



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA NORMAL SUPERIOR

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FERNANDA ADRIELLE DA SILVA ROCHA

**MINERAÇÃO GENÔMICA E ANÁLISE METABOLÔMICA DE *Talaromyces* sp.,
GÊNERO FÚNGICO ORIUNDO DO BIOMA AMAZÔNICO**

MANAUS – AM

2023

FERNANDA ADRIELLE DA SILVA ROCHA

**MINERAÇÃO GENÔMICA E ANÁLISE METABOLÔMICA DE *Talaromyces* sp.,
GÊNERO FÚNGICO ORIUNDO DO BIOMA AMAZÔNICO**

Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas para obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas.

MANAUS – AM

2023

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.

R672m Rocha, Fernanda Adrielle da Silva
Mineração genômica e análise metabolômica de
Talaromyces sp., gênero fúngico oriundo do bioma
amazônico / Fernanda Adrielle da Silva Rocha. Manaus :
[s.n], 2023.
54 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.
Inclui bibliografia
Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen

1. Talaromyces. 2. Mineração gênica. 3. metabólitos.
I. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orient.). II.
Universidade do Estado do Amazonas. III. Mineração
genômica e análise metabolômica de Talaromyces sp.,
gênero fúngico oriundo do bioma amazônico

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA ADRIELLE DA SILVA ROCHA

**MINERAÇÃO GENÔMICA E ANÁLISE METABOLÔMICA DE *Talaromyces* sp.,
GÊNERO FÚNGICO ORIUNDO DO BIOMA AMAZÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas para obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em 08 de março de 2023.

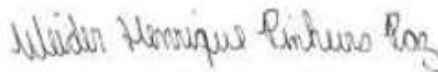
Banca examinadora:



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen (Membro da Banca)
Orientador - UEA



Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior (Membro Titular) UEA



Prof. Dr. Weider Henrique Pinheiro Paz (Membro Titular)

Ao meu pai, Francisco Rocha e à minha mãe,
Maria das Graças, que sempre me apoiaram, e
juntos trabalharam para que eu pudesse chegar ao
presente momento.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e pela graça de poder todos os dias recomeçar.

Agradeço à minha mãe, Maria das Graças, que dedicou grande parte de sua vida a mim, e me apoiou em todos os momentos, e ao meu pai, Francisco Rocha, que junto a ela me incentivou a prosseguir com os estudos, sendo ele a minha maior inspiração.

Agradeço ao meu amigo e companheiro de vida, Rozildo Pereira da Silva, que sempre acreditou em mim, e junto aos meus pais, trabalhou arduamente para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos.

Agradeço aos meus amigos, Prof. Dr. Ítalo Rocha e Prof. Samaroni Corrêa, que me incentivaram a seguir nas ciências durante o período do meu ensino médio.

Agradeço ao meu orientador e grande mentor, Prof. Dr. Hector Koolen, que me acolheu em seu grupo de pesquisa e me deu a oportunidade de desenvolver minhas aptidões, sempre se mostrando paciente e disposto a me ajudar.

Agradeço ao grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da Universidade do Estado do Amazonas, em especial: Brenda Espara, Aline dos Santos, Aline Adrião, Kathiane Rebouças, Weider Paz, Carlos Vinicius da Silva e Moysés de Araújo, que sempre me auxiliaram, e estiveram ao meu lado nos momentos que mais precisei.

Agradeço aos meus professores da graduação, em especial às professoras Dra. Larissa Kirsch e Dra. Luciane Lopes, e ao professor Dr. Leandro Dutra, que juntos ao meu orientador, me incentivaram, inspiraram e me aconselharam ao longo de todo o curso.

Agradeço às minhas companheiras da graduação, Fernanda Amaral, Lorena Sarmiento e Lieda Gadelha, que me acolheram na turma e tornaram esta trajetória ainda mais bonita.

EPÍGRAFE

“Gostaria apenas de aproveitar este momento para dizer a todas as jovens que sonham em ter a ciência como profissão: Vá em frente. É o melhor trabalho do mundo. E se alguém disser que você não pode, não dê ouvidos.”

Amy Farrah Fowler

RESUMO

Os microrganismos constituem um distinto grupo de seres vivos com elevada capacidade metabólica. Dentre eles, fungos do gênero *Talaromyces*, destacam-se pela sua capacidade de biossintetizar compostos de interesse biotecnológico. Com o objetivo de conhecer as vias metabólicas relacionadas à produção de compostos bioativos, bem como identificar as regiões gênicas responsáveis pelas suas biossínteses, este trabalho se propôs em investigar o genoma de *Talaromyces* sp., tal como determinar a melhor condição de cultivo para a produção de metabólitos. Desta maneira, a linhagem *Talaromyces* sp. MMSRG104 foi submetida ao cultivo através da técnica *One Strain and Many Active Compounds*. Os extratos obtidos foram analisados através da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, e os resultados foram submetidos à plataforma *Global Natural Products Social Molecular Network*. Em seguida realizou-se a extração de DNA, de acordo com o protocolo CTAB e o material genético obtido foi sequenciado através do método Illumina paired-end 150 pb. Por fim, realizou-se a mineração gênica por meio da plataforma *fungiSmash* versão 6.1.1, além do software *Geneious* e da ferramenta *BlastP* (NCBI). Como resultados metabolômicos, foi possível identificar a melhor produção de metabólitos no meio Extrato de Malte, além de desreplicar cinco moléculas da classe dos policetídeos. A mineração gênica revelou trinta e três clusters gênicos biossintéticos (BCG's), sendo eles: 4 peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente, 2 terpenos, 13 policetídeos, 10 peptídeos não ribossomais, 1 indol, e duas mistas, sendo 1 terpeno-policetídeo e 1 peptídeo não ribossomal-policetídeo. Finalmente, através do levantamento bibliográfico foi possível relacionar um cluster à produção de anidridos maleicos, associando-o à biossíntese de cordianidridos, além de associar enzimas homólogas à síntese da purpactina A. Concluiu-se que a análise metabolômica juntamente à mineração do genoma da linhagem *Talaromyces* sp. contribuiu para revelar seu potencial biossintético, além de ter possibilitado por meio das investigações a elucidação da biossíntese de compostos de interesse. Por fim, se ratifica a necessidade de manuseio de outras ferramentas de bioinformática mais refinadas para o estudo de BCG's ainda desconhecidos, para fornecer maior precisão nas propostas de rotas biossintéticas.

Palavras-chave: *Talaromyces*, mineração gênica, metabólitos.

ABSTRACT

Microorganisms make up a distinct group of living beings possessing a high metabolic capacity. Among them, the fungal genus *Talaromyces* stands out because of its ability to biosynthesize compounds of biotechnological interest. To learn about the metabolic pathways related to the production of bioactive compounds, as well as the gene regions responsible for their biosynthesis, this work proposed to investigate the genome of *Talaromyces* sp., as well as to determine the best cultivation condition for the production of metabolites. In this way, the *Talaromyces* sp. was submitted to cultivation through the *One Strain and Many Active Compounds* technique. The extracts obtained were analyzed using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry, and it submitted the results to the *Global Natural Products Social Molecular Network* platform. It subsequently performed DNA extraction, according to the CTAB protocol. In turn, its genome was sequenced using the Illumina paired-end 150 bp method. The *fungiSmash* version 6.1.1 platform, the *Geneious* software, and the *BlastP* tool (National Center for Biotechnology Information) enabled us to carry out gene mining. As metabolomic results, it was possible to identify the best production of metabolites in the Malt Extract medium and dereplicate five molecules of the polyketide class. The mining gene revealed thirty and three biosynthetic gene clusters (BCG's), being them: 4 ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, 2 terpenes, 13 polyketides, 10 nonribosomal peptides, 1 indole, and two mixed, 1 terpene-polyketide, and 1 nonribosomal peptides-polyketide. At last, through the bibliographic survey, it was possible to relate a cluster to the production of maleic anhydrides, associating it with the biosynthesis of cordianhydrides, in addition to associating homologous enzymes with the synthesis of purpactin A. The metabolome analysis with the mining of the genome of *Talaromyces* sp. led to the conclusion of the contribution to revealing its biosynthetic potential, in addition to having made possible, through investigations, the elucidation of the biosynthesis of interest compounds. Therefore, it is ratified the need for handling other more refined bioinformatics tools for the study of still-unknown BCG's, to provide greater precision in the proposals of biosynthetic routes.

Keywords: *Talaromyces*, genome mining, metabolites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Eletromicrografias representando organismos pertencentes ao Reino Fungi. A) Fungo unicelular do tipo leveduriforme; B) Fungo multicelular apresentando suas estruturas reprodutivas.....17
- Figura 2:** Aspectos morfológicos característicos do gênero *Talaromyces*. Na imagem, o gênero é representado por *T. stiptatus*, onde: A) Colônias tripontuais em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura; B) Textura da colônia; C) Ascomatas de *Talaromyces*; D) Ascus em formato oval.....19
- Figura 3:** Representação de compostos produzidos por *Talaromyces*. Na imagem, *Talaromyces rugulosus* cultivado em placa de Petri contendo o meio CYA e ao lado, a estrutura molecular da rugulosina A, sintetizada por esta espécie.....21
- Figura 4:** Outros compostos biossintetizados pelo gênero *Talaromyces*. A) *T. atroroseus* em placa de Petri contendo o meio CYA e estrutura do composto N- glutamil monascorubramina, sintetizado por esse. B) *T. pupurogenus* cultivado em placa de Petri contendo o meio CYA e a respectiva molécula sintetizada, roussoellol C.....22
- Figura 5:** Esquema representado as possíveis abordagens a partir do cultivo de microrganismos e sua triagem por meio da mineração de genoma.....23
- Figura 6:** Comparação dos cromatogramas referentes aos cinco meios de cultura utilizados no cultivo de *Talaromyces* sp. Na imagem é possível observar um maior número de picos nos meios extrato de malte, BDL e ISP2, respectivamente representados pelos números 4, 5 e 1. Onde: 1: meio BDL líquido; 2: meio Czapeck modificado; 3: extrato de carne; 4: extrato de malte; 5: ISP2.....30
- Figura 7:** Imagem representando a rede molecular 3, e a estrutura química da molécula correspondente, Purpactina A.....31
- Figura 8:** Imagem referente a rede molecular 5, apresentando as duas moléculas desreplicadas, sendo estas: ergocromona AD e ácido secalônico, concomitantemente.....32
- Figura 9:** Imagem referente a rede molecular 8, e a estrutura molecular da referida molécula, sendo essa o Cordianidrido A.....33
- Figura 10:** Imagem referente a rede molecular 11 e as respectivas estruturas de suas moléculas, Cordianidrido A metil éster e 7 - (4-But-1-enyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-furan-3-ylmethyl) - 4,5 - dicarboxy-non-5-enoic acid, respectivamente.....33
- Figura 11:** Análise de sintenia entre os genes do cluster 93 de *Talaromyces* sp. e o cluster relacionado em *Paestaliopsis*, de acordo com a plataforma de mineração *fungiSMASH*.....37

Figura 12: Identificação dos genes presentes na região 93.1 de acordo com a ferramenta *BlastP* (NCBI). Onde, em cinza: outros genes; vermelho: gene-co; rosa: genes biossintéticos adicionais; azul: genes relacionados ao transporte.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura utilizados na abordagem <i>OSMAC</i> para o cultivo de <i>Talaromyces</i> sp.....	25
Tabela 2: Identificação dos íons moleculares que apresentaram compatibilidade com a plataforma GNPS e seus respectivos grupos.....	34
Tabela 3: Identificação dos clusters biossintéticos de <i>Talaromyces</i> sp., apresentando as classes e o percentual de similaridade de seus respectivos compostos.....	35
Tabela 4: Identificação dos genes constituintes da região 93.1 de acordo com o NCBI e sua relação com os genes descritos na literatura.....	39

LISTA DE ABREVIACÕES

- ACAT – (do inglês, *acyltransferase inhibitor*), inibidor aciltransferase;
- BCG – (do inglês, *Biosynthetic Gene Cluster*), Cluster gênico biossintético
- BDL – Batata dextrose líquido;
- BVO – *Baeyer- Villiger oxidase*,
- CYA – (do inglês, *Czapeck Yeast extract Agar*), Ágar Czapeck extrato de levedura
- GNPS – (do inglês, *Global Natural Products Social Molecular Networking*), Rede molecular social de produtos naturais globais;
- GST – (do inglês, *Glutathione S-transferase*), Glutathiona S- transferase;
- HPLC – (do inglês, *High-performance liquid chromatography*), Cromatografia líquida de alta performance;
- MCO – (do inglês, *Multicopper oxidase*), Multicobre oxidase;
- ISP2 – (do inglês, *International Streptomyces Project – 2*);
- NCBI – (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*), Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia;
- NR-PKS – (do inglês, *Non-reducing polyketide*), Policetídeo não redutora.
- NRPS – (do inglês, *non- ribosomal peptides*), Peptídeos não ribossomais;
- OSMAC – (do inglês, *One Strain, Many Active Compounds*); Uma linhagem, vários compostos ativos;
- PKS – (do inglês, *poliketides*), Policetídeos;
- RiPP – (do inglês, *Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*) Peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionais;
- R.T – (do inglês, *retention time*), tempo de retenção;
- SMT – (do inglês, *S- adenosylmethionine-dependent methyltransferase*), dependente de S-adenosilmetionina metiltransferase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. Diversidade microbiana na região Amazônica	17
3.2. Fungos	17
3.3. O gênero <i>Talaromyces</i>	19
3.4. Metabólitos de <i>Talaromyces</i>	21
3.5. Mineração de genoma	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Local de estudo	25
4.2. Microrganismo	25
4.3. Reativação e cultivo do microrganismo	25
4.4. Obtenção dos metabólitos	27
4.5. Análise cromatográfica dos extratos obtidos	27
4.6. Extração de DNA	28
4.7. Mineração de genoma e identificação dos clusters gênicos biossintéticos	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Análise do cultivo através da técnica OSMAC	28
5.2. Análise metabolômica através das redes moleculares	31
5.3. Análise da mineração gênica	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos constituem um distinto grupo de seres microscópicos, que habitam os mais variados ambientes (TORTORA, 2017). Dentre eles, os fungos do gênero *Talaromyces* se destacam em virtude de suas singulares características biológicas e de suas admiráveis atividades bioativas, que resultam em promissoras substâncias e compostos bioativos de relevância biotecnológica (LEE *et al.*, 2020).

Embora a busca por essas moléculas bioativas de origem microbiana tenha crescido nos últimos anos, o desconhecimento do potencial genômico presente em *Talaromyces*, bem como suas inexploradas vias metabólicas envolvidas na produção desses compostos, impossibilita a elucidação das substâncias e dos compostos produzidos por elas. Assim, a utilização das ferramentas de bioinformática para mineração gênica de microrganismos de interesse, se torna essencial para a otimizar a descoberta de novos produtos de origem natural (ZIEMERT *et al.*, 2020).

Em vista das inúmeras aplicações dos compostos de origem microbiana, mais precisamente as substâncias produzidas por bactérias do gênero *Talaromyces*, é imprescindível a busca por mecanismos de rápida descoberta e baixo custo-benefício. Desta maneira, evidencia-se a importância e a necessidade de se realizar a mineração genômica em microrganismos para desvendar compostos, elucidar suas estruturas, além de fornecer ferramentas de estudos dos produtos naturais.

Com isso, sabendo que grande parte da diversidade microbiana que se concentra em território amazônico ainda não foi explorada. Além disso, levando em consideração as potencialidades químicas e os efeitos biológicos existentes em moléculas biossintetizadas por esses organismos, é incontestável a relevância de se estudar esses organismos, tal como os produtos naturais produzidos por esses, levando em consideração os aspectos da biologia molecular, bioquímica desses microrganismos.

Dessa forma, o presente trabalho justifica-se por investigar o potencial biotecnológico de *Talaromyces* sp., organismo isolado do bioma amazônico, na tentativa de elucidar moléculas e colaborar com novas informações a respeito da química e da genômica dessa nova espécie, principalmente no que diz respeito à identificação de genes das vias metabólicas relacionadas à produção dessas substâncias e compostos em questão que, assim como as moléculas já descritas na literatura, também podem apresentar grande valor econômico e elevado impacto social e biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar o perfil genômico e metabolômico de uma linhagem fúngica, *Talaromyces* sp. por meio da mineração genômica e seus constituintes químicos, a fim de identificar clusters gênicos responsáveis pela biossíntese de compostos bioativos.

2.2. Objetivos específicos

- Instigar a produção de compostos bioativos através da diversificação das condições nutricionais no cultivo de *Talaromyces* sp.;
- Determinar as substâncias e/ ou compostos químicos produzidos através do cultivo a partir de redes moleculares;
- Caracterizar os principais clusters biossintéticos de *Talaromyces* sp.;
- Elucidar as principais etapas de biossíntese metabólica responsáveis pela produção de substâncias e/ou compostos bioativos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Diversidade microbiana na região Amazônica

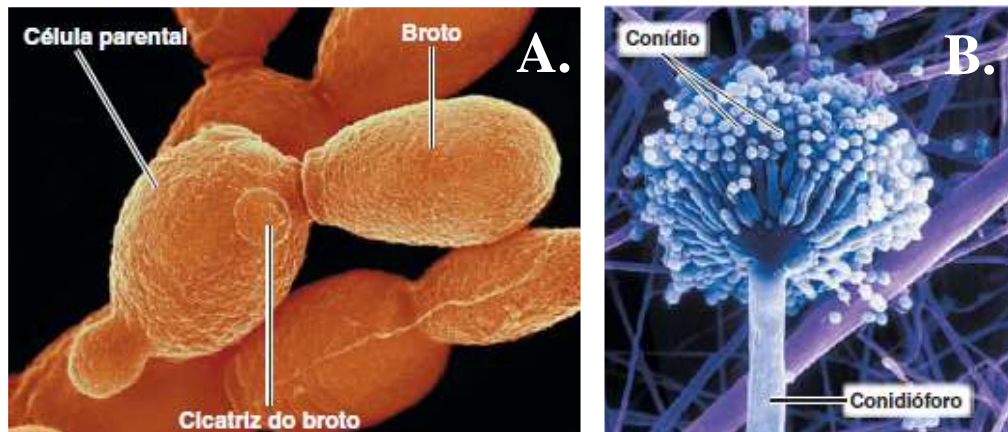
Os microrganismos são impressionantes seres microscópicos, que habitam os mais variados ambientes (TORTORA, 2016). Esses indivíduos exibem um complexo de características que agregam a biodiversidade planetária, e os tornam um grupo de criaturas singulares e ainda pouco conhecidas. Sabe-se que o Brasil dispõe da maior biodiversidade mundial, onde grande parte dessa variedade biológica se encontra em território amazônico (SOUZA *et al.*, 2004). Embora se tenha o conhecimento sobre essa expressiva e fascinante biodiversidade, muitas espécies que compõem o bioma amazônico ainda são desconhecidas.

Dentre a diversidade biológica existente nesse bioma, encontram-se os fungos e bactérias, que dispõem do clima quente e úmido da Amazônia, beneficiando a proliferação desses seres (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Um dos principais aspectos sobre esses organismos são as suas múltiplas habilidades metabólicas, que permitem serem aptos a processarem seus alimentos dos mais diversos modos, como de maneira autotrófica, heterotrófica ou até mesmo quimio-heterotrófica. Além disso, suas impressionantes capacidades adaptativas e evolutivas, contribuem para a existência deles nos mais variados habitats que compõem o território amazônico (MADIGAN, 2016). Esses microrganismos são detectados em várzeas, igapós, nos principais rios Amazônia e até mesmo terra firme, sejam presentes no solo ou associados às plantas. Outro ponto em questão é que no meio desses microrganismos, os fungos se evidenciam em virtude de suas curiosas e singulares características biológicas, além de suas admiráveis potencialidades químicas, que tem ganhado cada vez mais destaque nas últimas décadas devido às suas possíveis e promissoras inserções no ramo da biotecnologia.

3.2. Fungos

Os fungos são seres peculiares e microscópicos que constituem o reino Fungi. Esses organismos são classificados como indivíduos eucarióticos e heterotróficos, e podem se apresentar de forma unicelular (leveduras), ou multicelular/ filamentosos (figura 1), (bolores e cogumelos) (TORTORA, 2016).

Figura 1- Eletromicrografias representando organismos pertencentes ao Reino Fungi. A) Fungo unicelular do tipo leveduriforme; B) Fungo multicelular apresentando suas estruturas reprodutivas.



Fonte: Adaptado de Tortora, 2017.

Apesar de comumente associados a doenças e pragas, diversas interações fúngicas interespecíficas, além das antagonicas, são atualmente descritas, sendo elas também de caráter neutro, ou até mesmo simbiótico. Dentre essas relações que os fungos podem exercer, a interação simbiótica na qual o microrganismo habita no interior de tecidos vegetais, sem ocasionar aparentemente doenças e malefícios à sua planta hospedeira (KUSARI *et al.*, 2012), dita como endofítica, tem ganhado grande destaque.

Os fungos têm se destacado pelos benefícios que proporcionam às diversas espécies de plantas, fornecendo às suas hospedeiras, vantagens nos meios onde estas estão inseridas, como: proteção de patógenos, herbívoros e outras pragas, bem como contribui para a resistência ao estresse e para o crescimento vegetal (PEIXOTO *et al.*, 2004). Ainda, estimulam a produção de substâncias bioativas, oriundas tanto do metabolismo primário, quanto do metabolismo secundário desses microrganismos, como enzimas, pigmentos e micotoxinas (SOUZA *et al.*, 2004).

Devido a extraordinária capacidade que os fungos endofíticos têm de sintetizarem diversificados compostos de diferentes naturezas biológicas, dentre elas: antibióticas, antioxidantes, imunossupressoras e até mesmo citotóxicas (CHAPLA *et al.*, 2013), a busca por produtos naturais de gênese microbiana, mais especificamente, de origem fúngica, torna esses organismos promissoras fontes de inovações biotecnológicas.

Além disso, a riqueza de compostos é bastante evidente, tendo em vista que uma linhagem microbiana pode produzir diversos metabólitos bioativos. Ademais, em virtude da demasiada diversidade química, bem como os diversificados efeitos biológicos gerados por esses compostos ativos biologicamente, torna ainda mais estes microrganismos endofíticos

essenciais para a descoberta de produtos com significativa importância econômica, e claro, com o elevado potencial biológico (ZHANG *et al.*, 2006).

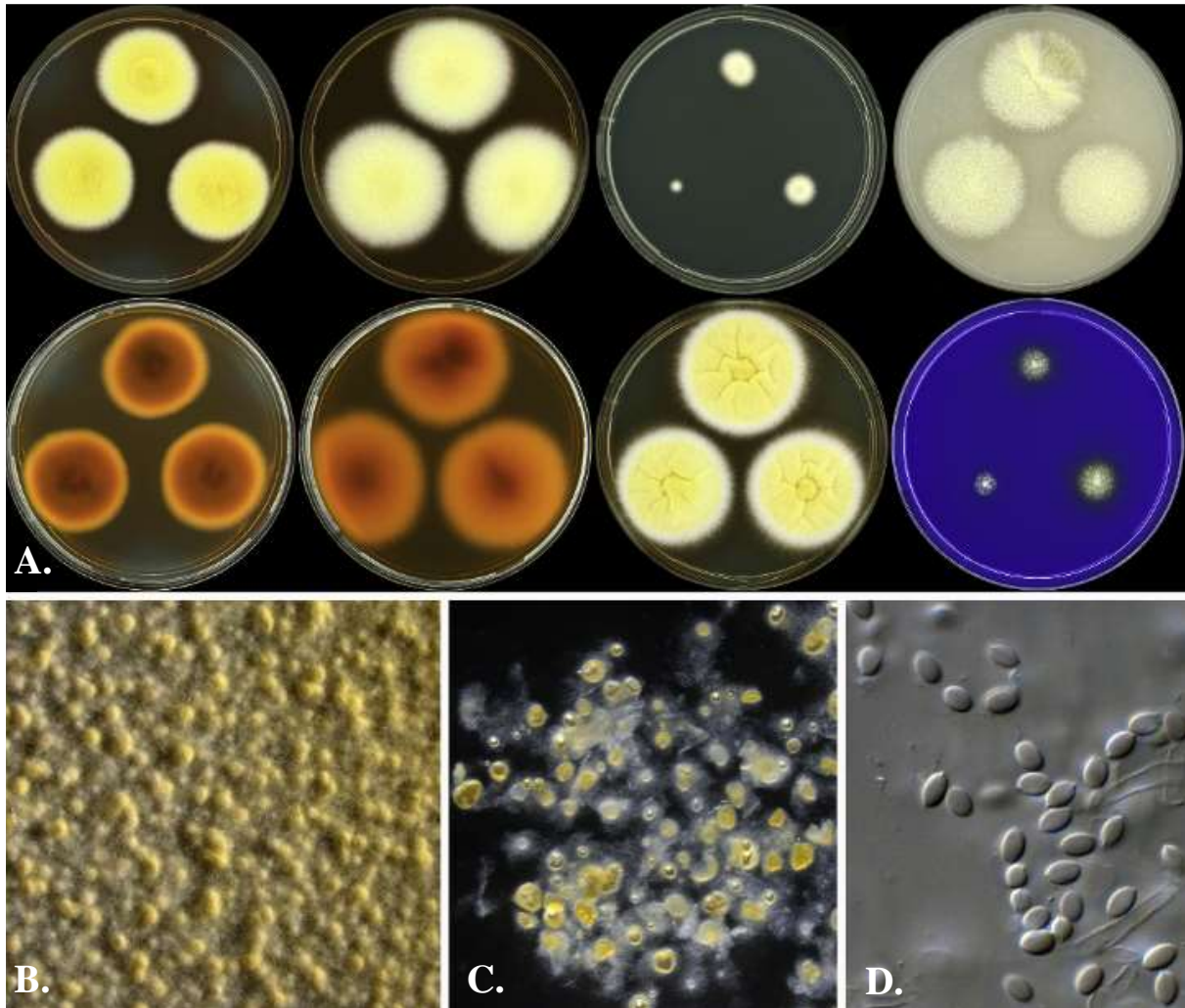
Embora os fungos endofíticos se apresentem como uma fonte confiável e próspera de produtos naturais com elevada capacidade química e efeitos biológicos a serem aplicados em diversos setores, esses seres ainda são poucos estudados e, conseqüentemente, poucos explorados (KOOLEN *et al.*, 2012). Por esta razão, a necessidade de novos produtos naturais à disposição da sociedade em consequência dos impactos ambientais gerados, além da resistência adquirida à determinados medicamentos, bem como na aparição de novos agentes causadores de doenças, etc., (STROBE *et al.*, 2004) tornam a busca por moléculas inéditas de fonte microbiana altamente atraente e promissora.

3.3.O gênero *Talaromyces*

O gênero *Talaromyces* foi descrito em 1955 por Benjamin. Esse gênero é pertencente ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales e família *Trichomaceae*, e foi inicialmente apresentado como um estado sexual (teleomorfo) do gênero *Penicillium*. Dessa forma, *Talaromyces* teria a capacidade de produzir seus esporos tanto no seu ciclo de vida sexuado quanto assexuado, diferentemente dos fungos ditos como anamorfos como o próprio *Penicillium*, na qual a produção de esporos se restringe apenas à reprodução assexuada (SAMSON *et al.*, 2011). No entanto, estudos filogenéticos recentes revelaram que o gênero está disposto em um clado distinto de *Penicillium*, sugerindo que *Talaromyces* se tratava de um gênero diferente (YILMAZ *et al.*, 2014).

Dentre as principais características morfológicas do gênero *Talaromyces*, estão a presença de ascocarpos de paredes moles, ascos com o formato comumente ovado ou globoso, além de que a sua coloração micelial varia entre amarelo, laranja e pode chegar a se apresentar com a coloração avermelhada, e suas hifas septadas e entrelaçadas (figura 2). Sabe-se que muitas espécies do gênero *Talaromyces* foram descritas como medicamento importantes, devido aos efeitos patogênicos que algumas espécies possuem (YILMAZ *et al.*, 2014).

Figura 2- Aspectos morfológicos característicos do gênero *Talaromyces*. Na imagem, o gênero é representado por *T. stiptatus*, onde: A) Colônias tripontuais em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura; B) Textura da colônia; C) Ascomatas de *Talaromyces*; D) Ascospores em formato oval.



Fonte: Adaptado de Ylmaz et al., 2014.

Ainda, o gênero se destaca em decorrência de sua estimada capacidade em biossintetizar uma gama de compostos bioativos oriundos de seu metabolismo secundário, que expressam elevado valor biotecnológico. Dentre os principais compostos relatados em *Talaromyces*, estão: alcaloides, peptídeos, lactonas e policetídeos. Tais atividades como antifúngica, antibacteriana e até mesmo citotóxica já foram anteriormente relatadas dentro do gênero. Assim, os efeitos biológicos provenientes de seus metabólitos já relatados contribuem para que este gênero se denote como uma fonte valiosa de interesse de estudo (ZHAI *et al.*, 2016).

3.4. Metabólitos de *Talaromyces*

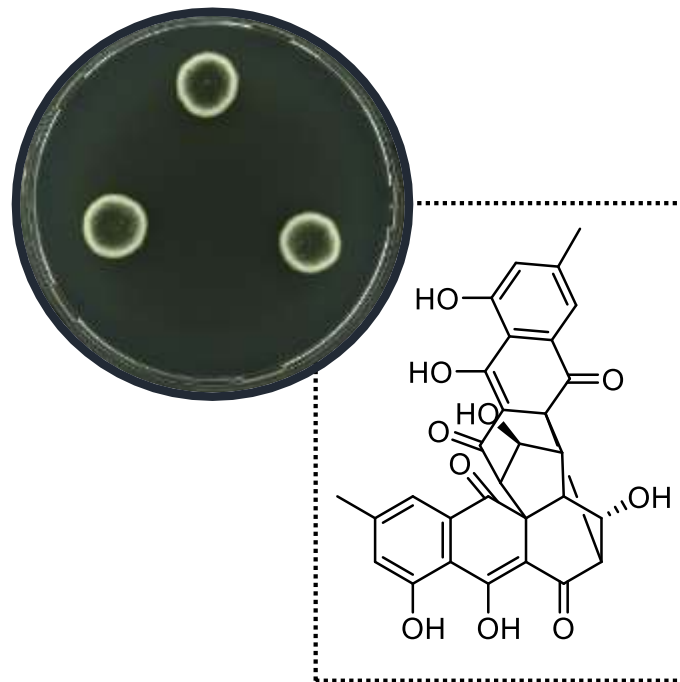
Microrganismos de maneira geral são capazes de produzir moléculas com atividades biológicas provenientes dos seus metabolismos primário e secundário. Os compostos associados ao metabolismo primário, como as proteínas e carboidratos, por exemplo, são desenvolvidas pelo organismo para fins de sobrevivência e são indispensáveis para os processos vitais desses indivíduos. Já a síntese dos compostos de origem metabólica secundária, são geralmente desencadeados quando há escassez de nutrientes no meio em que o organismo está inserido (DEWIK, 2008).

Ainda que a produção de metabólitos secundários seja mais restrita a certos seres e sobre determinadas condições, os compostos do metabolismo secundário são conhecidos pela sua capacidade de promover ao organismo, vantagens competitivas no meio onde este se encontra, seja de modo a contribuir para a defesa do indivíduo no ambiente, ou ainda, promover atrativos para a mesma ou para diferentes espécies (DEWIK, 2008).

Sabendo dessa competência, os produtos naturais são definidos como qualquer substância ou composto químico oriundo de qualquer organismo presente na natureza. Mais precisamente, essas substâncias e compostos são caracterizadas por possuírem um baixo peso molecular e estão intimamente associadas ao metabolismo secundário do organismo. Os produtos naturais também podem expressar um importante valor socioambiental, econômico, e claro, biotecnológico (GARCIA *et al.*, 2012).

Ainda, as variadas combinações químicas resultantes do arsenal metabólico desses seres, acarretam às classes de produtos naturais as mais variadas estruturas e um amplo espectro de atividades químicas, tal como diversos efeitos biológicos. No gênero *Talaromyces*, diversos são os compostos de interesse já foram relatados. A exemplos de compostos já isolados no gênero estão os derivados de xantona, como ácidos secalônico e talaroxantona, moléculas caracterizadas com atividades citotóxicas (ZHAI, 2016). Ainda, as espécies *T. rugulosus* e *T. wortmanni* já foram descritas como organismos produtores de rugulosina A, um pigmento bis-antraquinoide que expressa a atividade antibacteriana, contribuindo especialmente ao combate de bactérias como *Staphylococcus aureus* (HAN *et al.*, 2021; YLMAZ *et al.*, 2014).

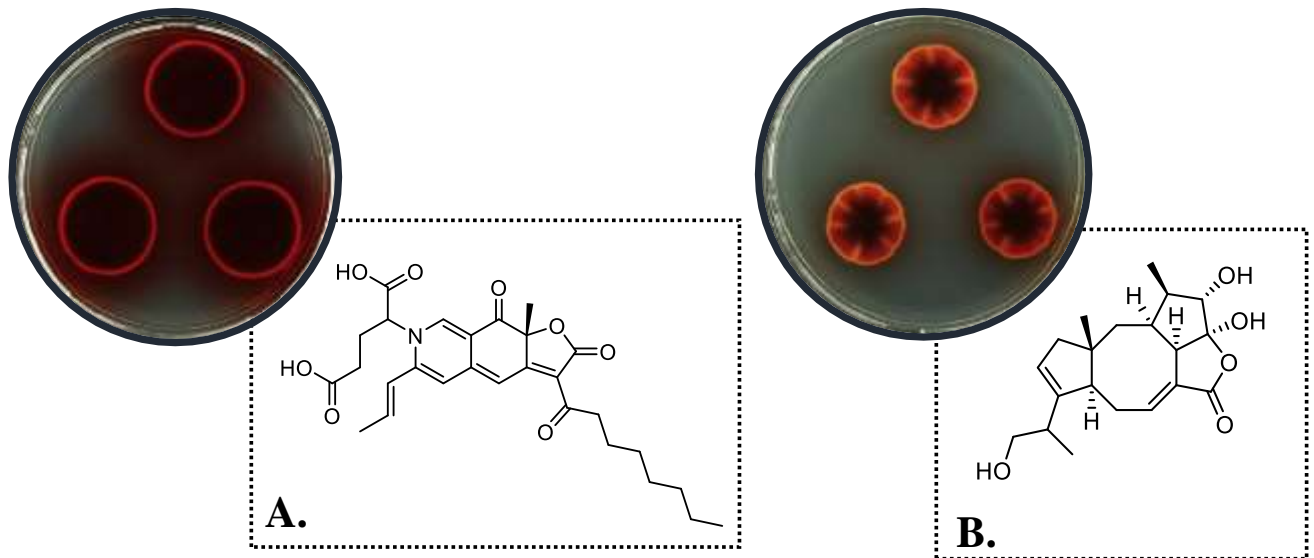
Figura 3- Representação de compostos produzidos por *Talaromyces*. Na imagem, *Talaromyces rugulosus* cultivado em placa de Petri contendo o meio CYA e ao lado, a estrutura molecular da rugulosina A, sintetizada por esta espécie.



Fonte: Adaptado de Ylmaz et al., 2014.

Outros pigmentos como azafilonas e monascorubramina, que também exibem atividade microbiana e de interesse comercial na indústria de corantes, concomitantemente, também já foram retados no gênero (LEBEAU, *et al.*, 2020). Em relação às atividades citotóxicas, pode ser mencionada a molécula roussoellol C, terpenoide sintetizado por *T. purpurogenus*, que se mostrou como um aliado ao combate de células carcinogênicas da mama (QUIU *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2018). Com tais bioatividades já registradas, é inegável que o gênero *Talaromyces* possua potencialidades de elevado interesse científico, sendo necessário o desenvolvimento estudos acerca da composição química e da biossíntese de compostos bioativos.

Figura 4- Outros compostos biossintetizados pelo gênero *Talaromyces*. A) *T. atroroseus* em placa de Petri contendo o meio CYA e estrutura do composto N- glutamil monascorubramina, sintetizado por esse. B) *T. pupurogenus* cultivado em placa de Petri contendo o meio CYA e a respectiva molécula sintetizada, roussouellool C.



Fonte: Adaptado de Ylmaz et al., 2014.

3.5. Mineração de genoma

Microrganismos são capazes de biossintetizar uma infinidade de compostos orgânicos com propriedades biológicas ativas. E, encontrar uma ferramenta e isolamento dessas substâncias que possua baixo custo e elevada eficiência é essencial para a rápida descoberta desses produtos de interesse. A partir disso, a modernização e o desenvolvimento de novas tecnologias permitiram a consolidação de uma pluralidade de metodologias para o sequenciamento genômico, o que tornou os estudos gênicos mais rápidos e econômicos (LI *et al.*, 2009).

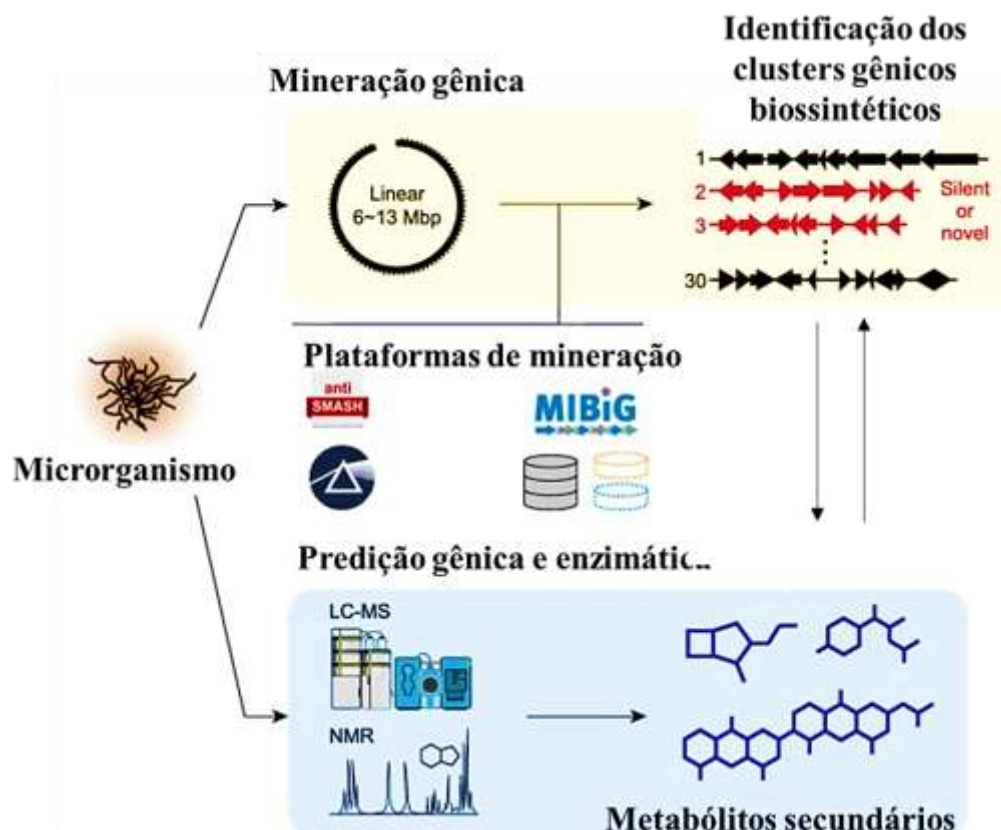
Por esta razão, a conquista de novos compostos e substâncias de origem natural, sejam elas de origem vegetal ou microbiana, têm se tornado cada vez mais oportuna. A exemplo do desenvolvimento tecnológico a partir do sequenciamento gênico está a técnica de mineração de genoma. Esta abordagem consiste basicamente na busca de conjuntos gênicos que são responsáveis pela biossíntese de substâncias bioativas, bem como enzimas codificadoras e até mesmo os produtos contidos nos chamados clusters gênicos (ALBARANO *et al.*, 2020).

Outra principal característica da mineração de genomas é justamente a sua dependência direta da tecnologia computacional e dos mecanismos do campo da bioinformática disponíveis no período de estudo. E, vinculada à biologia sintética, há o

fornecimento de suporte necessário para a mineração gênica no que se diz respeito às identificações dos antecedentes gênicos biossintéticos, tal como os reconhecimentos de possíveis e inéditos produtos naturais (KENSCHOLE *et al.*, 2021).

Por fim, estima-se que milhares de genomas microbianos já sequenciados se encontram dispostos nas mais variadas plataformas de mineração genômica à espera da associação com seus respectivos e codificados produtos naturais (ZIEMERT *et al.*, 2016). E, este fator associado à busca por compostos bioativos para atender as principais emergências do mundo moderno, compreendem a inegável necessidade de se utilizar a mineração genômica para otimizar o processo de prospecção de moléculas, e assim desvendar compostos, de modo a proporcionar ferramentas mais acessíveis e eficazes no estudo dos produtos naturais de origem microbiana (SEKUROVA *et al.*, 2019).

Figura 5- Esquema representado as possíveis abordagens a partir do cultivo de microrganismos e sua triagem por meio da mineração de genoma.



Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, 2020.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é caracterizado como pesquisa experimental explicativa, que visa analisar, identificar e registrar as principais vias metabólicas da nova linhagem de *Talaromyces* sp. oriunda do Bioma amazônico, além de compostos e/ ou substâncias bioativas advindas dessas rotas metabólicas. Ademais, o método de abordagem utilizado para a consolidação deste projeto de pesquisa é definido como hipotético-dedutivo (ANDRADE, 2017).

4.1. Local de estudo

Os experimentos descritos neste projeto foram realizados nos laboratórios Biorgânica e Central analítica do Mestrado em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas.

4.2. Microrganismo

Para a consolidação deste projeto foi utilizada a linhagem fúngica MMSRG-104 (linhagem original: VrTrb2 1.1), organismo previamente identificado como *Talaromyces* sp., com base no seu genoma. Tal microrganismo foi adquirido por meio do isolamento de fragmentos de *Victoria amazonica*, planta encontrada no bioma amazônico.

O fungo foi cedido pela Professora Doutora Antônia Queiroz, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) ao Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), onde atualmente se encontra preservado por meio do método Castellani.

4.3. Reativação e cultivo do microrganismo

O fungo MMSRG-104 previamente preservado através da técnica de Castellani foi inicialmente reativado. O processo de reativação consistiu no inóculo tripontual de fragmentos fúngicos em placa de Petri 60x10mm contendo o meio de cultura batata-dextrose-água em câmara de fluxo laminar. Seguidamente, a placa contendo os fragmentos foi submetida à incubação em B.O.D durante 7 dias, à 28 °C, a fim de se observar o crescimento micelial por toda a dimensão da placa. O processo foi realizado em duplicata.

Após o crescimento fúngico, foi realizado o cultivo por meio da técnica *OSMAC* (*One Strain and Many Active Compounds*), sendo essa caracterizada pela diversificação das

condições de cultivo, visando a produção de compostos diversificados a partir de um dado organismo. Desta maneira, o parâmetro de cultivo variado foi a condição nutricional, ou seja, a linhagem em questão foi submetida a cinco distintos meios cultura.

Assim, repiques de três discos com 8 mm de diâmetros foram inoculados em vidrarias do tipo Erlenmeyer de 125 mL, contendo 65 mL dos meios de cultura selecionados, sendo eles: batata-dextrose-ágar, czapeck modificado, extrato de carne, extrato de malte e ISP2. O cultivo ocorreu por 21 dias, à 28 °C, de modo estacionário e em triplicata.

Tabela 1- Composição dos meios de cultura utilizados na abordagem *OSMAC* para o cultivo de *Talaromyces* sp.

Meio de cultura	Composição
Batata dextrose	Batata (200 g/L) D-glicose anidra (20 g/L) Extrato de levedura (2 g/L)
Czapeck modificado	Cloreto férrico (10 mg/L) Cloreto de potássio (500 mg/L) D-glicose anidra (2 g/L) Fosfato de potássio bibásico (1 g/L) Nitrato de sódio (3 g/L) Sulfato de magnésio (500 mg/L) Sulfato de sódio (10 mg/L)
Extrato de carne	Extrato de carne (20 g/L) D-glicose anidra (20 g/L)
Extrato de malte	Extrato de malte (20 g/L)
ISP2	Amido de milho (4 g/L) Extrato de malte (10 g/L) Extrato de levedura (4 g/L)

4.4. Obtenção dos metabólitos

Após o período de incubação nos referidos meios de cultura, ocorreu o início da extração dos metabólitos de interesse, sendo esta etapa caracterizada pela filtração à vácuo. Para isso, os Erlenmeyers contendo o caldo fermentado foram direcionados à câmara de fluxo laminar, e com o auxílio de uma bomba à vácuo e papel filtro, a fase micelial foi separada do meio líquido.

Dada a separação das fases fúngicas, houve a adição do solvente acetato de etila nos meios líquidos, na proporção 1:1 duas vezes, seguidamente do acréscimo de acetato de etila e isopropanol (9:1). Já as porções miceliais foram tratadas com a adição da mistura de acetato de etila e metanol, na proporção 1:1. Em seguida, ambas as extrações foram submetidas separadamente à rotaevaporação, à 45 °C, entre 50-65 rpm. O extrato concentrado resultante desse processo foi armazenado em frascos de penicilina previamente esterilizados e secos, e finalmente dispostos em dessecador contendo sílica gel para que fossem secos.

4.5. Análise cromatográfica dos extratos obtidos

Para as análises cromatográficas, os extratos foram previamente preparados e transferidos para vials com a capacidade de 1,5 mL e solubilizados com o solvente metanol grau *HPLC*. Posteriormente, as amostras foram direcionadas ao *HPLC-MS*, equipamento composto por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Surveyor (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do tipo quadrupolo, armadilha de íons modelo LCQ-Fleet (Thermo Fisher Scientific).

As ionizações das moléculas ocorreram através da fonte de ionização eletrospray (*ESI*), que operará em modo positivo de polaridade. Os espectros resultantes das análises no *HPLC* foram convertidos para o formato *mzXML* através da plataforma Proteowizard versão 3.0, e foram direcionados à plataforma *Global Natural Products Social Molecular Network* (*GNPS*) através do programa WinSCP para a elaboração de redes moleculares.

Para a organização e manutenção das redes geradas foi utilizado software Cytoscape. A interpretação dos cromatogramas obtidos foi realizada através do software Data Analysis versão 4.2, enquanto que a desreplcação das moléculas previamente conhecidas foi desenhada por meio do software ChemDraw versão 19.0 (LIU *et al.*, 2021).

4.6.Extração de DNA

Para identificar as regiões gênicas relacionadas ao metabolismo secundário do microrganismo em questão, a linhagem fúngica MMSRG-104, previamente identificada como *Talaromyces* sp. foi submetida à extração total de seu DNA e posterior sequenciamento.

O processo de extração ocorreu a partir de um repicada para uma placa contendo meio BDA incubado pelo período de 2 dias a 25°C. Ao passar dos dias, a colônia fúngica foi raspada e submetida a quebra utilizando nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de extração por detergente catiônico CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987). A concentração do DNA foi mensurada por espectrometria (NanoDrop1000) e a integridade visualizada em gel de agarose (0,8%). Uma alíquota do DNA concentrado foi ajustada para a concentração de 50 ng/μL.

4.7.Mineração de genoma e identificação dos clusters gênicos biossintéticos

A partir da extração do material genético do organismo de interesse, foi possível realizar o sequenciamento de seu genoma completo, sendo este obtido por meio do sequenciamento Illumina paired-end de 150 pb. Seguidamente ao sequenciamento, houve a mineração do genoma para a detecção dos clusters biossintéticos através das anotações gênicas utilizando a plataforma *fungiSmash* na versão 6.1.1.

Para a identificação ampla das regiões gênicas correspondente ao metabolismo secundário do microrganismo em questão, foi utilizada a ferramenta Cluster-border prediction based on transcription factor binding sites (CASSIS) da própria plataforma de mineração. A reanotação dos genes de interesse foi realizada através do software *Geneious Prime* VERSÃO 2020.1.2. Finalmente, a predição dos clusters gênicos biossintéticos foi realizada através da ferramenta *BlastP*, na plataforma *NCBI*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Análise do cultivo através da técnica OSMAC

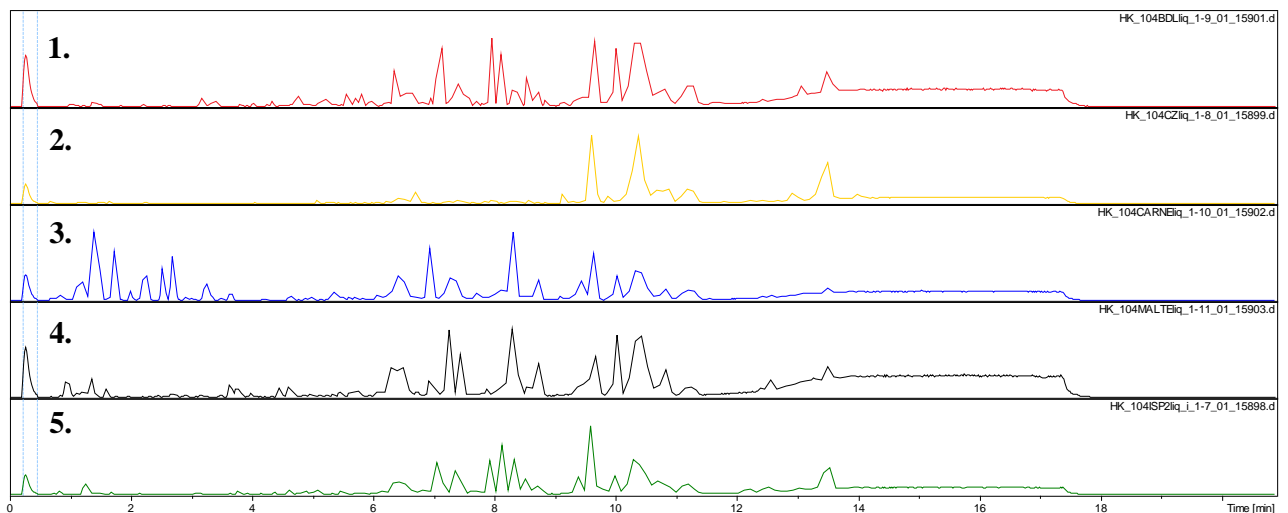
A linhagem fúngica *Talaromyces* sp. denotou crescimento micelial satisfatório em todos os cinco meios de cultura em que foi submetido. Dentre as principais características observadas após o término do período de cultivo estão: a fina camada de micélio de cor amarela sobre o caldo fermentativo, de modo a abranger todo o diâmetro do frasco ocupado, além da mudança de coloração do meio líquido, que se apresentou com o aspecto amarelado mais intenso. Os aspectos morfológicos do gênero *Talaromyces* já foi relatada nos estudos de

Ylmaz e colaboradores (2014), onde é descrito que as espécies do gênero podem apresentar a variação na coloração micelial, que oscila entre o amarelo, laranja e vermelho, a depender da espécie, além do aspecto cotonoso (YLMAZ *et al.*, 2014).

Em relação a implementação da metodologia *One Strain and Many Active Compounds* (OSMAC), que visa a produção de diferentes compostos a partir de uma única linhagem fúngica, e considerada uma aplicação simples e eficaz (BODE *et al.*, 2002), para ativar regiões gênicas de interesse e assim permitir que o organismo consiga expressar compostos (SCHERLACH e HERTWECK, 2009), a partir da observação dos cromatogramas resultantes dos distintos meios de cultura aplicados neste estudo, pode-se inferir que a variação nutricional das condições de cultivo refletiram na produção de compostos produzidos pelo microrganismo em questão.

Isso porque ao comparar os cinco dados cromatográficos referentes a cada um dos meios de cultura proposto (figura 6), foi possível visualizar uma variação na quantidade de picos cromatográficos, bem como uma oscilação na abundância destes compostos ao longo da corrida cromatográfica. Assim, o meio mais expressivo para a produção de compostos por *Talaromyces* sp. foi o meio extrato de malte, onde seu cromatograma se apresenta com a maior quantidade de picos, correspondendo aos compostos ionizados, além da abundância destes no referido substrato.

Figura 6- Comparação dos cromatogramas referentes aos cinco meios de cultura utilizados no cultivo de *Talaromyces* sp. Na imagem é possível observar um maior número de picos nos meios extrato de malte, BDL e ISP2, respectivamente representados pelos números 4, 5 e 1. Onde: 1: meio BDL líquido; 2: meio czapeck modificado; 3: extrato de carne; 4: extrato de malte; 5: ISP2.



Fonte: Rocha, 2023.

Em seguida, os meios batata-dextrose e ISP2 também relevaram uma produção de metabólitos significativa. Ou seja, ao longo de ambos os cromatogramas também é possível observar uma elevada quantidade de íons moleculares, porém, menor quando comparada ao meio de cultura extrato de malte. Outro aspecto que deve ser mencionado é que dentre os cinco meios de cultura, o meio czapeck modificado se denotou com o menor desempenho na produção de substâncias, sendo o seu cromatograma o que possui a menor quantidade de picos e abundância de compostos quando comparado aos demais quatro meios utilizados.

De acordo com Espara (2021), outro aspecto que deve ser mencionado é que os meios de cultura que contém componentes como o extrato de malte, o amido, e a D- glicose, por exemplo, são classificados como meios ricos, fornecendo uma elevada quantidade de carbono, além do nitrogênio, essencial ao fornecimento de nutrientes indispensáveis na síntese de metabólitos fúngicos. No entanto, o caldo czapeck não se apresenta favorável para a produção de compostos, justamente por disponibilizar poucos nutrientes ao microrganismo (ESPARA, 2021).

Tais meios de cultura anteriormente mencionados já foram empregados no cultivo de fungos do gênero *Talaromyces*. Kumari e colaboradores (2018) utilizaram dos meios líquidos para avaliar a produção de compostos bioativos de caráter citotóxico e antioxidante na linhagem *T. purpureogenus*. A partir dos dados cromatográficos, os meios extrato de malte se denotou como um meio ótimo para o crescimento micelial do microrganismo, seguido dos meios batata-dextrose e czapeck, respectivamente.

Sabe-se que o número de genes nos fungos é maior do que os presentes nas bactérias, contudo, grande parte dessas regiões encontra-se silenciada, e que a partir da alteração das condições de cultivo, é possível instigar a produção de compostos bioativos pelo microrganismo (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). Dentro do gênero fúngico *Talaromyces*, a prospecção de compostos bioativos a partir da abordagem OSMAC também já foi empregada. Em estudos de Liu e colaboradores (2016) com a espécie *Talaromyces wortmannii*, que visava produção de compostos da classe policetídeo de potencialidade anti-helmíntica, os resultados também se denotaram satisfatórios.

Assim, neste estudo, a partir das análises de cromatogramas oriundos do *HPLC-MS*, observou-se a produção de distintos metabólitos secundários nos três meios de cultura empregados. Ainda, a aplicação da variação das condições nutricionais no cultivo de *T. wortmannii* favoreceu a revelação de três novas policetídeos (LIU *et al.*, 2016).

Outro exemplo utilizando a abordagem OSMAC na instigação da produção de distintas moléculas por fungos do gênero *Talaromyces* é relatada por Cao e colaboradores (2020). Tal experimento que submeteu a espécie *T. purpureogenus* a alterações nos parâmetros de cultivo contribuiu para a detecção de sete novos terpenoides (CAO *et al.*, 2020). Com isso, pode-se afirmar que a aplicação da metodologia da diversificação das condições nutricionais através do OSMAC auxilia na expressão de distintas regiões gênicas responsáveis por biossintetizar uma gama de substâncias e compostos, otimizando a prospecção de moléculas de interesse biotecnológico (LAN e WU, 2020).

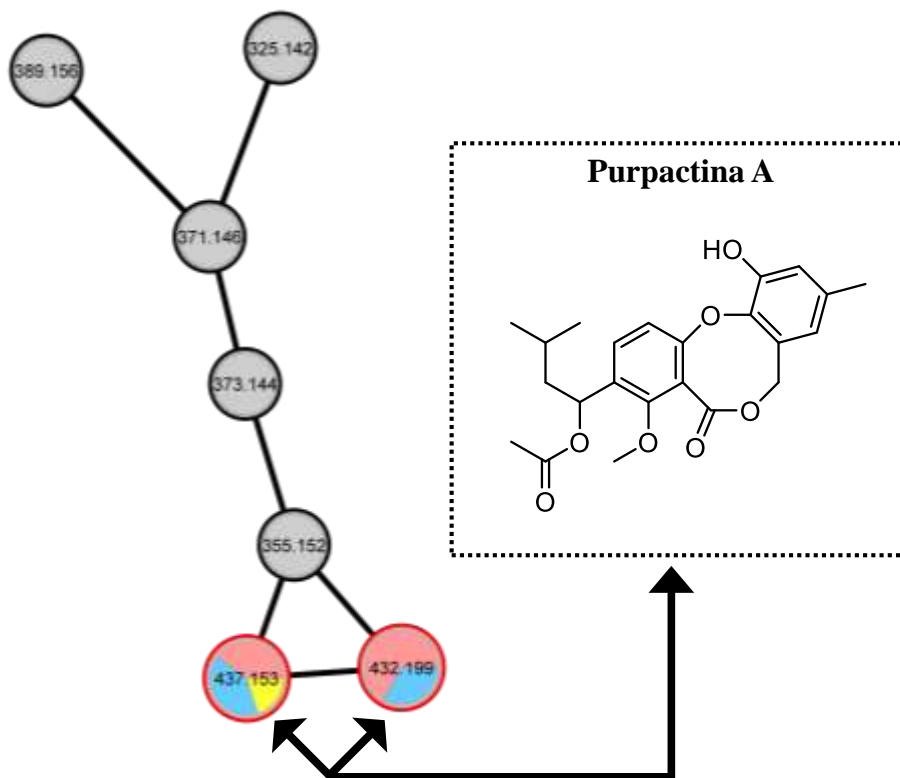
5.2. Análise metabolômica através das redes moleculares

A partir do agrupamento dos dados cromatográficos na plataforma *GNPS* foi possível realizar a desrepliação de compostos por meio do levantamento bibliográfico. Tal agrupamento dos extratos resultantes dos cinco meios de cultura dispostos em distintos grupos, resultou em treze famílias moleculares, onde em apenas quatro destas apresentaram match com as informações químicas dispostas na plataforma, sendo elas: subfamílias três, cinco, oito e onze. A confirmação das informações dispostas no *GNPS*.

A família molecular três apresentou sete nodos, sendo dois deles compatíveis com o banco de dados do *GNPS*. Tais nodos de razão m/z 432.19 $[M + NH_4]^+$, presentes nos extratos resultantes dos meios líquidos batata-dextrose e czapeck, e 437.15 $[M + Na]^+$, encontrado nos meios batata-dextrose, czapeck e ISP2, concomitantemente no tempo de retenção (RT) 9.1 minutos, correspondem à molécula purpactina A, uma dibenzodioxocina que possui massa molecular 414.1 e fórmula química $C_{23}H_{26}O_7$ (HWANG *et al.*, 2020).

Tal composto já foi anteriormente isolado de *Talaromyces* sp. no trabalho de Hwang *et al.* (2020). A purpactina A, molécula da classe policetídeo, foi inicialmente isolada a partir do cultivo de *Penicillium purpurogenum*, apresenta sua estrutura química intimamente relacionada à molécula penicilina, e possui a atividade antimicrobiana, atuando como um inibidor de colesterol aciltransferase (*ACAT*) (HWANG *et al.*, 2020; NISHIDA *et al.*, 1992).

Figura 7- Imagem representando a rede molecular 3, e a estrutura química da molécula correspondente, Purpactina A.



Fonte: Rocha, 2023.

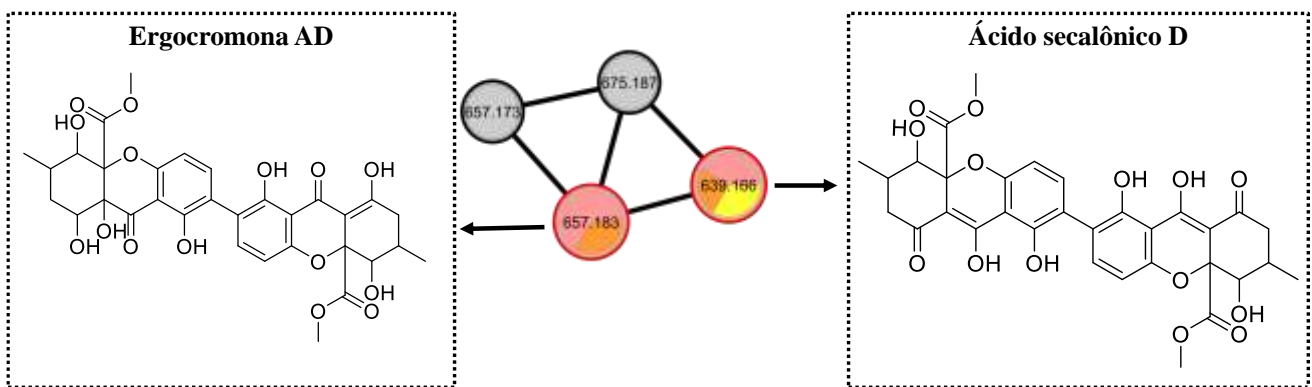
A rede molecular cinco apresentou quatro nodos em sua rede, sendo dois deles compatíveis com informações depositadas no *GNPS*, correspondentes a compostos também da classe dos polícetídeos. Enquanto que o primeiro nodo associado à literatura cuja razão m/z 657.18 $[M + H]^+$ (RT 7.1 minutos), desreplcado como sendo ergocromona da série AD, presente nos extratos oriundos dos meios batata-dextrose e extrato de malte, cujo a fórmula molecular $C_{32}H_{32}O_{15}$ e massa teórica 656.1, o segundo composto identificado na rede como ácido secalônico D, presente nos dois meios já mencionados, além do meio ISP2, de razão m/z 639.16 $[M + H]^+$ (RT. 8.1 minutos), no qual sua massa na literatura encontra-se como 638.1 e fórmula química $C_{32}H_{30}O_{14}$.

Ambos os compostos desreplcados na subfamília cinco já foram anteriormente isolados em *Talaromyces* sp. por Silva e colaboradores (2018), e desreplcados nos estudos de Espara (2021). As ergocromonas consistem em um grupo coletivo de moléculas, dentre as quais os ácidos secalônicos são englobados. Dentre as principais características destas moléculas, estão sua simetria e/ou semi-simetria, e foram inicialmente relatadas em 1906, por Kraft, que isolou tais compostos a partir de *Claviceps purpurea*. A principal atividade

biológica já relatada nas moléculas do tipo ergocromona, é justamente seu efeito citotóxico (MASTERS e BRÄSE, 2012).

Já em relação aos ácidos secalônicos D propriamente ditos, caracterizados especialmente por serem produtos naturais de estruturas diversas, mas que exibem dímeros heterocíclicos oxigenados, já foram observados em diversos organismos além dos fungos, como plantas, líquens, e até mesmo bactérias. No meio das principais atividades biológicas já relatadas em relação a esta molécula, estão: os antivirais, antimaláricos e antitumorais (WEZEMAN *et al.*, 2015).

Figura 8- Imagem referente a rede molecular 5, apresentando as duas moléculas desreplicadas, sendo estas: ergocromona AD e ácido secalônico, concomitantemente.

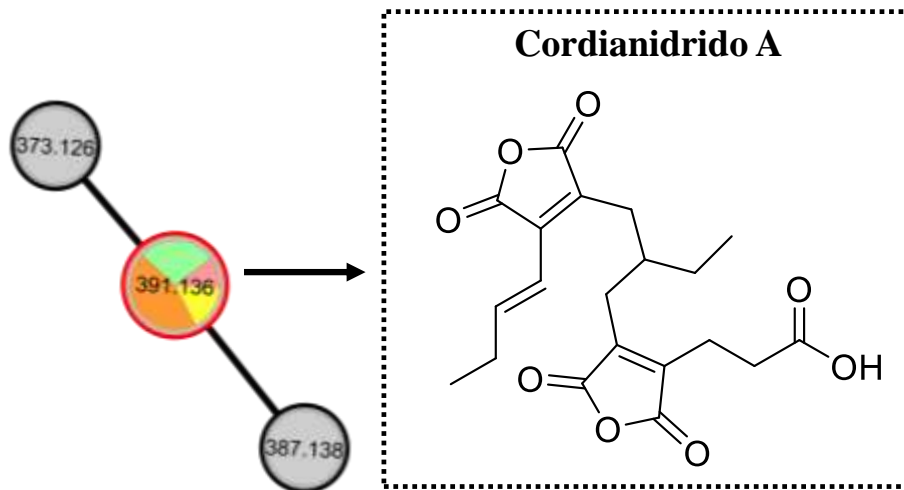


Fonte: Rocha, 2023.

Na rede número oito, constituída por três nós, apenas um apresentou match. A molécula em questão de razão m/z 391,13 $[M + H]^+$ (RT 6.3), cujo a massa molecular teórica e fórmula química são 390.1 e $C_{20}H_{22}O_8$, respectivamente foi identificada como cordianidrido A, estando ela presente apenas no extrato obtido através do meio de cultura extrato de malte.

Este composto já desreplicado por Epara (2021) foi previamente isolado por Isaka e colaboradores (2000). O cordianidrido A, metabólito secundário produzido através do metabolismo do fungo patogênico *Cordyceps pseudomilitaris*, é classificada como um policetídeo do tipo anidro maleico. Tais compostos assim intitulados são considerados na natureza e se caracterizam pela presença de unidades C-9 formais representadas como 2-(1-butenil)-3-metimaleico (ISAKA *et al.*, 2000).

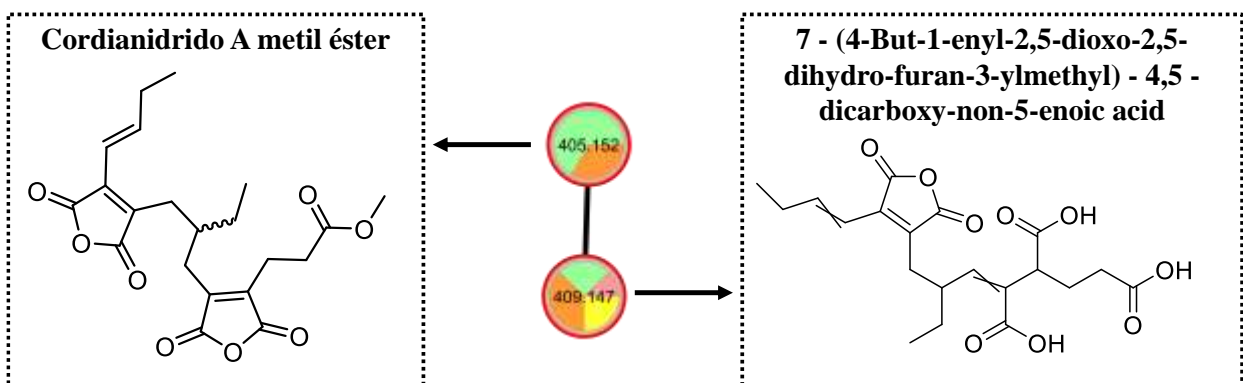
Figura 9- Imagem referente a rede molecular 8, e a estrutura molecular da referida molécula, sendo essa o Córdianidrido A.



Fonte: Rocha, 2023.

Finalmente, a última família anotada, foi a de número 11, composta por dois nodos, ambos apresentando relação com as informações do banco de dados da plataforma. A primeira delas apresenta razão m/z 405,15 $[M + H]^+$ (RT. 7.3), de massa teórica 404.1 e fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_8$, e a segunda de razão m/z 409,14 $[M + H]^+$ (RT. 6.3), apresenta massa teórica 408.14 e fórmula $C_{20}H_{24}O_9$. Ambas também desreplicadas por Espara (2021), sendo identificadas como cordianidrido A metil éster e 7 - (4-But-1-enyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-furan-3-ylmethyl) - 4,5 - dicarboxy-non-5-enoic acid, expressas nos meios extrato de carne e extrato de malte, respectivamente. As duas moléculas em questão correspondem à anidridos maleicos, e estão associadas na literatura à atividade inseticida (SUMARAH *et al.*, 2010).

Figura 10- Imagem referente a rede molecular 11 e as respectivas estruturas de suas moléculas, Cordianidrido A metil éster e 7 - (4-But-1-enyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-furan-3-ylmethyl) - 4,5 - dicarboxy-non-5-enoic acid, respectivamente.



Fonte: Rocha, 2023.

Tabela 2- Visão geral dos íons moleculares que apresentaram compatibilidade com a plataforma GNPS e seus respectivos grupos.

Subfamília molecular	Massa molecular	Grupo identificado	Identificação molecular
3	432.19 [M + NH ₄] ⁺	G1 e G2	Purpactina A
	437.15 [M + Na] ⁺	G1, G2 e G5	
5	657.18 [M + H] ⁺	G1 e G4	Ergocromona
	639.16 [M + H] ⁺	G1, G4 e G5	Ácido secalônico D
8	391.13 [M + H] ⁺	G4	Cordianidrido A
11	405.15 [M + H] ⁺	G3	Cordianidrido A metil éster 7 - (4-But-1-enyl-2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-ylmethyl) - 4,5 - dicarboxy-non-5-enoic acid
	409.14 [M + H] ⁺	G4	

5.3. Análise da mineração gênica

Em relação à mineração de genoma, foram identificados 33 putativos clusters gênicos biossintéticos (BCG's) sendo: 4 peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionais (RiPP), 2 terpernos, 13 policetídeos (PKS), 10 peptídeos não ribossomais (NRPS), 1 indol, e duas mistas, sendo 1 terpeno-policetídeo (terpeno – PKS) e 1 policetídeo não ribossomal – policetídeo (NRPS-PKS).

Dentre essas regiões, somente três denotaram elevada similaridade com clusters de substâncias anteriormente relatadas na literatura, como as moléculas de colina, naftopirona e fusarina, identificadas nas regiões 94.1, 78.1 e 212.1, respectivamente. Tais regiões que contém 100% de homologia, indicam que *Talaromyces* sp. apresenta todos os genes relacionados à biossíntese desses compostos.

Tabela 3- Identificação dos clusters biossintéticos de *Talaromyces* sp., apresentando as classes e o percentual de similaridade de seus respectivos compostos.

Região gênica	Classe	Identificação do Cluster	Percentual de similaridade
3.1	RiPP	-	-
3.2	Terpeno	-	-
6.1	PKS T1	-	-
11.1	NRPS	-	-
14.1	PKS T1	-	-
19.1	PKS T1	Phomoidride	20%
22.1	NRPS	-	-
23.1	NRPS	-	-
25.1	Indol	Chrysoxantone (A, B e C)	26%
29.1	PKS T1	Neosartorin	26%
33.1	PKS T1	-	-
34.1	Terpeno	Squalestatin S1	40%
41.1	RiPP	-	-
46.1	PKS T1	-	-
61.1	NRPS	-	-
61.2	NRPS	-	-
78.1	PKS T1	Aurofusarin	18%
87.1	Terpeno PKS T1	Sordarin	32%
93.1	PKS T1	RES- 1214-2	31%
94.1	NRPS	Choline	100%
103.1	PKS T1	Ankaflavin/ monascin/ rubropuntatine/ monascorubin	8%
105.1	PKS T1 NRPS	-	-
108.1	NRPS	-	-
114.1	NRPS	-	-
117.1	NRPS	UNI- YC2Q1O94PT	100%
137.1	NRPS	Acetylaranoin	20%
142.1	PKS T1	Ankaflavin/ monascin/ rubropuntatine/ monascorubin	12%
158.1	PKS T1	-	-
172.1	PKS T1	Trichoxide	25%
192.1	PKS T1 NRPS	Terrestric acid	37%
202.1	RiPP	-	-
212.1	PKS T1	Fusarin	100%
248.1	RiPP	-	-

Para além, as regiões apresentadas na plataforma de mineração com algum percentual de similaridade, foi realizada uma busca por estes compostos correlacionados com aquelas moléculas anteriormente desreplcadas neste trabalho através dos cromatogramas obtidos por meio de *HPLC-MS* e seus respectivos resultados nas redes moleculares apresentadas. Por esta razão, optou-se por processar as regiões gênicas classificadas como policetídeos, uma vez que os compostos identificados eram pertencentes à esta única classe.

Em dados obtidos a partir da mineração de genoma de *Espara* (2021), foi possível concluir que as regiões 29.1 e 19.1, possuíam alguma relação com as moléculas de ácido secalônico e cordianidridos. No entanto, percebeu-se que tais regiões não apresentavam todas as enzimas necessárias para biossintetizar os compostos relatados. Contudo, ao analisar as regiões 6, 14 e 131, foi possível identificar algumas das principais enzimas envolvidas na formação de cadeias carbônicas relacionadas aos anidridos maleicos, sendo a região 131.1 a mais satisfatória, justamente por exibir as demais enzimas envolvidas na construção da estrutura dos cordianidridos (ESPARA, 2021).

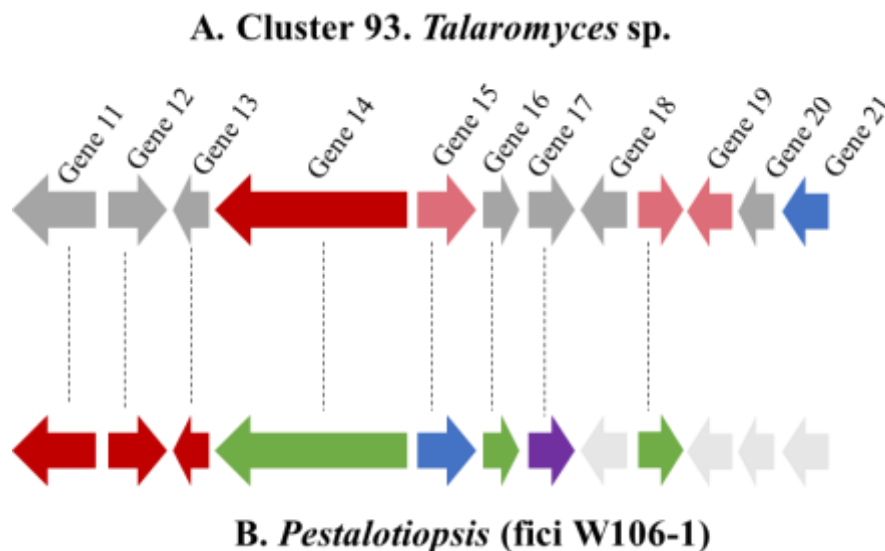
Assim, foi possível associar as principais enzimas identificadas nesta região gênica, com as principais etapas de biossíntese da molécula desreplcada, sendo finalmente proposto uma rota de biossíntese para os cordianidridos do tipo A e B (ESPARA, 2021). Embora a região 131.1 tenha sido sugerida como a responsável por biossintetizar tais compostos aqui igualmente desreplcados, este BCG não foi observado dentre os 33 anotados neste trabalho.

Na tentativa de elucidar novas etapas de biossíntese e identificar as principais enzimas envolvidas na construção dos demais compostos obtidos a partir das redes moleculares, como a purpactina A, foi realizada a mineração de novos BCG's correlatos. No meio das demais porções gênicas classificadas como policetídeos, as regiões gênicas 93.1 e 103.1 foram as de maior interesse de análise. Isso porque ao submeter as informações genéticas dos demais clusters nas plataformas de bioinformática utilizadas, os BCG's anteriormente relacionados foram os que mais apresentaram genes identificados, otimizando a busca pela caracterização e identificação das enzimas ali dispostas.

Enquanto a região 103.1 apresentou 100% de similaridade com o gene principal atuante na síntese da monascorubrina, na qual a análise de sua sintenia revelou cerca de 58% de semelhança aos genes observados em *Talaromyces atroroseus*, a região 93.1 ainda se encontrava descaracterizada, possuindo apenas 35% de similaridade com a molécula tripacidina. E, ao comparar a sintenia, percebeu-se que a região em questão possuía exatos

50% de semelhança entre os genes encontrados em *Pestalotiopsis* (fci W106-1). No entanto, ao realizar o levantamento das informações de bioinformática através da plataforma NCBI acerca dos genes presentes na região 93, foi possível observar que entre os 12 genes que compõem o cluster, dez deles estão associados à *Talaromyces pinophilus*.

Figura 11- Análise de sintenia entre os genes do cluster 93 de *Talaromyces* sp. e o cluster relacionado em *Pestalotiopsis*, de acordo com a plataforma de mineração *fungiSMASH*.



Fonte: Rocha 2023.

A partir disso, realizou-se um levantamento bibliográfico sobre *T. pinophilus* e seus genes atuantes em biossíntese de metabólitos secundários. Embora não se tenha detectado todos as enzimas envolvidas na biossíntese da tripacidina nesta referida região, a busca na literatura sobre este composto revelou uma elevada similaridade com a estrutura da purpactina A, aflatoxinas e aspertecina (THROCKMORTON *et al.*, 2015).

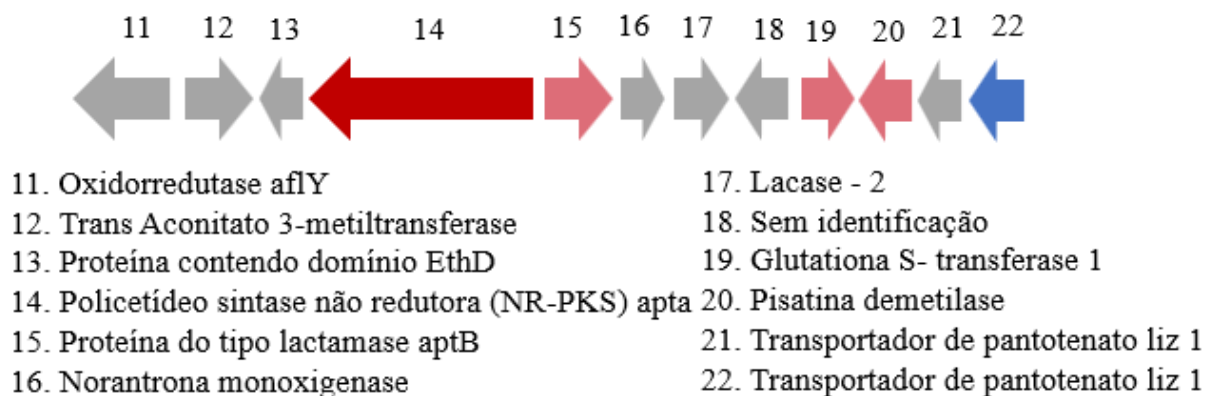
Dentre as principais características compartilhadas por estas estruturas, está produção do metabólito a partir de um esqueleto de antraquinona. Tal formação é decorrente da ação da antrona oxidase, oriunda do gene *hypC*. Ainda, a conversão da antraquinona à benzofenona observada em tripacidinas e em purpactinas A, onde especula-se que esta etapa seja mediada por uma enzima denominada Baeyer Villiger Oxidation (BVO), uma monoxidase que cliva ligações entre carbonos e favorece a conversão de cetonas em ésteres e/ou cetonas cíclicas em lactonas, por exemplo.

Além das enzimas envolvidas ao gene *hypC*, há também a modificação da benzofenona formada, tornando-a uma estrutura de anel fechado, que de maneira enzimática, é mediada por uma enzima multicobre oxidase (MCO) (THROCKMORTON *et al.*, 2015), dentre as quais as lacases correspondem aos membros mais simples envolvidos neste grupo, podendo ser observada no gene 17 da referida região. Tais enzima aqui mencionadas estão presentes na região 93.1 (figura 12, tabela 4).

Ainda que alguns genes do cluster 93 não tenham sido identificados de modo preciso, esses foram correlacionados a outras enzimas que se assemelham quanto à sua função. Um exemplo disso é o gene 12, identificado pela ferramenta *BlastP* como Trans Aconitato 3-metiltransferase, cujo a função é catalisar a esterificação S-adenosilmetionina, de trans-aconitato e 3-isopropilmalato.

No grupo das enzimas já descritas na família de policetidos não redutores (NR-PKS), a enzima metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina (SMT), cofator que desempenha um papel essencial na transferência de grupos metil na rota em que este se encontra (STRUCK *et al.*, 2012). Outro gene assim inferido, foi 18, correspondente ao Glutaciona S-transferase 1, que de acordo com o NCBI possui a função de catalisar a conjugação da forma reduzida de glutaciona a substratos xenobióticos. A enzima Glutaciona S-transferase (GST) realiza a mesma atividade (THROCKMORTON *et al.*, 2015).

Figura 12- Identificação dos genes presentes na região 93.1 de acordo com a ferramenta *BlastP* (NCBI). Onde, em cinza: outros genes; vermelho: gene-co; rosa: genes biossintéticos adicionais; azul: genes relacionados ao transporte.



Finalmente, é importante mencionar *T. pinophilus* é caracterizada como uma espécie que produz uma gama de metabólitos secundários, dentre os quais as moléculas de penicilinas (intimamente relacionadas às purpactinas), e as próprias purpactinas já foram relatadas. E ainda que não tenha sido possível elucidar todos os genes constituintes deste BCG, é possível correlacionar genes homólogos envolvidos tanto na síntese de aflatoxina, como na produção de tripacidina e purpactina, uma vez que estes produtos gênicos apresentam enzimas semelhantes em suas etapas de construção do metabólito de interesse (THROCKMORTON *et al.*, 2015).

Tabela 4- Identificação dos genes constituintes da região 93.1 de acordo com o NCBI e sua relação com os genes descritos na literatura.

	Gene homólogo	Identidade	Nº de acesso	Função	Semelhança com a literatura
11	Oxidoreductase aflY	97.17%	KAF3399329.1	Oxidoreductase envolvida na biossíntese de aflatoxina	Semelhante a BVO
12	Trans Aconitato 3-metiltransferase	97.79%	KAF3399328.1	Catalisa a esterificação monometil S-adenosilmetionina, de trans-aconitato e 3-isopropilmalato	Associada a SMT
13	Proteína contendo domínio EthD	86.96%	KAH875674.1	Medeia a biossíntese de um pigmento derivado de antraquinona	Gene EthD (descarboxilase putativa)
14	Policetídeo sintase não redutora aptA	93.18%	KAF3399330.1	Medeia a biossíntese de aspertecina; catalisa a formação do policetídeo aromático a partir de acetil coenzima A	NR-PKS
15	Proteína do tipo lactamase aptB	98.61%	KAF3399325.1	Produto da antrona oxidase do gene HypC (oxidoreductase)	Gene HypC (antrona oxidase)
16	Norantrona monoxigenase	92.77%	KAF3399324.1	HypC, antrona oxidase	Gene HypC (antrona oxidase)
17	Lacase - 2	77.78%	KAF3399326.1	Oxidases multicobres	Semelhante a MCO
18	Sem identificação	-	-	-	-
19	Glutationa S- transferase 1	97.77%	KAF3399323.1	Catálise da conjugação da forma reduzida de glutatona a substratos xenobióticos	Associada a GST
20	Pisatina demetilase	88.57%	KAF3398629.1	Auxilia na remoção de fitoalexina	-
21	Transportador de pantotenato liz 1	66.67%	KAF3398693.1	Proteína de transporte de membrana plasmática para o pantotenato	-
22	Transportador de pantotenato liz 1	96.60%	KAF3398639.1	Proteína de transporte de membrana plasmática para o pantotenato	-

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude do exposto, foi possível evidenciar que a linhagem fúngica *Talaromyces* sp. apresentou a melhor produção de compostos secundários no cultivo de extrato de malte, e que os meios de cultura batata-dextrose e ISP2 também se revelaram satisfatórios para a produção de metabólitos.

Desta maneira, ratifica-se a importância das variações nas condições de cultivo para a alteração do perfil metabólico da linhagem em questão. Ademais, através da desreplicação das moléculas presentes nos variados extratos oriundos dos meios de cultura propostos, foi possível caracterizar os efeitos biológicos dessas moléculas, contribuindo para revelar o potencial biossintético e a caracterização das bioatividades presentes nesses compostos. Finalmente, através da mineração de genoma de *Talaromyces* sp. e do levantamento bibliográfico em relação às suas regiões gênicas, foi possível identificar uma proposta de rota biossintética para as moléculas de anidro maleico.

E embora não se tenha elucidado a biossíntese das demais moléculas desreplicadas, foi possível indicar a maioria dos genes presentes em dada região de interesse, e correlacionar as enzimas presentes neste BCG com atividades já descritas na literatura, percebendo-se uma semelhança entre a construção da molécula purpactina A, com as demais estruturas químicas mencionadas. Com isso, é necessário ressaltar a necessidade de ferramentas de bioinformática mais precisas, além de estudos mais aprofundados acerca da produção da purpactina A, bem como das demais regiões gênicas de *Talaromyces* sp. para assim, tentar desvendar sua potencialidade biotecnológica de maneira mais definida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARANO, L.; ESPOSITO, R.; RUOCCO, N.; & COSTANTINI, M. Genome mining as new challenge in natural products Discovery. **Marine drugs**. v. 18. p. 199. 2020.

ANDRADE, M. M. **Introdução à metodologia do trabalho científico: elaboração de trabalhos na graduação**. 10 ed. São Paulo: Atlas. 2017.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**. p. 117-137. 1998.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R. & ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**. v. 3. p. 619-627. 2002.

CAO, X.; SHI, Y.; WU, S.; WU, X.; WANG, K.; SUN, H. & WU, B. Polycyclic meroterpenoids, talaromyolides E– K for antiviral activity against pseudorabies virus from the endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. **Tetrahedron**. v. 76. n. 30. 2020.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5. p. 421-437. 2013.

CHAUDHARY, N.K.; CROMBIE, A.; VUONG, D.; LACEY, E.; PIGGOTT, A.M.; KARUSO, P. Talausins: hybrid phenalenone dimers from *Talaromyces stipitatus*. **Journal of Natural Products**. 2020.

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

ESPARA, B. A. **Mineração genômica e análise metabolômica de policetideos de uma nova espécie do gênero *Talaromyces* isolada de Victoria amazônica**. Dissertação. PGSS. Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus. 2021.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**. v. 69. n. 3. p. 509–526. 2006.

HAN, Y. B.; BAI, W.; DING, C. X.; LIANG, J.; Wu, S. H. & TAN, R. X. Intertwined biosynthesis of skyrin and rugulosin A underlies the formation of cage-structured bisanthraquinones. **Journal of the American Chemical Society**. v. 143 n. 35. p. 14218-14226. 2021.

HWANG, H.; KWON, H. C. & KWON, J. Chemical Constituents Isolated from the Moss-derived Fungus *Talaromyces* sp. **Journal of the Korean Magnetic Resonance Society**. v. 24. n. 4. p. 123-128. 2020.

ISAKA, M.; TANTICHAROEN, M. & THEBTARANONTH, Y. Cordyanhydrides A and B. Two unique anhydrides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. **Tetrahedron Letters**. v. 41. n. 10. p. 1657-1660. 2000.

KLEIN, J.L.C.; CAMPOS, A.; NIERO, R.; CORRÊA, R.; VANDER HEYDEN, Y.; FILHO, V.C. Xanthones and cancer: from natural sources to mechanisms of action. **Chemistry & Biodiversity**. v. 17. 2020.

KOOLEN, H.H.F.; SOARES, E.R.; SILVA, F.M.A.D.; ALMEIDA, R.A.D.; SOUZA, A.D.L.D.; MEDEIROS, L.S.D.; SOUZA, A.Q.L.D. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. **Química Nova**. v. 35. p. 771-774. 2012.

KUMARI, M.; TARITLA, S.; SHARMA, A. & JAYABASKARAN, C. Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. **Frontiers in microbiology**, v. 9. 2018.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; S PITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**. v. 19. p. 792-798. 2012.

LAN, D., & WU, B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Talaromyces*. **Chemistry & Biodiversity**. v. 17 n. 8. 2020.

LEBEAU, J.; PETIT, T.; FOUILLAUD, M.; DUFOSSÉ, L. & CARO, Y. Alternative extraction and characterization of nitrogen-containing azaphilone red pigments and ergosterol derivatives from the marine-derived fungal *Talaromyces* sp. 30570 strain with industrial relevance. **Microorganisms**, v.8 n. 12. 2020.

Lee, N., Hwang, S.; Kim, J.; Cho, S.; Palsson, B. & Cho, B. K. Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 18, 1548-1556. 2020.

LIU, W. C.; YANG, F.; ZHANG, R.; SHI, X.; LU, X. H.; LUAN, Y. S. & DONG, Y. S. Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method. **Phytochemistry Letters**. v. 18. p. 157-161. 2016.

MADIGAN, M.T. **Microbiologia de Brock**. 14^a ED. Artmed. 2016.

MASTERS, K. S. & BRÄSE, S. Xanthones from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. **Chemical reviews**. v. 112 n.7. p. 3717-3776. 2012.

NISHIDA, H., TOMODA, H., OKUDA, S., & OMURA, S. Biosynthesis of purpactin A. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 57. n. 4. p. 1271-1274. 1992.

OLIVEIRA, F. C.; BARBOSA, F.G.; MAFEZOLI, J.; DE OLIVEIRA, M. D. C.; GONÇALVES, F. J & FREIRE, F. C. Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatogênico *Albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. **Química Nova**, 40, 890-894.

- PEIXOTO, P.A.N.S.; DE AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**. v. 3. p. 69-72. 2004.
- QIU, P.; XIA, J.; ZHANG, H.; LIN, D. & SHAO, Z. A Review of Diterpenes from Marine-Derived Fungi: 2009–2021. **Molecules**. v. 27 n. 23. p. 8303. 2022.
- SAMSON, R.A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K.A.; PETERSON, S.W.; FRISVAD, J.C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**. v. 70. p. 159-183. 2011.
- SCHERLACH, K. & HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Org. Biomol. Chem**. v. 7. p. 1753–1760. 2009.
- SEKUROVA, O. N.; SCHNEIDER, O. & ZOTCHEV, S. B. Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering. **Microbial biotechnology**, v. 12 n. 5. p. 828-844. 2019.
- SILVA, P. H. F.; SOUZA, M. P. S.; BIANCO, E. A.; SILVA, S. R.; SOARES, L. N. S.; COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; BARISON, A.; FORIUM, M. R.; CASS, Q. B.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. Q. L. Antifungal polyketides and other compounds from amazonian endophytic *Talaromyces* Fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 29. p. 622–630. 2018.
- SOUZA, A. Q. L. D.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. D. M. & PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta amazônica**. v. 34. p. 185-195. 2004.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**. v. 67. p. 257-268. 2004.
- SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; SØRENSEN, D.; BLACKWELL, B. A. & MILLER, J. D. Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. **Phytochemistry**. v. 71 n. 7. p. 760-765. 2010.
- THROCKMORTON, K.; WIEMANN, P. & KELLER, N. P. Evolution of chemical diversity in a group of non-reduced polyketide gene clusters: using phylogenetics to inform the search for novel fungal natural products. **Toxins**. v. 7 n. 9. 3572-3607. 2015.
- TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre. Artmed. 2017.
- WANG, W.; WAN, X.; LIU, J.; WANG, J.; ZHU, H.; CHEN, C. & ZHANG, Y. Two new terpenoids from *Talaromyces purpurogenus*. **Marine drugs**. v. 16 n. 5. p. 150. 2018.
- WEZEMAN, T.; BRÄSE, S. & MASTERS, K. S. Xanthone dimers: A compound family which is both common and privileged. **Natural product reports**. v. 32 n. 1. p. 6-28. 2015.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**. v. 78. p. 175-341. 2014.

ZIEMERT, N.; ALANJARY, M. & WEBER, T. The evolution of genome mining in microbes—a review. **Natural product reports**. v. 33. p. 988-1005. 2016.

ZIEMERT, N.; WEBER, T. & MEDEMA, M. H. Genome mining approaches to bacterial natural product discovery. Reference Module in Chemistry, **Molecular Sciences and Chemical Engineering**. v. 6. p. 19-33. 2020.

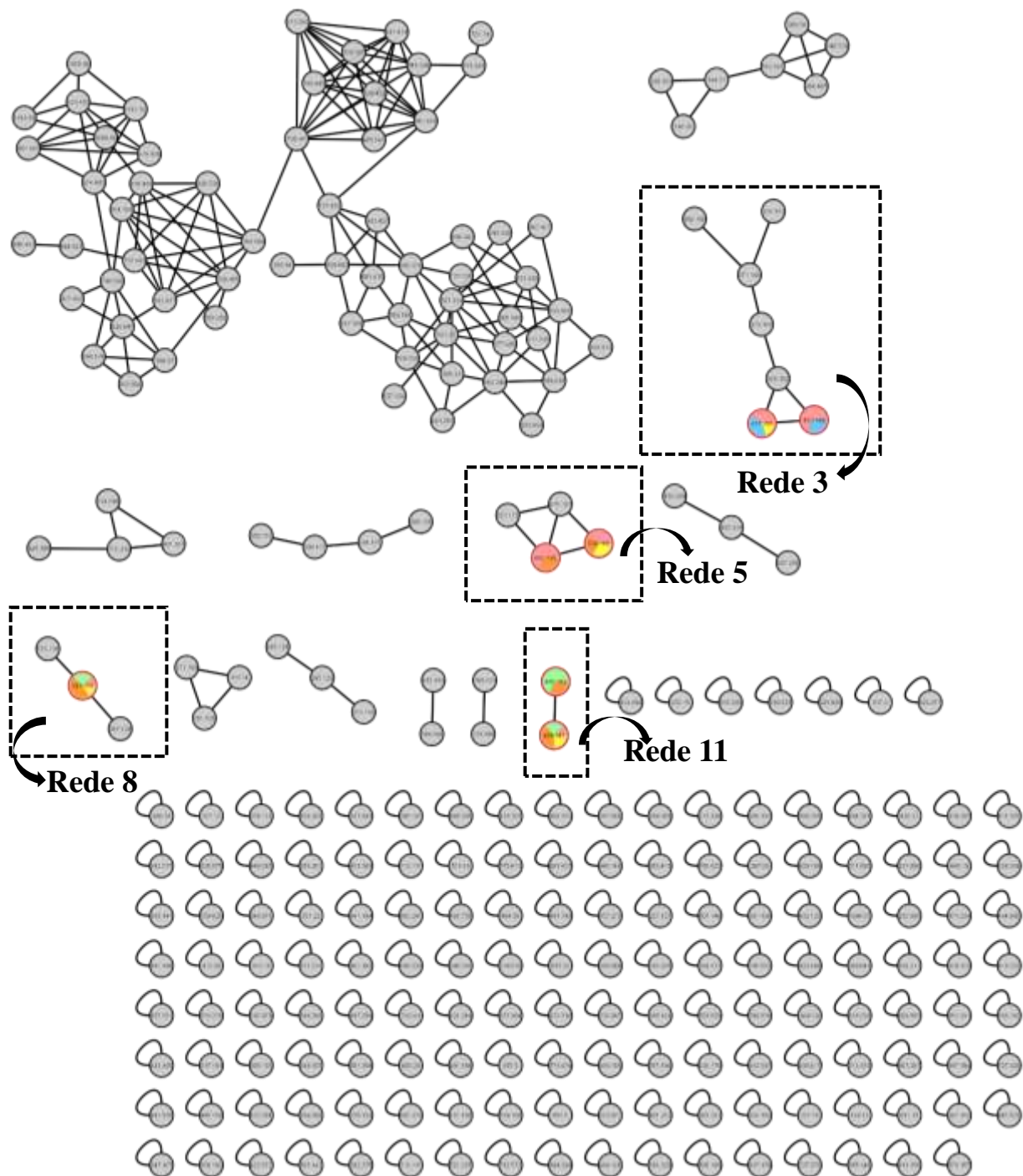
ZANG, Y.; GENTA-JOUVE, G.; ESCARGUEIL, A.E.; LARSEN, A.K.; GUEDON, L.; NAY, B.; PRADO, S. Antimicrobial oligophenalenone dimers from the soil fungus *Talaromyces stipitatus*. **Journal of Natural Products**. v. 79. p. 2991-2996. 2016.

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

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**. v. 23. p. 753-771. 2006.

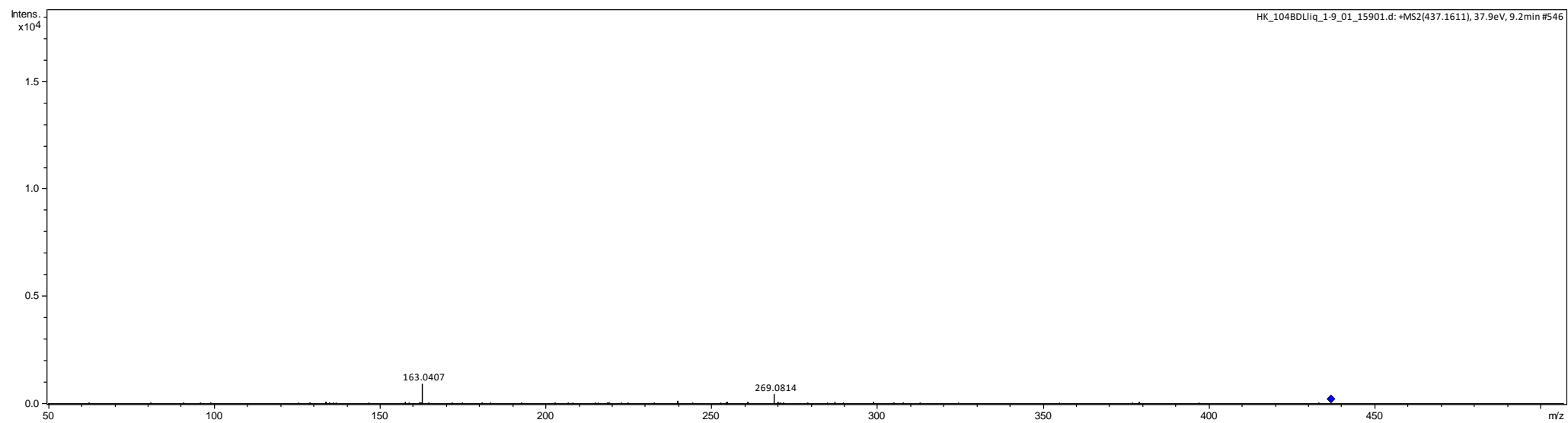
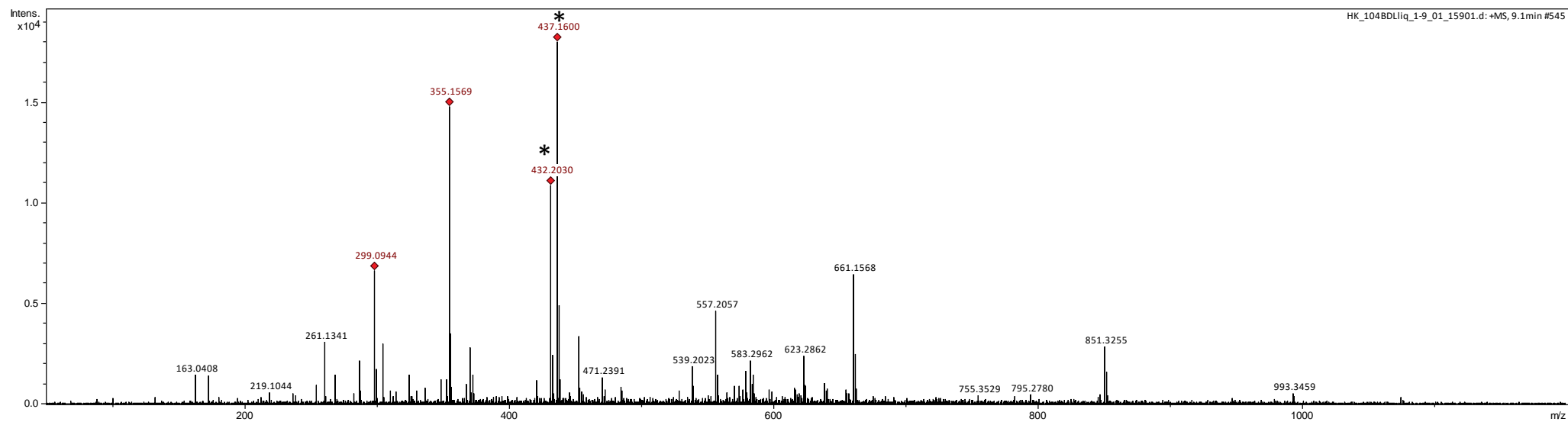
ANEXO I – VISÃO GERAL DAS REDES MOLECULARES GERADAS A PARTIR DA PLATAFORMA GNPS.

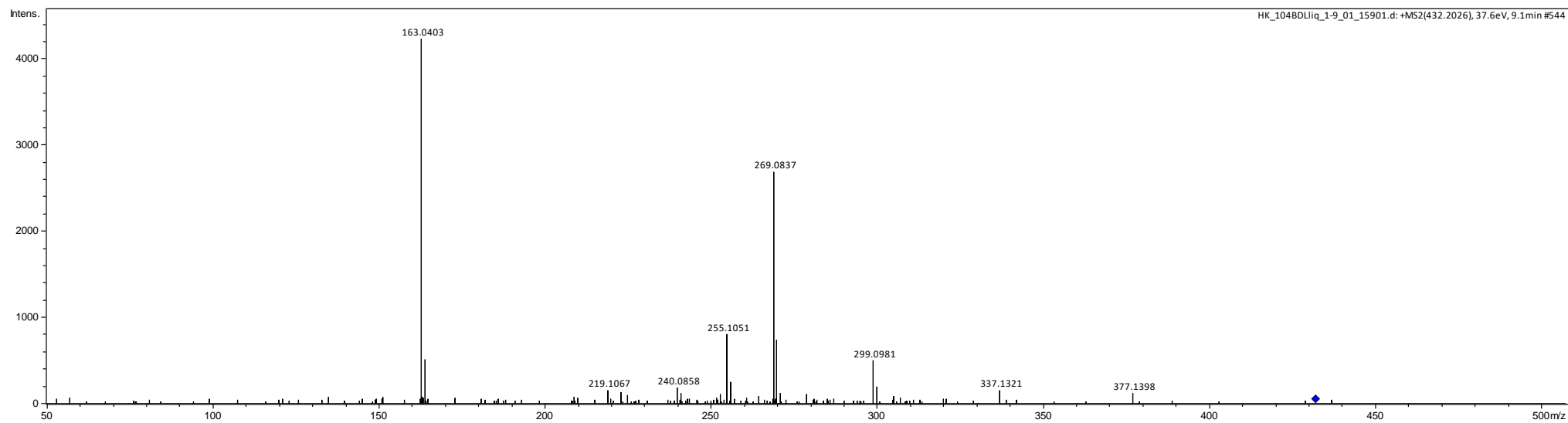
Dentre as treze redes geradas, em destaque as redes 3,5,8 e 11, que apresentaram *match* significativo com a literatura da plataforma. Sendo assim: meio batata-dextrose: rosa; czapeck: azul, extrato de carne: verde; extrato de malte: laranja e ISP2: amarelo.



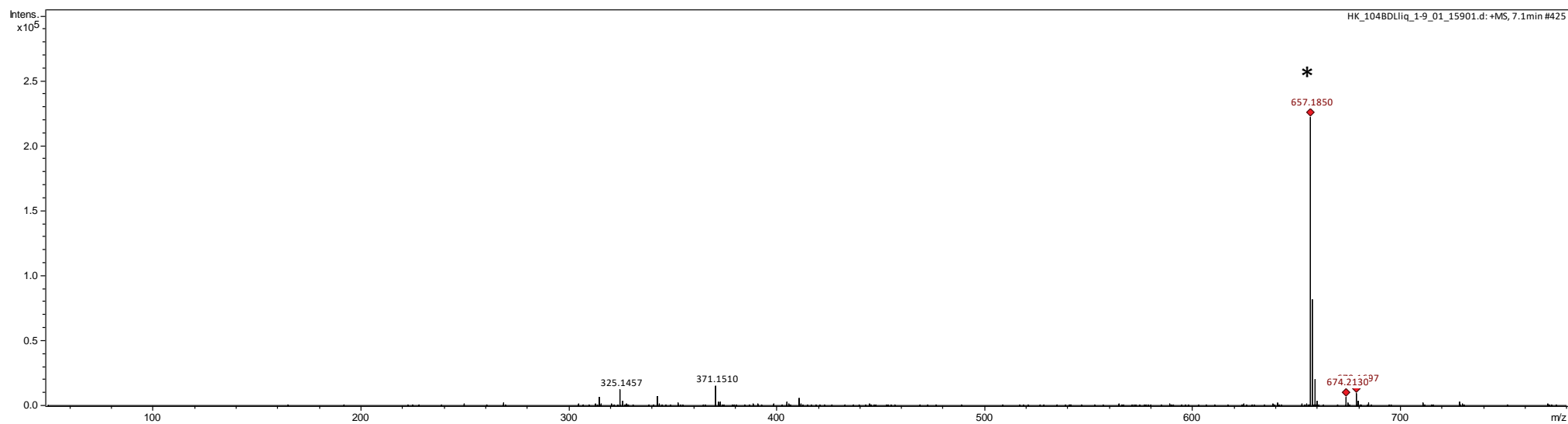
ANEXO II – ESPECTROS DE MASSAS DAS MOLÉCULAS DESREPLICADAS E SUAS RESPECTIVAS FRAGMENTAÇÕES.

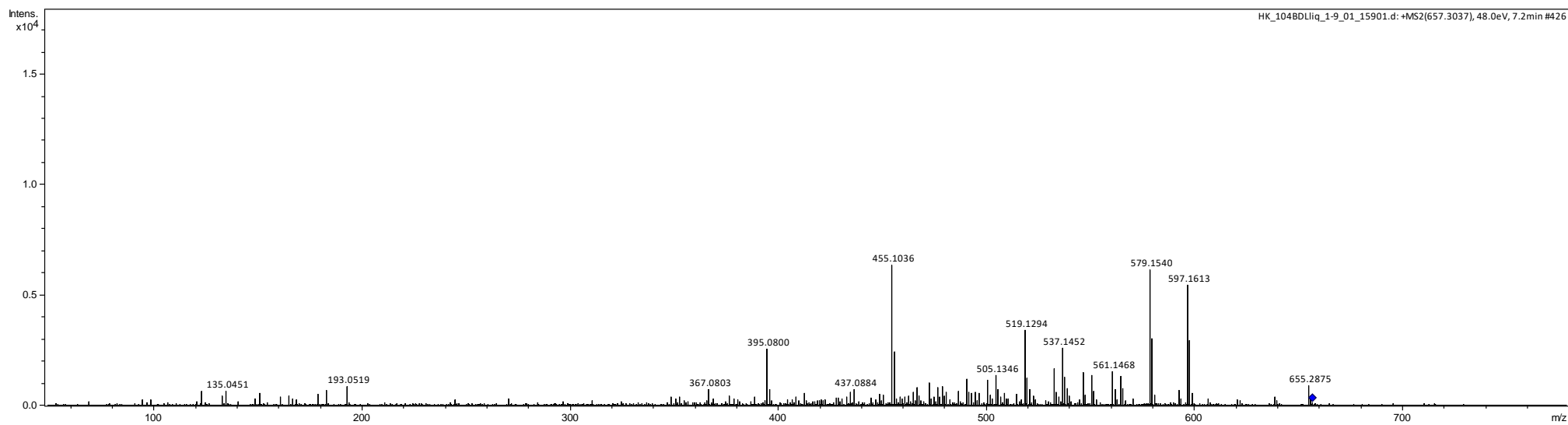
1. Purpactina A



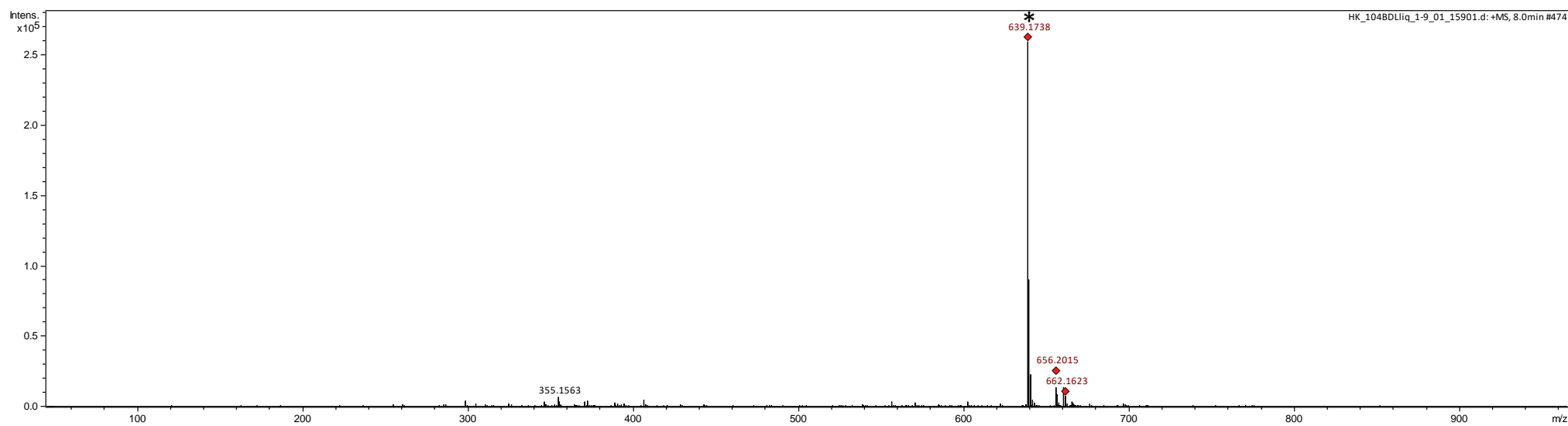


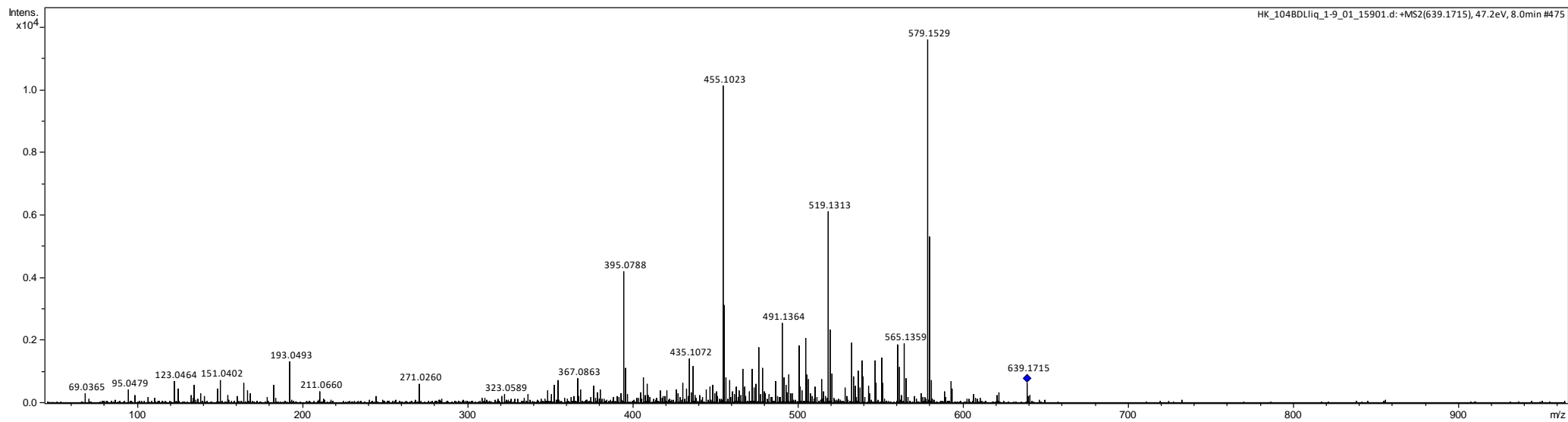
2. Ergocromona AD



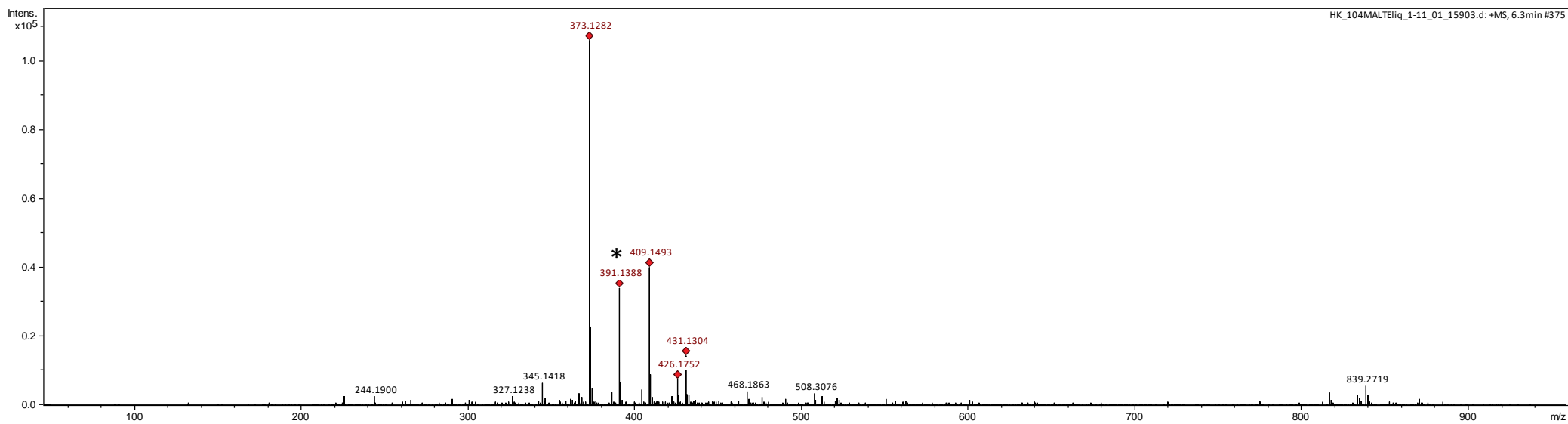


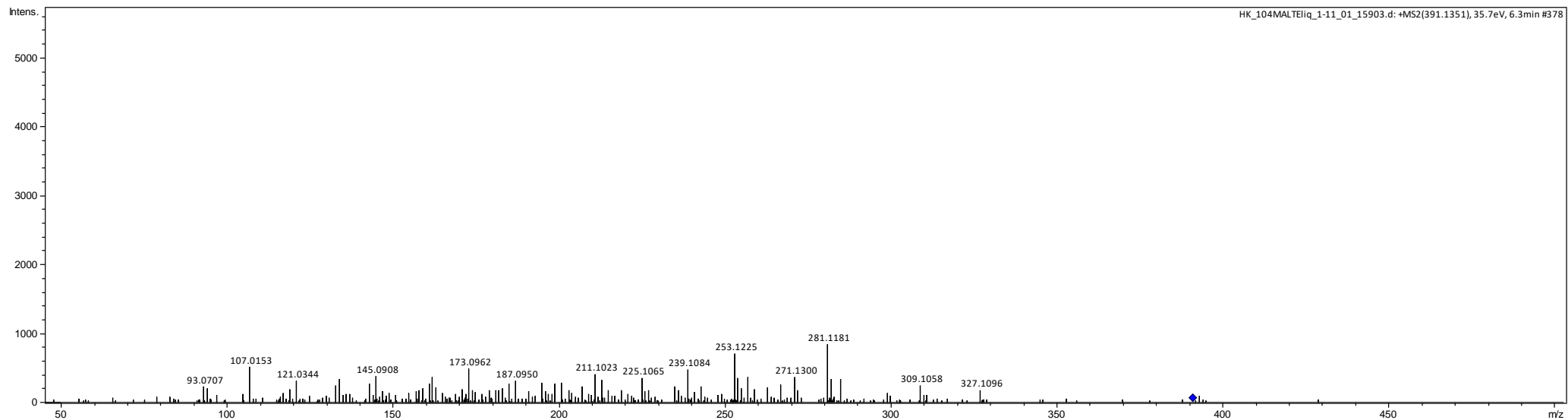
3. Ácido secalônico D



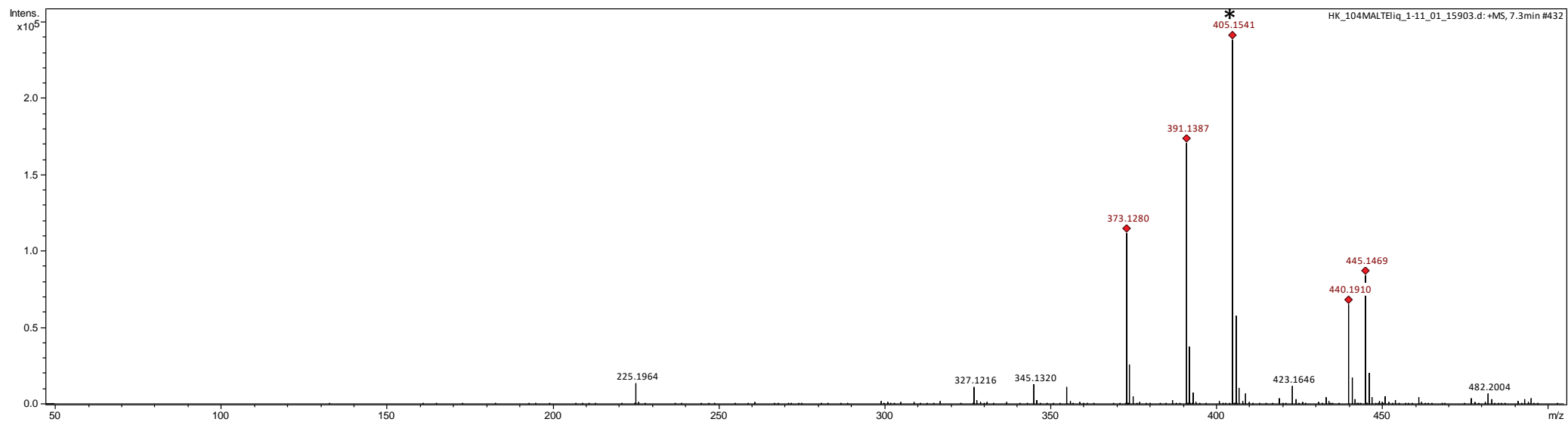


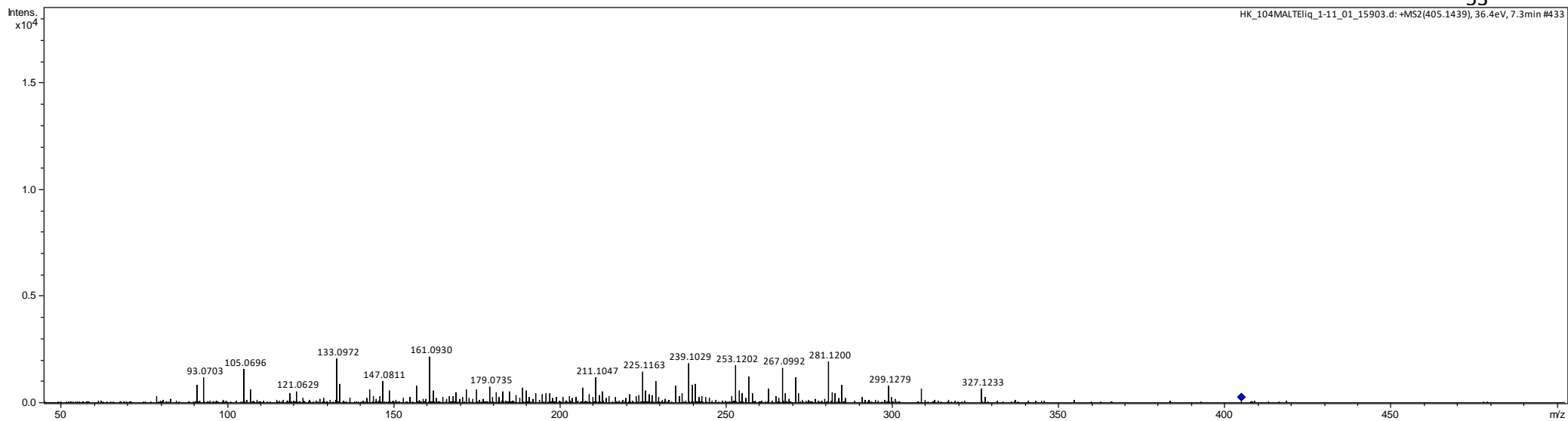
4. Cordianidrido A





5. Cordianidrido A metil éster





6. 7 - (4-But-1-enyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-furan-3-ylmethyl) - 4,5 - dicarboxy-non-5-enoic acid

