006)

Outra aplicação industrial onde os fungos deste gênero são inseridos é na indústria alimentícia onde espécies de *Penicillium* são utilizadas na confecção dos sabores característicos de queijos. Pode-se citar como as principais espécies utilizadas para esta finalidade *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* (BOURDICHON *et al.*, 2012).

Através de estudos como estes é possível evidenciar as potencialidades biotecnológicas de espécies do gênero *Penicillium* no que diz respeito ao fornecimento tanto de produtos como de processos e ainda demonstrando cada vez mais a promissora capacidade de produção de moléculas bioativas isoladas a partir de fungos deste gênero.

#### 1.4. *Fusarium decemcellulare* como agente patogênico do guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma espécie vegetal nativa da Amazônia, que produz o fruto conhecido como guaraná. É uma espécie arbustiva e trepadeira pertencente à família Sapindaceae. O gênero *Paullinia* é composto por aproximadamente 106 espécies distribuídas em todo o Brasil, sendo a maior parte dessas espécies endêmicas do Estado do Amazonas (FLORA DO BRASIL, 2020).

Historicamente o cultivo do guaraná advém dos índios pertencentes a tribo Sateré-Mawé que faziam uso deste fruto para diversas finalidades, desde medicinais até mesmo para rituais específicos. A partir da utilização do guaraná pelos povos nativos da Amazônia foi possível então a sua difusão para outros locais e seu aprimoramento, principalmente no que diz respeito ao ramo comercial.

O guaraná é atualmente utilizado na indústria farmacêutica e também na fabricação de refrigerantes, xaropes, sucos, pó e bastões. Sua maior demanda está ligada a produção de amêndoas por parte das indústrias de bebidas para a produção de refrigerantes e energéticos, visto que pode apresentar elevados teores de cafeína. Tem como maior produtor o Estado da Bahia, porém, no Amazonas, é amplamente cultivado e comercializado por grandes e pequenos produtores, sendo assim neste último caso uma cultura de grande importância para a agricultura familiar e consequentemente servindo como uma das principais fontes de renda para muitas famílias amazonenses (DE QUEIROZ *et al.*, 2020).

Com o cultivo dessa cultura surgem alguns obstáculos durante o processo de sua produção, o principal deles se dá aos agentes fitopatogênicos, que são aqueles organismos ou microrganismos responsáveis por diferentes patologias na planta e que podem afetar diretamente o seu desenvolvimento e consequente produção. Uma das fitopatologias que afeta mais comumente o guaranazeiro é o superbrotamento, patologia causada pelo fungo *Fusarium decemcellulare*.

O superbrotamento nessa espécie foi evidenciado pela primeira vez nos anos 80 e seu agente etiológico foi identificado como *Fusarium decemcellulare* (SANTOS, 1983). Essa fitopatologia apresenta variações de sintomas e acomete diferentes órgãos da planta. Os três principais sintomas presentes em plantas infectadas são: hiperplasia da gema vegetativa (superbrotamento das gemas vegetativas), hipertrofia floral (flores com aspecto de cálice entumecido, impedindo a polinização floral) e galha (formação de massa compacta e desorganizada de brotos nas gemas terminais ou

entrenós). Todos esses sintomas, na planta, impedem o desenvolvimento de suas flores e conseqüentemente a formação de seus frutos (DE ARAÚJO, *et al.*, 2006).

O fungo causador do superbrotamento, identificado como *Fusarium decemcellulare* pertence ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. É geralmente evidenciado como endófito ou patógeno de diversas plantas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A colônia deste fungo em meio de cultura padrão batata-dextrose-ágar (BDA) apresenta pigmentação vermelho carmim após três a cinco dias de seu cultivo. Possui micélio aéreo cotonoso onde são produzidos em monofialides microconídios hialinos, que podem ser formados em cadeia ou em “falsas cabeças”, com formato oval (GUU, *et al.*, 2010).

Do ponto de vista econômico, o cultivo do guaraná no Estado do Amazonas vinha se estabelecendo de forma progressiva, tendo como principal produtor o Município de Maués, com uma produção de aproximadamente 625 toneladas, sendo um dos produtos mais valorizados no mercado nacional e internacional, principalmente devido ao elevado teor de cafeína presente no fruto se comparado ao guaraná produzido em outras regiões do Brasil (PEREIRA, 2005). Entretanto, a falta de um manejo adequado, ocorrências de fitopatologias e envelhecimento das culturas levaram a diminuição da produção deste fruto, e como resultado, a elevação da produção no Estado da Bahia. Atualmente, este cenário vem mudando, pois as produções de guaraná no Estado do Amazonas demonstram sinais de recuperação graças ao lançamento de materiais genéticos melhorados pela Embrapa Amazônia Ocidental, o que beneficia muitos produtores e conseqüentemente a economia.

Com isso, nota-se que a inserção de medidas biotecnológicas como as implementadas pela EMBRAPA reforça a importância destes recursos para a recuperação de culturas em risco, bem como para o aprimoramento de culturas de valor econômico. Utilizar as ferramentas da biotecnologia para o combate de agentes fitopatogênicos como *Fusarium decemcellulare* que até hoje e de forma frequente acomete o guaranazeiro através do superbrotamento torna-se essencial, visto que, através do uso de fontes naturais pode-se garantir a eficiência e principalmente a segurança das culturas, contribuindo assim para o produtor, o meio ambiente e para a economia local.

### 1.5. Antifúngicos de uso agrônômico

Os antifúngicos são encontrados na agricultura convencional, conhecidos popularmente como fungicidas, sendo estes um dos produtos de maior representatividade no controle de fitopatologias. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas, entretanto, estes produtos em sua maioria são de origem sintética, podendo conter substâncias químicas de alta toxicidade. Outro agravante no uso de fungicidas sintéticos é o seu uso contínuo, o qual pode desencadear a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, tornando o produto ineficaz e consequentemente danificando plantações, solo e ainda promovendo intoxicações aos consumidores (GUPTA, 2018).

Neste cenário, os fungos podem ser uma importante solução quanto ao uso de fungicidas, visto que são microrganismos amplamente conhecidos por sua potencialidade biotecnológica, sendo capazes de produzir uma diversidade de moléculas com diferentes atividades biológicas. Com isso, estes microrganismos mostram-se capazes de contribuir significativamente no combate a fungos fitopatogênicos através da produção de substâncias antifúngicas, sendo esta atividade já relatada em diversos estudos atualmente. Como exemplos de estudos acerca da atividade antifúngica produzida por fungos tem-se o trabalho desenvolvido por Ding e colaboradores (2009), em que estes realizaram a identificação da molécula antifúngica ácido ambuico e de mais seis substâncias derivadas desta, todas isoladas do fungo *Pestalotiopsis* sp.

Outros estudos, como o de revisão bibliográfica realizado por Shukla e colaboradores (2019) aborda a importância da utilização de biofungicidas e outros biopesticidas como alternativas naturais e seguras para meio ambiente e humanidade. Os autores destacam o uso de espécies de *Trichoderma* como biofungicidas eficazes no combate a várias fitopatologias causadas por fungos, atuando principalmente no controle de doenças causadas no solo, como a podridão de raízes, e ainda sendo também capazes de atuar no tratamento de sementes, aplicação do solo, encharcamento do solo, técnica de imersão nas raízes, etc.

Atualmente, substâncias com ação antifúngica isoladas de fungos são comercializadas em alguns países, tais produtos são conhecidos como micofungicidas. A comercialização de produtos como estes comprova a eficácia de

substâncias oriundas do metabolismo secundário fúngico como um produto natural que auxilia no combate de fungos fitopatogênicos. No quadro 3 é possível observar uma lista de micofungicidas comercializados em alguns países do mundo. Em contrapartida a esta realidade, no Brasil, ainda não há registros da comercialização de micofungicidas, sendo isto um alerta, bem como uma abertura de oportunidades para a implementação de fungicidas de origem natural, tomando como iniciativa a utilização de fungos, visto a potencialidade biotecnológica que estes possuem no que diz respeito a formulação de um fungicida natural, não agressivo ao meio ambiente e a saúde humana (SHARMA, 2019).

**Quadro 3.** Micofungicidas comercializados para biocontrole.

<b>Fungo</b>	<b>Alvo</b>	<b>Ação</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Produtor/País</b>
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Controle de oídio.	Hiper parasítica	Q-Fect Green-all	Green Biotech, Coreia do Sul
<i>Fusarium oxysporum</i>	Efetivo contra espécies patogênicas de <i>Fusarium</i> presentes em plantações de manjeriço, cravo, ciclâmen e tomate.	Tratamento de sementes e incorporação de solos	Biofox C Fusaclean	SIAPA, Itália NPP, França
<i>Glíocadium virens</i>	Eficaz contra patógenos do solo causadores amorteimento e podridão das raízes	Antagonista	Soil Guard 12G	Certis LLC, Emirados Árabes Unidos
<i>Trichoderma harzianum</i>	Eficaz contra uma variedade de fungos patogênicos do solo	Micoparasita Antagonista	RootShield Bio Trek 22g Supresivit	Bio Works Inc Wilbur-Ellis, Estados Unidos

**Fonte:** Adaptado de SAVITA & SHARMA, 2019.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Verificar o potencial antifúngico de diferentes espécies de fungos do gênero *Penicillium* no combate do fungo fitopatogênico *Fusarium decemcellulare* através de ensaios de antibiose, bem como analisar quimicamente os metabólitos secundários envolvidos nas atividades a serem descobertas.

### 2.2. Objetivos específicos

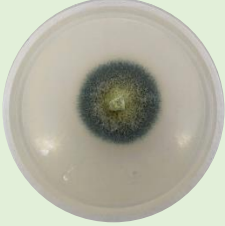


- Realizar ensaios de antibiose entre *Penicillium* spp. e o fungo fitopatogênico *Fusarium decemcellulare*;
- Cultivar os *Penicillium* spp. promissores em meios líquidos e meios semi sólidos;
- Produzir extratos contendo metabólitos fúngicos das cepas promissoras;
- Avaliar quimicamente as substâncias produzidas pelo fungo promissor.




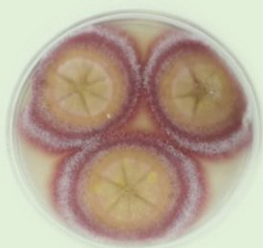
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção e reativação das cepas fúngicas

Para a realização dos experimentos foram selecionadas seis cepas do gênero *Penicillium* e uma cepa do fungo fitopatogênico *Fusarium decemcellulare* (tabela 1). As cepas do gênero *Penicillium* fazem parte da coleção de fungos do grupo de pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da UEA (MMSRG). A cepa de *Fusarium decemcellulare* foi obtida através da parceria entre o grupo MMSRG e a Embrapa Amazônia Ocidental. Esta cepa também foi depositada na coleção de fungos do grupo MMSRG.

**Tabela 1.** Identificação dos fungos registrados na coleção do grupo MMSRG

Código da coleção	Identificação taxonômica	Origem Isolamento
MMSRG – 007	<i>Penicillium funiculosum</i>	Sedimento igarapé poluído
		
MMSRG – 014	<i>Penicillium austrosinense</i>	Semente de <i>Euterpe precatoria</i>
		
MMSRG – 020	<i>Penicillium</i> sp.	Casca interna de <i>Mauritia flexuosa</i>
		

MMSRG – 032	<i>Penicillium rolfsii</i>	Solo de área da floresta amazônica
		
MMSRG – 035	<i>Penicillium rolfsii</i>	Polpa de <i>Mauritia flexuosa</i>
		
MMSRG – 076	<i>Penicillium pedernalense</i>	Casca interna de <i>Passiflora cincinnata</i>
		
MMSRG-110	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Gema vegetal do guaraná
		

Fonte: Dados do autor, 2021.

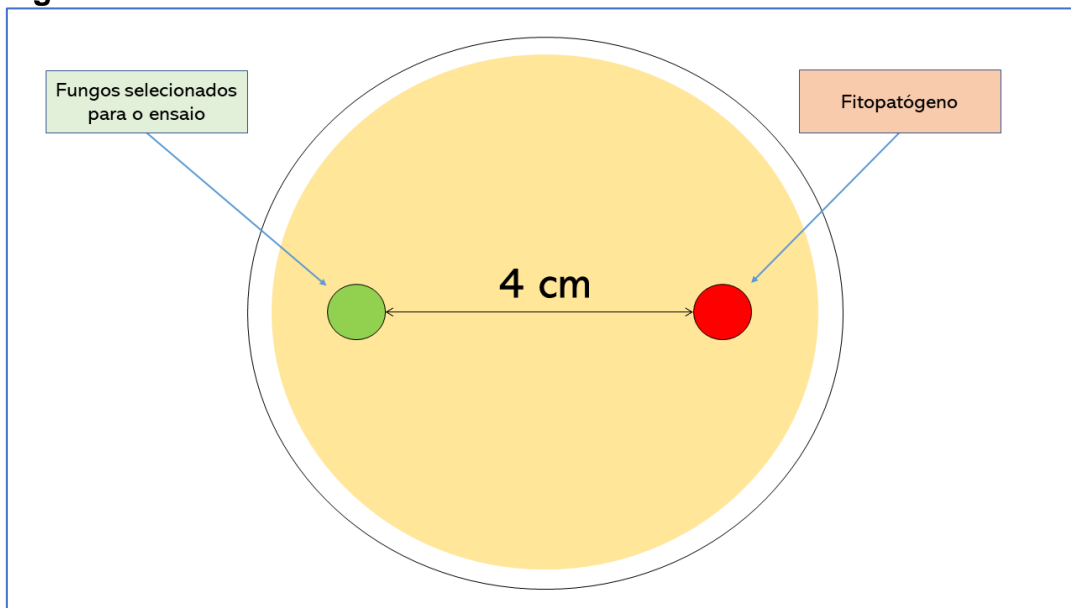
A reativação das cepas do gênero *Penicillium* e do fitopatógeno *Fusarium decemcellulare* se deu pela remoção de pequenos fragmentos de micélio previamente conservados pela técnica de castellani. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Após o procedimento os fungos foram identificados com seus respectivos códigos e acondicionados em incubadora BOD por um período 7 dias a temperatura de 28°C.



### 3.2. Determinação da atividade de antibiose

Para determinação da atividade de antibiose foram realizados testes em meio tradicional BDA. Como forma de definir um espaço adequado para o crescimento de *Penicillium* spp. e *F. decemcellulare*, estabeleceu-se previamente uma distância de 4cm entre os dois microrganismos na placa de petri (Figura 10). Após este procedimento, em câmara de fluxo, os esporos de cada fungo foram inoculados com auxílio de alça de platina através de um furo na placa contendo o meio de cultura em cada ponto determinado, levando em consideração a distância previamente determinada na placa.

**Figura 10.** Modelo ilustrativo do ensaio de antibiose



**Fonte:** Dados do autor,2021.

Após o processo de inóculo de todos os microrganismos selecionados estes foram armazenados em incubadora BOD a 28°C. As análises da atividade de antibiose foram realizadas durante o período de 14 dias e o registro foi feito através de fotos onde foram analisados quesitos como o padrão de crescimento dos fungos frente ao fitopatógeno, excreção de algum metabolito para inibição no meio de cultura, além de outros processos relacionados a antibiose. Após o período de análises da antibiose, o fungo MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) foi então selecionado de acordo com a atividade observada tendo como parâmetro os quesitos anteriormente citados para o prosseguimento dos ensaios.

### 3.3. Cultivo líquido e semissólido de *Penicillium* sp.

Após o processo de antibiose, o fungo MMSRG-020 foi selecionado para cultivo líquido e semissólido. Esta etapa foi baseada na técnica de OSMAC (*one strain many active compounds*), técnica que consiste na variação das condições de cultivo de microrganismos, podendo essas variações serem: tipos de fontes de carbono, grau de oxigenação, variações de pH, dentre outros (SALEEM, *et al.*, 2009). Para a realização desta etapa foram utilizados dois tipos de meios de cultura: meios líquidos (BDA e ISP2) e meios semissólidos (meio arroz, meio milho, meio sucrilhos e meio aveia). Os meios foram preparados seguindo protocolos padrão para o preparo de meios de cultura líquido e semissólido. As quantidades necessárias para a produção de cada meio são listadas nas tabelas 2 e 3 a seguir.

**Tabela 2.** Quantidades para a produção dos meios de culturas líquidos

<b>Protocolo de preparo – Meios de cultura líquidos</b>	
<b>Para 1000mL de H<sub>2</sub>O destilada</b>	
<b>Batata-Dextrose (BD)</b>	<b>ISP2</b>
200 g de batata	10 g de amido
20 g de dextrose	4 g de extrato de levedura
15 g de Ágar	10 g de extrato de malte
	15 g de dextrose
	20 g de Ágar

Fonte: Dados do autor, 2021.

**Tabela 3.** Quantidades para a produção dos meios de culturas sólidos

<b>Protocolo de preparo – Meios de cultura sólidos</b>
<b>Para 50mL de H<sub>2</sub>O destilada</b>
<b>Arroz, Aveia; Milho; Sucrilhos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 g de meio</li> <li>• 1g de dextrose</li> </ul>

Fonte: Dados do autor, 2021.

Após o preparo de cada meio, estes foram transferidos para vidrarias do tipo erlenmeyers de 250 mL, contendo 120 mL para os meios líquidos e 100 mL para os meios semissólidos (50 g de meio + 50 g H<sub>2</sub>O destilada), em formato de triplicata totalizando 18 vidrarias. Além dos meios de cultura, outros materiais foram confeccionados, como tampões feitos de gaze e algodão hidrófilo e quadrados de papel alumínio para vedar as vidrarias durante a esterilização.

Todos os materiais necessários foram então colocados em sacos de polipropileno, e em seguida submetidos a esterilização em autoclave a 121°C por um período de 15 minutos. Após este processo os materiais foram removidos da autoclave e transferidos para câmara de fluxo previamente esterilizada. Para a inoculação do fungo nos meios produzidos, foi utilizada uma cepa do mesmo previamente cultivada em placa de Petri contendo meio BDA com 10 dias de cultivo. O inóculo do fungo foi feito através do corte de fragmentos do mesmo na placa de Petri e transferidos para os Erlenmeyers contendo os meios de cultura.

Após o inóculo em cada meio, as vidrarias foram vedadas utilizando-se os tampões de gaze e ao fim do procedimento as amostras foram armazenadas em uma estante em modo estático, ao abrigo de luz e em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C por 21 dias (figura 11). Durante este processo as cepas foram observadas verificando-se parâmetros como: possíveis contaminações, crescimento fúngico e pigmentação do meio de cultura.

**Figura 11.** MMSRG-020 após a inoculação nos meios sólidos e líquidos



**Fonte:** Dados do autor, 2021.

### 3.4. Obtenção dos extratos de *Penicillium* sp.

#### 3.4.1. Filtração

Após o período de fermentação dos fungos, as cepas foram transferidas para câmara de fluxo, onde foi feita uma filtração simples com auxílio de funil de Büchner e gazes (figura), a fim de separar o caldo (meio líquido) e o micélio fúngico. Ao final do procedimento, foram acrescentados juntamente ao caldo 50 mL do solvente Acetato de Etila ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) para promover a extração dos metabólitos secundários.

O micélio fúngico diferentemente do caldo foi macerado utilizando bastão de vidro e acrescentado de 60mL de solvente metanol, sendo este armazenado ao abrigo de luz e a temperatura ambiente para extração por um período de 24 horas. Os meios semissólidos, assim como o micélio também foram macerados, porém, acrescentados de 60 mL do solvente Acetato de Etila (figura 13).

**Figura 13.** Caldo sendo filtrado



**Fonte:** Dados do autor, 2021.

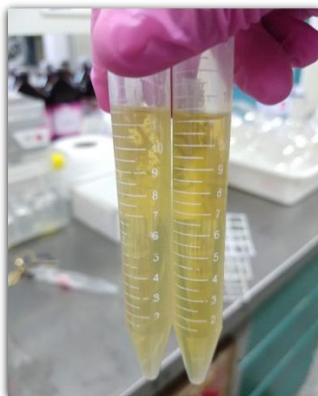
**Figura 12.** Meio semissólido sendo macerado



**Fonte:** Dados do autor, 2021.

#### 3.4.2. Centrifugação

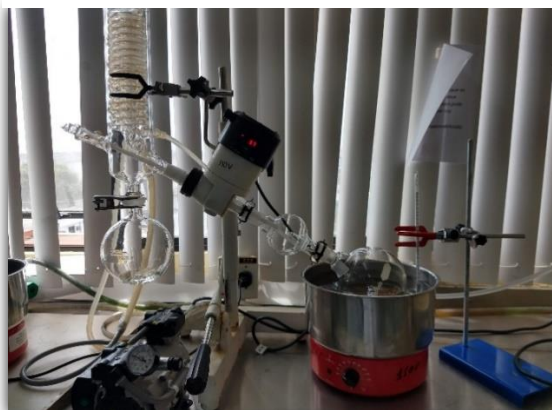
Após a filtração, o caldo e o meio semissólido já acrescentados de acetato de etila foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL e submetidos a centrifugação em potência de 4000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada meio foi coletado e transferido para vidrarias do tipo balões para posterior processo de rotoevaporação. O micélio após as 24 horas de extração foi submetido ao mesmo procedimento de centrifugação (Figura 14) e transferido para balões.

**Figura 14.** Amostras após centrifugação

**Fonte:** Dados do autor, 2021

### 3.4.3. Rotoevaporação

Para a retirada do solvente restante nas amostras e obtenção dos extratos brutos contendo os metabólitos secundários foi realizado o processo de rotoevaporação. Ao fim desse procedimento, foram obtidos dois extratos, sendo um do caldo fermentado e um do micélio para cada fungo cultivado, já para os meios semissólidos obteve-se um tipo de extrato para cada meio, pois estes não passaram por processos de filtração. Todos os extratos obtidos foram registrados e etiquetados com o código dos fungos, a origem do extrato, meio ou micélio, o solvente utilizado na extração e o valor da massa do extrato, por fim sendo o seu conteúdo transferido para frascos de penicilina previamente esterilizados e levados a dessecador para secagem das amostras.

**Figura 15.** Processo de rotoevaporação **Figura 16.** Amostra sendo rotoevaporada

**Fonte:** Dados do autor, 2021.



**Fonte:** Dados do autor, 2021.

**Figura 17.** Frasco de penicilina contendo extrato bruto



**Fonte:** Dados do autor, 2021.

### 3.5. Análise por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR)

Para a realização da análise por espectrometria de massas foi seguida a metodologia proposta por Peñaloza e colaboradores (2020). Utilizando-se um Cromatógrafo líquido Dionex LC UltiMate 3000 acoplado ao espectrômetro de massas Thermo QExactive Plus. O tempo total de análise foi de 16 minutos e como condições do espectrômetro de massas foi estabelecido o método de troca de polaridade consistindo nos modos de ionização por Electrospray em modo positivo ESI (+), Full scan  $m/z$  100-1000, resolução 70K, AGC 1e6, IT 150 MS + dd-MS2 (topN 10), resolução 17,5K, AGC 1e5, IT 50 ms, N(CE)=15, 45.

**Figura 18.** Equipamento utilizado para análise por CL-EMAR



**Fonte:** EquipNet, 2021.

Quanto ao preparo das amostras, à estas foram adicionados metanol grau HPLC em um tubo de centrífuga até uma concentração final de 2mg/mL. Cada amostra foi levada ao vortex por 30 s. Depois, cada tubo foi colocado em banho de ultrassom por 15 minutos à 30 °C ou até dissolver as amostras. Novamente, cada amostra foi levada ao vortex por 1 min para posteriormente ser centrifugado por 10 minutos a 9000 RPM e o sobrenadante removido para outro tubo de 1,5 mL. Finalmente, foram retirados 100 µL de sobrenadante da amostra e adicionados 100 µL de solvente MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) para uma concentração final de 1mg/mL em insertes de 250 µL para a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR).

Para o tratamento dos dados contidos nas amostras foi utilizado o software XCalibur™, obtendo assim os dados essenciais para a identificação de possíveis moléculas de interesse biológico, etapa está na qual foi utilizado o banco de dados *Natural Products Atlas* ([www.npatlas.org/search/basic](http://www.npatlas.org/search/basic)), através da inserção do valor de uma massa monoisotópica (M) que foi obtida pela subtração entre o valor massa molecular da amostra identificada no espectro de massas (Ma) e a massa molecular do hidrogênio de valor 1,0078 (MH). Com isso foi possível obter um valor de massa indicado para a pesquisa no banco de dados.

$$M = Ma - MH$$

Onde:

M = Massa monoisotópica da amostra

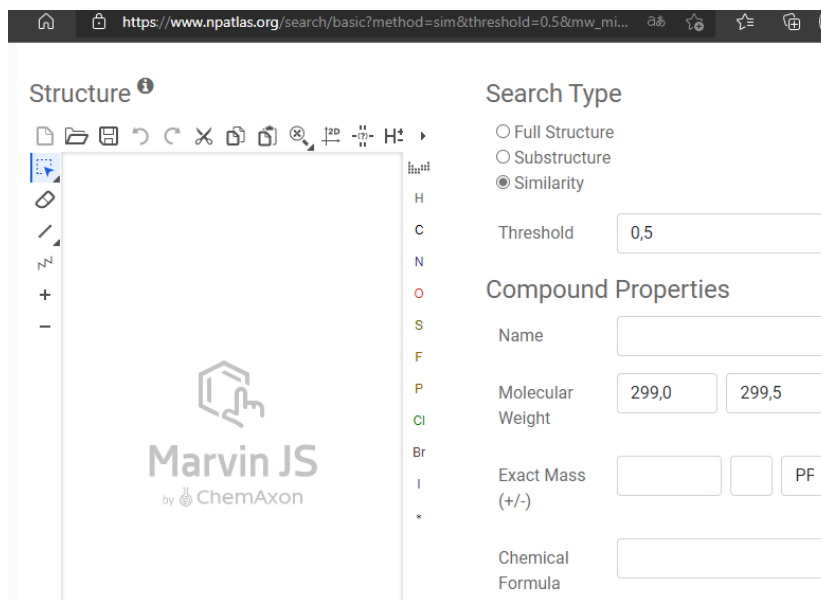
Ma = Massa molecular da amostra

MH = Massa molecular do Hidrogênio = 1,0078

Como forma de filtrar as buscas no banco de dados foi estabelecido um intervalo de similaridade de 0,5 (figura 19). E a partir disso foi realizada as buscas por moléculas que contivessem valores de massas dentro deste filtro de similaridade.



**Figura 19.** Filtros do banco de dados npAtlas



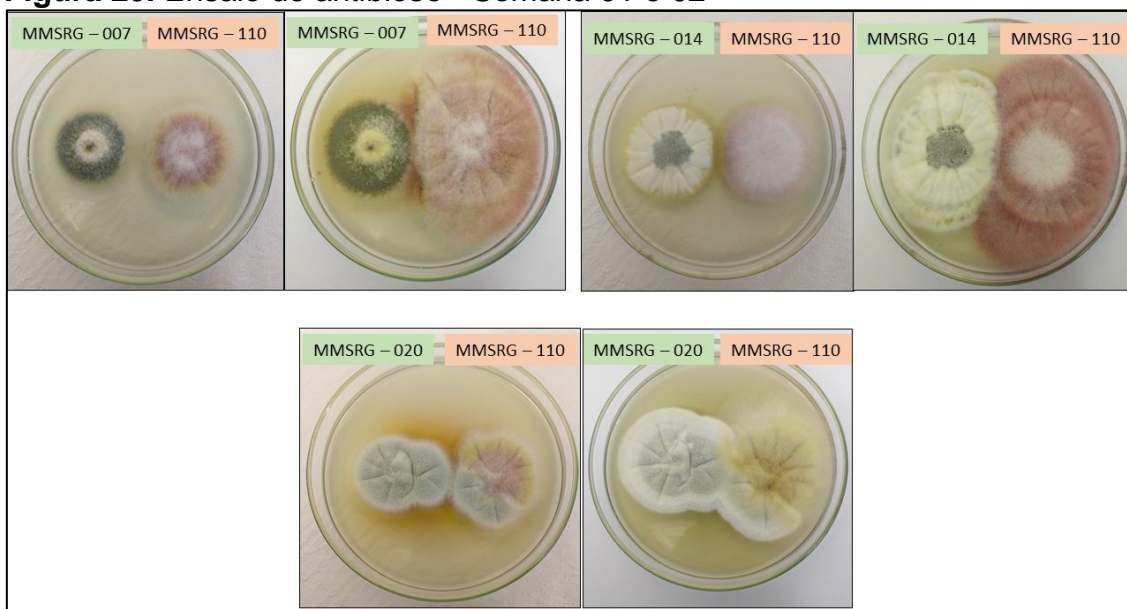
Fonte: Natural Products Atlas, 2021.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

##### 4.1. Atividade de antibiose de MMSRG-020 (*Penicillium* sp.)

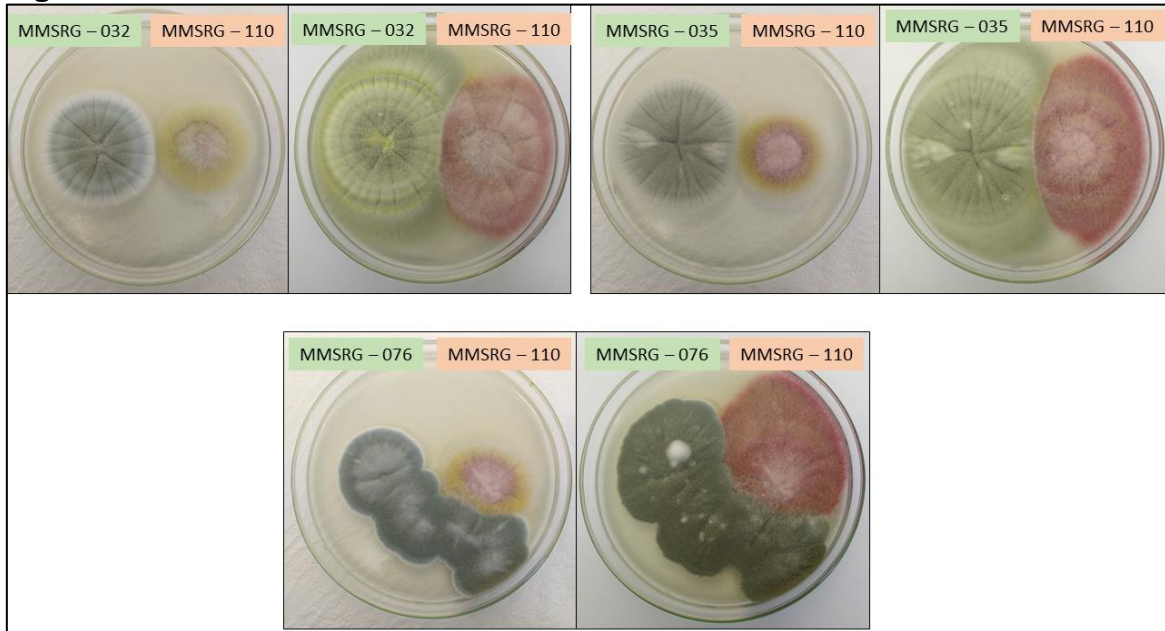
Após a realização dos ensaios de antibiose e através dos registros por fotos (figuras 20 e 21) foi possível evidenciar dentre os seis fungos submetidos ao ensaio que apenas um deles, o fungo MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) apresentou uma atividade de antibiose, mais especificamente de micoparasitismo.

**Figura 20.** Ensaio de antibiose - Semana 01 e 02



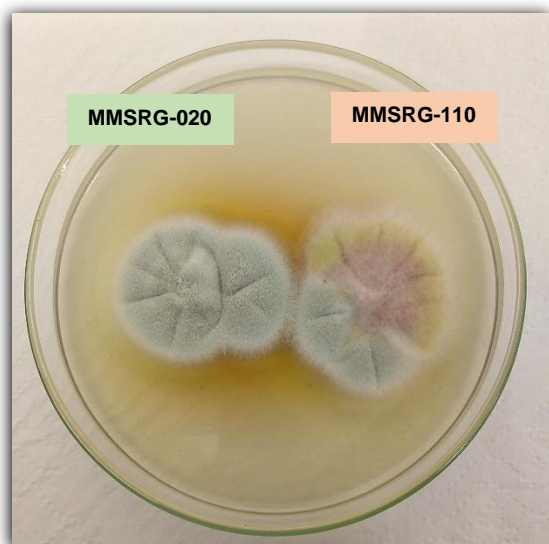
Fonte: Dados do autor, 2021.



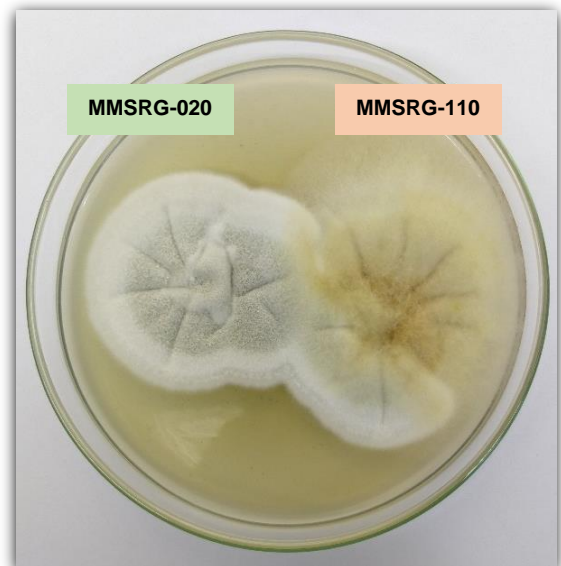
**Figura 21.** Ensaio de antibiose - Semana 01 e 02

Fonte: Dados do autor, 2021.

Foi possível observar que durante o seu desenvolvimento o micélio do fungo se estendeu até a área onde o fitopatógeno *Fusarium decemcellulare* (MMSRG-110) foi inoculado. Com isso o fungo se aproximou o suficiente para iniciar um processo denominado de micoparasitismo, que segundo Savita & Sharma (2019) é considerado um processo de antagonismo direto, no qual o patógeno, neste caso, um fungo fitopatógeno, é morto por outro fungo. Os autores também denominam este processo como hiperparasitismo.

**Figura 23.** Primeira semana de antibiose

Fonte: Dados do autor, 2021.

**Figura 22.** Segunda semana de antibiose

Fonte: Dados do autor, 2021.

É conhecido como exemplo de micoparasitismo a ação do fungo *Ampelomyces quisqualis* que reduz o crescimento das colônias de outros fungos através do hiperparasitismo e eventualmente matando esses microrganismos através da produção de picnídia (corpo de frutificação) dentro do oídio, uma fitopatologia causada por fungos da ordem Erysiphales (CARBÓ *et al.*, 2020).

Ao fim do experimento foi constatado que o fungo MMSRG-020 obteve sucesso ao inibir o desenvolvimento do fitopatógeno, fato que pôde ser constatado através do registro fotográfico observando-se a perda progressiva de uma das principais características do fungo *Fusarium decemcellulare*, a coloração vermelho-carmim de seu micélio (figura 22), o que certamente ocorreu devido ao processo parasitário desenvolvido pelo fungo MMSRG-020.

#### 4.2. Tratamento de dados obtidos por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR)

Através das análises por espectrometria de massas foi possível estabelecer um comparativo entre os diferentes meios de cultura analisados. Constatou-se similaridades e diferenças entre os cromatogramas em cada meio preparado. Analisando o perfil químico das amostras com o auxílio do software XCalibur™ pôde-se identificar a presença de picos cromatográficos indicativos da presença de metabólitos secundários. Em todos os meios foi possível identificar certas similaridades entre os valores dos picos, indicando que certas substâncias podem estarem sendo produzidas nos diferentes meios de culturas.

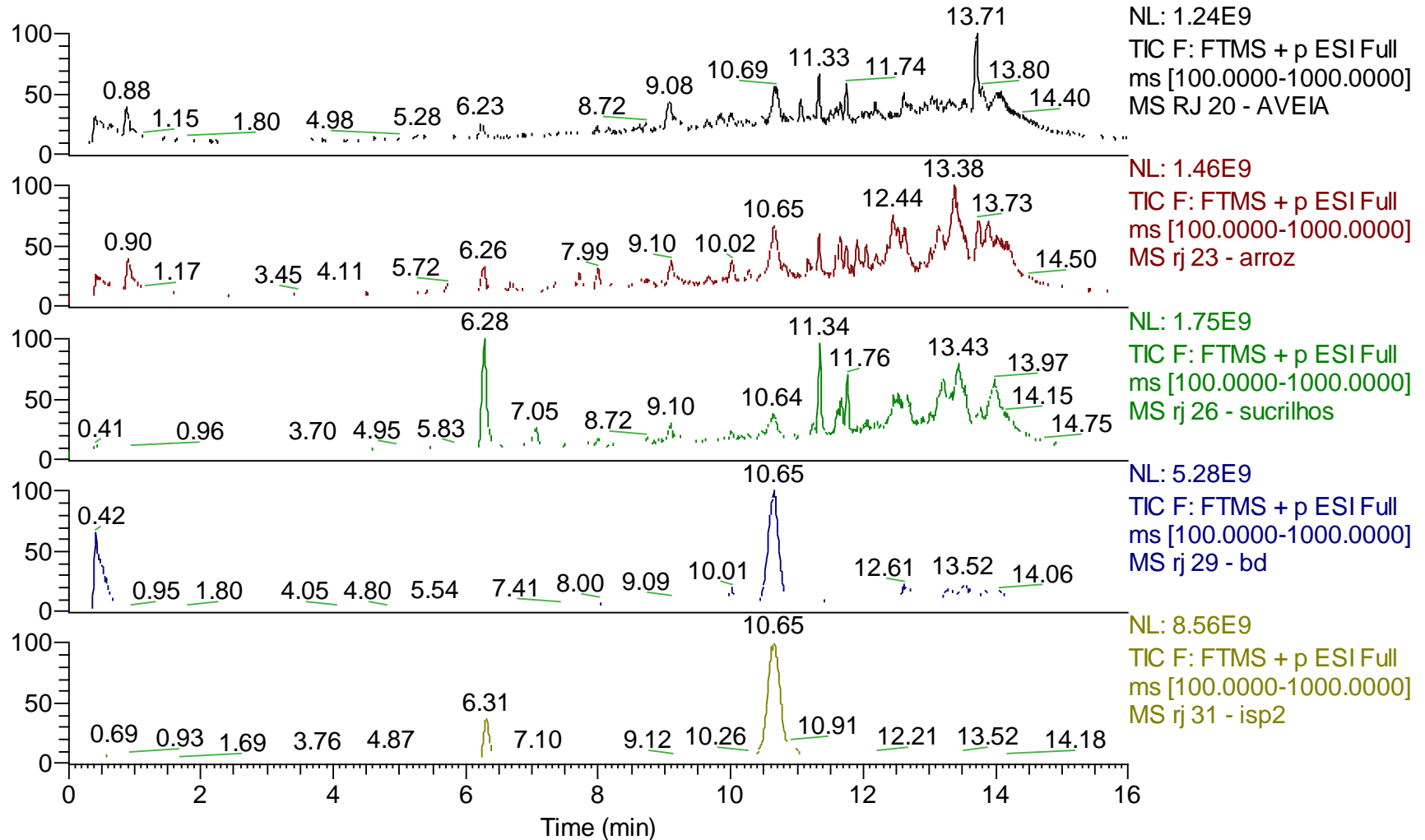
A partir da análise dos perfis químicos em sua totalidade é possível evidenciar que o meio arroz (RJ 23) foi um dos meios em que se observou uma grande diversidade de picos cromatográficos, o que poderia ser um indicativo da presença de substâncias de interesse. Também foi identificado nos meios arroz (RJ 23) e sucralhos (RJ 26) picos como o de 6.28 minutos. Outro pico similar é o de 11.34 minutos, presente nos meios aveia (RJ 20) e sucralhos (RJ 26), respectivamente. Essas semelhanças podem apontar possibilidades para a presença de substâncias comuns entre esses meios.

Os meios líquidos BD (RJ 29) e ISP2 (RJ 31) foram os dois meios dentre todos os analisados que não apresentaram uma alta variedade de picos, em contrapartida nos meios semissólidos observa-se uma ampla variedade de picos cromatográficos,

indicando que os meios sólidos podem ser boas fontes de carbono para a produção de possíveis metabolitos secundários fúngicos. Faz-se necessário salientar que ao comparar estes picos cromatográficos quanto aos seus espectros de massa é possível identificar valores de massas similares, o que também pode indicar a presença de substâncias de interesse comuns nos diferentes meios de cultura (Figura 24).

**Figura 24.** Cromatogramas obtidos em diferentes meios de culturas da amostra MMSRG-020 (*Penicillium* sp.)

RT: 0.00 - 16.00

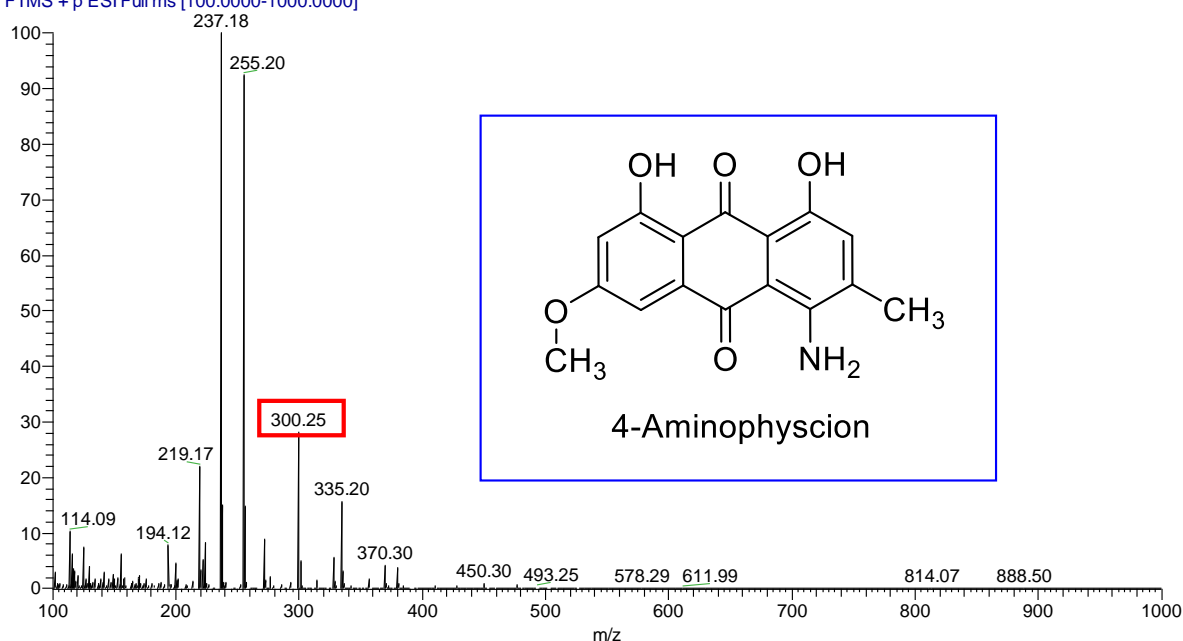


Fonte: Dados do autor, 2021.

A partir da análise do cromatograma no tempo de retenção 6.28 min, foi possível identificar a presença de um constituinte de massa 300.2 ( $m/z$ )  $[M+H]^+$ . Esse íon molecular encontra-se presente em todas as amostras de meios de cultura analisados. A partir do valor da massa molecular (299.2 g/mol), obtido da equação da massa monoisotópica foi possível propor a estrutura para a presente molécula através do banco de dados presente no *Natural Products Atlas*. Através das buscas foi possível identificar uma molécula com valor de massa 299.2 ( $m/z$ ), a molécula 4-Aminophyscion ( $C_{16}H_{13}NO_5$ ) (Figura 25).

**Figura 25.** Espectro de massas da substância 1 ( $m/z$  299.2), Tr 6.28 min – Meio Arroz.

rj 23 - arroz #1670 RT: 6.28 AV: 1 NL: 7.75E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]



Fonte: Dados do autor, 2021.

Esta molécula foi identificada pela primeira vez em 1987 como um produto natural isolado do fungo *Dermocybe canaria* (ordem Agaricales) (figura 26), sendo ainda relatada como a primeira antraquinona de origem fúngica que contém em sua estrutura química um grupo amino. (KELLER & STEGLICH, 1987).

**Figura 26.** *Dermocybe canaria* coletado na Nova Zelândia



**Fonte:**VirtualMycota, 2009.

Em linhas gerais as antraquinonas e seus derivados são importantes pigmentos que ocorrem naturalmente em plantas superiores, líquens e fungos. Essa subclasse de substância possui diversas atividades biológicas, tais como: citotóxicas, antifúngicas e antivirais (FREIRE *et al.*, 2010). Tal fato ressalva a presença e a importância desta molécula como um produto natural do metabolismo secundário do fungo MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) e ainda sua importância, tendo em vista que é a primeira vez que esta molécula é identificada e relatada no gênero *Penicillium*. Do ponto de vista de atividades biológicas sabe-se muito pouco a respeito desta molécula e quais atividades bioativas esta pode desempenhar, entretanto, vale considerar que esta pode contribuir de forma promissora para diversos ensaios, incluindo antifúngico, entretanto, para isso faz-se necessário um estudo mais aprofundado a respeito da mesma neste microrganismo.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos deste trabalho foi possível evidenciar o fungo MMSRG-020 (*Penicillium* sp.) como um potencial agente biológico capaz de parasitar o fitopatógeno *Fusarium Decemcellulare* através do processo de hiperparasitismo, o que pode demonstrar uma alternativa a mais no combate de fungos fitopatogênicos que acometem culturas de importância econômica como o guaranazeiro. A identificação da antraquinona 4-Aminophycion pela primeira vez no gênero *Penicillium*, demonstra uma descoberta que pode corroborar para a utilização desta

molécula como um produto natural capaz de desempenhar importantes atividades biológicas. No entanto, para tal faz-se necessário um estudo mais aprofundado a cerca desta molécula presente no fungo MMSRG-020, o que pode levar a outras descobertas quanto as bioatividades presentes na mesma.

## 6. REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, G.C. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. Cabi, 2008.
- ALBERTI, F.; FOSTER, G.D.; BAILEY, A.M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 493-500, 2017.
- ALVES, N.M. *Paraconiothyrium*: identification, biological control and tropical forage grass performance. p. 21, 2018.
- ANKE, H. Insecticidal and nematicidal metabolites from fungi. In: **Industrial Applications**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 151-163, 2011.
- AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, p.1-7, 2018.
- BATISTA, M. F.; BOLKAN, H. A. O superbrotamento do guaranazeiro. **Embrapa Amazônia Ocidental-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 1982.
- BOREL, J. F. Immunological properties of ciclosporin (Sandimmune®). In: Advances in Immunopharmacology: Proceedings of the Third International Conference on Immunopharmacology, Florence, Italy, 6-9 May 1985. **Elsevier**, p. 239, 2016.
- BORUTA, Tomasz; BIZUKOJC, Marcin. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 34, 2017.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL I.B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; SCHURE, E.T.; BOVEN, A.V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; Hansen, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87-97, 2012.
- CALIXTO, C. M. F; CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. **Química Nova na escola**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.
- CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n. 3, p. 237-246, 2007.
- CAMPBELL, C.D.; VEDERAS, J.C. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 755-763, 2010.
- CARBÓ, A.; TORRES, R.; USALL, J.; BALLESTA, J.; TEIXIDÓ, N. Biocontrol potential of *Ampelomyces quisqualis* strain CPA-9 against powdery mildew: Conidia production in liquid medium and efficacy on zucchini leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 267, p. 109337, 2020.



CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; EVIDENTE, A. Phytotoxic terpenes produced by phytopathogenic fungi and allelopathic plants. **Natural product communications**, v. 9, n. 3, p. 401-408, 2014.

DE ARAÚJO, J. C. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M. R. O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. **Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico**, 2006

DE QUEIROZ, C. A.; DA SILVA MATOS, K.; LOBO, I. K. C.; DE SOUSA, S. B.; MUNIZ, C. R.; BELEZA YAMAGISHI, M. E.; ZOCOLO, G.J.; HANADA, R.E.; GASPOROTTO, L.; SOUSA, N.R.; ANDRADE, E.V.; CORDEIRO, I.B.C.; MELO, A.A.M.; DA SILVA, G. F. Morpho-anatomical and molecular characterization of the oversprouting symptoms caused by *Fusarium decemcellulare* in guarana plants (*Paullinia cupana var. sorbilis*). **Tropical Plant Biology**, v. 13, p. 274-286, 2020

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 3<sup>a</sup> ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2009, 539 p.

DING, G.; LI, Y.; FU, S.; LIU, S.; WEI, J.; CHE, Y. Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. **Journal of natural products**, v. 72, n. 1, p. 182-186, 2009.

FELNAGLE, E.A.; JACKSON, E. E.; CHAN, Y. A.; PODEVELS, A. M.; BERTI, A. D.; MCMAHON, M. D.; THOMAS, M.G. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 2, p. 191-211, 2008.

FREIRE, F.; VIEIRA, Í.; SILVA NETO, P. A. F. Produção de antraquinonas por espécies de *Dichotomophthora*. In: **Embrapa Agroindústria Tropical-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 6., 2010, Brasília. Anais. Brasília: Sociedade Brasileira de Micologia, p. 149-150., 2010.

GOHAR, U.F.; MUKHTAR, H., NAWAZ, A., & MEHMMOOD, A. Studies on the Physical Parameters for Cephalosporin Biosynthesis from *Acremonium chrysogenum* by Submerged Fermentation. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 3, p. 913, 2019.

GONZALEZ, G. D. T; SIGRIST, R.; PAULO, B. S. Avanços recentes na manipulação genética de organismos para a produção de peptídeos não ribossomais. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p.1998-2025, 2016.

GUPTA, P.K. Toxicity of fungicides. In: **Veterinary toxicology**. Academic Press. p. 569-580, 2018.

GUPTA, V.G.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (Ed.). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Penicillium* system properties and applications. **Elsevier**, p. 20-27, 2018.

GUU, J. R.; JU, Y. M.; HSIEH, H. J. Bionectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. **Botanical Studies**, 2010.

HOUBRAKEN, J; SAMSON, R.A.; YILMAZ, N. Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its significance for biotechnology. ***Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era***, p. 1-15, 2016.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, T.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. ***Mycological research***, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HYDE, K.D.; XU, J.; RAPIOR, S.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; NIEGO, A. G. T.; STADLER, M The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. ***Fungal Diversity***, p. 1-136, 2019.

KAVANAGH, K. (Ed.). ***Fungi: biology and applications***. John Wiley & Sons, 2017.

KELLER, Gerwin; STEGLICH, Wolfgang. 4-aminophycion, an anthraquinone derivative from *Dermocybe* (Agaricales). ***Phytochemistry***, v. 26, n. 7, p. 2119-2121, 1987.

KITAOKA, N.; LU, X.; YANG, B.; PETERS, R. J. The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-Sesquiterpene and Diterpenoid Metabolism. ***Molecular Plant***. v. 8, n. 1, p. 6-16, 2015.

KUMAR, A. et al. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Penicillium*. In: ***New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering***. Elsevier, 2018. p. 47-68

LI, J. Y. et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. ***Phytochemistry***, v. 56, n. 5, p. 463-468, 2001.

LI, Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Cytochalasin H2, a new cytochalasin, isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. A23. ***Records of natural products***, v. 6, n. 2, p. 121-126, 2012.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. ***Annual review of genetics***, v. 50, p. 371-392, 2016

MAIA, L.C.; CARVALHO JR. Fungos do Brasil. In: Forzza, R.C. et al. (orgs.). Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol.1. **Andrea Jakobsson Estúdio /Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. P. 43-48, 2010.

MARINHO, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. D. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an

endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 280-283, 2005.

MATUSCHEK, M.; WALLWEY, C.; XIE, X.; LI, S.M. New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 9, n. 11, p. 4328-4335, 2011.

MEDRADO, H.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BRANDÃO, H. N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q.; & PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

*Paullinia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20914>>. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

PEÑALOZA, E.; Holandino, C.; Scherr, C.; de Araujo, P. I.; Borges, R. M.; Urech, K.; BAUMGARTNER, S.; Garrett, R. "Comprehensive Metabolome Analysis of Fermented Aqueous Extracts of *Viscum album* L. by Liquid Chromatography– High Resolution Tandem Mass Spectrometry." **Molecules**, p. 2-5, 2020.

PEREIRA, A.L; PITA, J.R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6, 2018.

PEREIRA, J. C. R. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental**, p. 40, 2005.

REGUEIRA, T.B; KILDEGAARD, K. R., HANSEN, B. G.; MORTENSEN, U. H.; HERTWECK, C.; NIELSEN, J. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 9, p. 3035-3043, 2011.

RICHARDS, T.A.; LEONARD, G.; WIDEMAN, J.G. What defines the "kingdom" fungi?. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 5.3. 23, 2017.

RUBENICK, J.B; DOS SANTOS, M. R.; LAPORTA, L. V.; DOS SANTOS, T. S.; RUBIM, A. M. Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de griseofulvina matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 243-249, 2013.

SALEEM, T.S.M.; RAVI, V.; GAUTHAMAN, K.; SAISIVAM, S. Microbial production and OSMAC study of *Streptomyces* species coded as G-16. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1, n. 2, p. 57-60, 2009.

SANA, Barindra et al. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 208-215, 2006.

SAVITA; SHARMA, A. Fungi as biological control agents. In: **Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment**. Springer, Cham, 2019. p. 395-411

SCHIPPLING, S. Fingolimod (Gilenya®). In: Translational Neuroimmunology in Multiple Sclerosis. **Academic Press**, p. 261-269, 2016.

SHUKLA, N.; SINGH, E. A. N. A.; KABADWA, B. C.; SHARMA, R.; KUMAR, J. PRESENT Status and Future Prospects of Bio-Agents in Agriculture. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 8, n. 4, p. 2138-2153, 2019.

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

STEPHENSON, S. L. The kingdom fungi: The biology of mushrooms, molds, and lichens. **Timber Press**, 2010.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002.

SUNDARRAM, A; MURTHY, K.  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

TAKAHASHI, J.A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017  
TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.

TUDZYNSKI, B. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 597-611, 2005.

UDAYANGA, LIU, X.; MCKENZIE, E. H.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 50, n. 1, p. 189, 2011.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A.

Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: biology and applications**, p. 1-35, 2017.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. Cambridge university press, 2007.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150-160, 1969.

YANG, FENG, P.; YIN, Y.; BUSHLEY, K.; SPATAFORA, J. W.; WANG, C. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. **MBio**, v. 9, n. 5, 2018.

ZHENG, Y; CAO, S.; HUANG, Y.; LIAO, G.; HU, C. Overexpression of LaeA enhances mevastatin production and reduces sporulation of *Penicillium citrinum*. **Acta microbiologica Sinica**, v. 54, n. 12, p. 1438-1445, 2014.