

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

LAURA CIRIBELLI BORGES DOMINGUETE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES E INIBIDORES DE
ACETILCOLINESTERASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Belo Horizonte
2021

LAURA CIRIBELLI BORGES DOMINGUETE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES E INIBIDORES DE
ACETILCOLINESTERASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi

Belo Horizonte
2021

Dominguete, Laura Ciribelli Borges.
D671a Avaliação da produção de antioxidantes e inibidores de acetilcolinesterase por fungos filamentosos / Laura Ciribelli Borges Dominguete. – 2021.
106 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Fungos – Teses. 2. Penicillium – Teses. 3. Antioxidantes – Teses. 4. Inibidores de colinesterase – Teses. 5. Alimentos – Teses. I. Takahashi, Jacqueline Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:664

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIOXIDANTES E INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

LAURA CIRIBELLI BORGES DOMINGUETE

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 28 de maio de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi (Orientadora e Presidente da Comissão) - UFMG
Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda - UFMG
Dr. Dhionne Correia Gomes - UFMG
Profa. Dra. Flávia Augusta Guilherme Gonçalves Rezende - CEFET/MG
Profa. Dra. Tatiane Freitas Borgati - UEMG

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Aparecida Takahashi, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2021, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Inayara Cristina Alves Lacerda, Subcoordenador(a)**, em 31/05/2021, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Augusta Guilherme Gonçalves Rezende, Usuário Externo**, em 31/05/2021, às 13:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dhionne Correia Gomes, Técnico em Química**, em 31/05/2021, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Freitas Borgati, Usuário Externo**, em 31/05/2021, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0753916** e o código CRC **A9D795BA**.

Referência: Processo nº 23072.237200/2020-20

SEI nº 0753916

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo, mistério profundo e presença real que me concedeu a vida e me sustenta a cada amanhecer;

À Virgem Maria, São José, ao meu anjo da guarda, São Bento e à querida Santa Teresinha do menino Jesus;

Ao Daniel, amor da minha vida, pela presença, amor, paciência, alegria, leveza, exemplo, confiança e apoio em todas as horas;

À toda família Ciribelli, especialmente à minha mãe, Maria Aparecida, aos meus irmãos Álvaro e Otávio, cunhadas Raquel e Marina, e sobrinhos Maria Antônia, José Pedro e Miguel, por serem a bomba propulsora da minha vida;

À família Domingute e Carvalho, obrigada pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e orações fundamentais;

À família Ávila, que está sempre presente no meu coração, especialmente à minha amada vovó Filhinha;

À profa Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, pela paciência, amor, dedicação, humildade, competência, simplicidade e perseverança. Seu exemplo como ser humano e profissional vale mais do que títulos, prêmios ou honras. Obrigada por ter me aceitado como aluna de doutorado e por acreditar em mim;

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Bioensaios Geane, Gabriel, Gesiane, Bruna, Marília, Denise, Thamires, Matheus, Geisa, Isabela, Paulo, Bárbara, Samuel, Nathália, Christiano, Bianca, Gustavo, Diego e Tainara. Cada um teve um papel fundamental no meu crescimento humano e profissional durante esses anos que passamos juntos! O meu muito obrigada a cada um, especialmente aos que mais contribuíram para meu aprendizado e para a caminhada se tornar mais leve;

A todos os colegas da FAFAR, especialmente ao Mauro e à Bárbara;

À Tatiane, amiga de profissão e de fé que Deus me concedeu no DQ;

Ao Hebert pelas análises de Paper Spray que foram valiosas para esse trabalho e ao Prof. Dr. Rodinei pela disciplina de espectrometria de massas ministrada no departamento de química e permissão da utilização do equipamento;

A todos os funcionários do departamento de química, especialmente ao Sr Luiz, que acolhe os alunos com uma alegria verdadeira;

Ao Dr. João Bronzel, pela boa vontade, competência e auxílios essenciais para as análises de cromatografia acoplada a espectrometria de massas de alta resolução;

Ao Dr. Ivanildo E. Marriel e Dr. Ubiraci G. de P. Lana e, pelo fornecimento e identificação dos fungos, essenciais para esse trabalho;

À Cláudia Bahia, pela torcida, amizade, orações e ajuda profissional. Você foi um anjo de Deus no momento em que eu precisava;

À Juliana Barbosa e Oliveira, por me ajudar a enxergar meu potencial;

Aos amigos Telinha, Madalena, tio Totó, Laura Vaz, LP, Jaque, Mariana Araújo, Márcia, Damásio, Ana Maria, Alessandra Malaquias, Laiza, Letícia, Maria Emília, Maria de Fátima e todos que me acompanham e torcem por mim! Agradeço as orações, o amor e a alegria que trazem ao meu coração;

À Vanny e Mirra Angelina, pelo auxílio essencial nas análises cromatográficas;

À Ivana, pelas análises de ressonância magnética nuclear (RMN);

À Profa Dra Lúcia Pimenta, pela parceria e apoio nas análises de RMN, pela alegria e positividade em sua maneira de ser;

À CAPES, pela concessão da bolsa que foi fundamental para essa etapa da minha vida;

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento à pesquisa;

Ao INCTBioNat e todos os membros, pelos recursos direcionados aos alunos que trabalham com produtos naturais e divulgação científica;

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Farmácia da UFMG;

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite, pela doação do tempo e disposição;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

"O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas, e dela se serve para acalmar as dores e curá-las, o farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra."

Eclesiástico 38, 6-8.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada uma triagem com cinquenta fungos filamentosos visando selecionar espécies capazes de produzir substâncias com propriedades antioxidantes e inibidoras de acetilcolinesterase para estudos mais detalhados. Os fungos foram cultivados por 28 dias à temperatura ambiente (25 °C) em meio de cultivo líquido, sendo a capacidade antioxidante total e a atividade inibitória de acetilcolinesterase avaliadas utilizando-se diretamente os caldos fermentados. Duas espécies fúngicas se destacaram *Penicillium flavigenum* e *Penicillium tanzanicum*, sendo submetidas a novos experimentos. *P. flavigenum*, apesar de produzir comumente compostos antioxidantes como a sorbicilina, nas condições do presente trabalho, produziu a micotoxina citrinina, identificada por análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e *Paper Spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS). Desta forma, os estudos se concentraram em *P. tanzanicum*, que foi cultivado em meios de cultura de composições diferentes, alguns dos quais contendo moduladores epigenéticos, para induzir a expressão de metabólitos secundários bioativos. Os moduladores utilizados foram 5-azacitidina (AZA) (50, 200, 350 e 500 µM), hidralazina (HID), procainamida (PRO), ácido suberoil hidroxâmico (SAHA) e butirato de sódio (BUT) (500 µM). Os extratos dos diferentes cultivos foram preparados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas e RMN de ¹H para determinar as alterações ocorridas no perfil metabólico. Os extratos também foram avaliados em ensaios de atividade biológica (ação antioxidante por diferentes métodos e inibição da acetilcolinesterase). Os cromatogramas dos extratos do *P. tanzanicum* sob influência dos moduladores mostraram alterações no perfil metabólico, principalmente aumento da produção de ácido pulvilórico induzido por HID, HID+PRO e AZA. Os espectros de RMN evidenciaram aumento de compostos aromáticos nos extratos de AZA, HID e PRO, além de compostos contendo hidroxilas queladas neste último. HID e AZA aumentaram a produção de metabólitos com propriedade antioxidante e com atividade inibitória de acetilcolinesterase e AZA (200 µM) aumentou a produção de ácido linoleico em caldo batata dextrose. A capacidade antioxidante e atividade inibitória da acetilcolinesterase foram relatadas pela primeira vez para a espécie *P. tanzanicum*.

Palavras-chave: fungo filamentoso; *Penicillium tanzanicum*; capacidade antioxidante; inibição de acetilcolinesterase; modulador epigenético.

ABSTRACT

In this work, a screening was carried out with fifty filamentous fungi in order to select a species able to produce substances with antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting properties for more detailed studies. The fungi were cultured for 28 days at room temperature (25 °C) in liquid culture medium and total antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities were evaluated using the fermented broths. Two fungal species stood out *Penicillium flavigenum* and *Penicillium tanzanicum* and were submitted to new experiments. The fungus *P. flavigenum*, despite commonly producing antioxidant compounds such as sorbicillin, under the cultivation conditions used, produced the mycotoxin citrinine. Thus, the studies focused on *P. tanzanicum*, which was grown in culture media of different composition, some of which containing epigenetic modulators, to induce the expression of secondary bioactive metabolites. The modulators used were 5-azacitidine (AZA) (50, 200, 350 and 500 µM), hydralazine (HYD), procainamide (PRO), suberoyl hydroxamic acid (SAHA) and sodium butyrate (BUT) (500 µM). The extracts of the different cultures were prepared and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and hydrogen nuclear magnetic resonance (NMR) to determine the changes in the metabolic profile. The extracts were also evaluated in biological activity assays (antioxidant activity by different methods and anti-acetylcholinesterase). The chromatograms of the crude extracts of *P. tanzanicum* under the influence of the modulators showed changes in the metabolic profile, mainly an increase in the production of pulvyloric acid induced by HYD, HYD+PRO and AZA. The NMR spectra showed an increase in aromatic compounds in the extracts of AZA, HYD and PRO, in addition to compounds containing chelated hydroxyls in the latter. HYD and AZA increased the production of metabolites with antioxidant activity and the ability to acetylcholinesterase inhibition and AZA (200 µM) increased the production of linoleic acid in potato dextrose broth. Antioxidant capacity and acetylcholinesterase inhibitory activity were reported for the first time for the species *P. tanzanicum*.

Keywords: filamentous fungi; *Penicillium tanzanicum*; antioxidant activity; acetylcholinesterase inhibition; epigenetic modulator.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Figura 1.** Estruturas químicas de metabólitos produzidos por fungos: ácido giberélico, penicilina G, lovastatina, ciclosporina A, vitamina B2, ácido araquidônico e melatonina.26
- Figura 2.** Reação de transferência de hidrogênio do ácido p-cumárico para radicais livres.....30
- Figura 3.** Reação de Fenton com geração de radical hidroxila.....31
- Figura 4.** Reação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil com o composto antioxidante hipotético (RH).....32
- Figura 5.** Estruturas químicas de metabólitos fúngicos vitamina E e bicaverina.....34
- Figura 6.** Estruturas químicas dos moduladores epigenéticos 5-azacitidina, hidralazina, cloridrato de procainamida, cloridrato de procaína, butirato de sódio, ácido valproico, nicotinamida e ácido hidroxâmico suberoilânilida.....35
- Figura 7.** Metabólitos fúngicos S-(+)-sidonol, ácido antranílico, peróxido de ergosterol, daldinona E, daldinona B e dihidrobipolaroxinas B – D, produzidos na presença de diferentes moduladores epigenéticos.....37

Capítulo I

- Figura 1.** Reação da tiocolina, produzida pela hidrólise da acetiltiocolina pela acetilcolinesterase, com ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico com produção de 2-nitrobenzoato-5-mercaptocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (de coloração amarelada).....49
- Figura 2.** Capacidade antioxidante total dos caldos de fungos filamentosos (μg equivalente de ácido ascórbico por mL de caldo).....52
- Figura 3.** Estruturas químicas de alguns metabólitos produzidos por *P. flavigenum*.....53
- Figura 4.** Percentual de inibição de AChE para dez caldos de fungos filamentosos em relação à eserina (1 mg/mL, padrão positivo).....54
- Figura 5.** Espectro de massas obtido por *Paper Spray* (PS-MS) no modo positivo do controle do meio de cultura (MCB); do caldo fermentado bruto (CFPF); do extrato bruto em acetato de etila (EBPF) e da fração purificada (SIPF) de *P. flavigenum*.....56
- Figura 6.** Espectro de RMN de ^1H , estrutura e atribuição dos sinais dos hidrogênios da citrinina.....57

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Capítulo II

- Figura 1.** Estruturas químicas da citrinina, fumitremorgina B e roquefortinas C e M.....62
- Figura 2.** Estruturas químicas do ácido pulvilórico, bisdeclorogeodina e fiscalinas A e C.....63
- Figura 3.** Estruturas químicas dos alcaloides quinazolínicos camptotecina, cloroquina, carteolol, vesnarinona, saquinavir, ciprofloxacino e aripiprazol.....64
- Figura 4.** Perfil químico por PS-MS do caldo fermentado contendo os metabólitos de *P. tanzanicum* (CALPT2) e do extrato bruto do caldo obtido por extração líquido-líquido com acetato de etila (CPT2) do experimento PT2.....79
- Figura 5.** Cromatogramas (CLAE-UV-Vis a 410 nm) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (CPT2) e dos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT2AZA), butirato de sódio (PT2BUT), hidralazina (PT2HID), procainamida (PT2PRO) e ácido hidroxâmico suberoilânilda (PT2SAHA) do experimento PT2.....80
- Figura 6.** Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase (%) dos extratos do fungo *P. tanzanicum* (PT) cultivado na presença dos moduladores epigenéticos (AZA, HID, BUT, SAHA e PRO) em comparação com o extrato do fungo cultivado na ausência do modulador epigenético (CPT2), em relação à eserina (1 mg/mL, padrão positivo).....84
- Figura 7.** Cromatogramas (CLAE-UV-Vis a 410 nm) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (A) (CPT3) e dos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos (cromatogramas B, C e D, respectivamente) ou combinados (E, F e G) do experimento PT3.....86
- Figura 8.** Metabólitos produzidos em maior quantidade (curvicolida A e B e ácido fusídico) e exclusivamente (ciclo-fenilalanil-prolil) por *Dothiora* sp. na presença de hidralazina (100 µM).....87
- Figura 9.** Espectro de massas MSMS do extrato do *P. tanzanicum* crescido em meio líquido padronizado(MLP) sem modulador epigenético (CPT3) do experimento PT3.....88

LISTA DE FIGURAS (continuação)

- Figura 10.** Cromatogramas (UPLC-QqTOF-MS) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (A) (CPT3) e dos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos (cromatogramas B, C e D, respectivamente) ou combinados (E, F e G) do experimento PT3.....89
- Figura 11.** Cromatogramas dos extratos do experimento PT3, com destaque para a região correspondente ao íon com m/z de 279,1231 (correspondente ao ácido pulvilórico) e os valores da integração deste íon molecular.....90
- Figura 12.** Espectros de RMN de ^1H , estruturas químicas e deslocamento dos átomos de hidrogênio (em azul) dos moduladores 5-azacitidina (A), procainamida (B) e hidralazina (C) simulados utilizando o ChemDraw Professional 16.0.93
- Figura 13.** Espectro de RMN de ^1H do extrato de *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) do experimento PT3 e expansão da região entre de 6,7 a 8,5 ppm.....94
- Figura 14.** Espectros de RMN de ^1H dos extratos dos controles dos meios de cultura contendo moduladores (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com moduladores (em verde) e em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3.....95
- Figura 15.** Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo 5-azacitidina (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com 5-azacitidina (em verde) e em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3.....96
- Figura 16.** Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo hidralazina (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com hidralazina (em verde) e em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3.....97
- Figura 17.** Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo procainamida (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com procainamida (em verde) e em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3.....98

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 18. Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo procainamida (em azul), do <i>P. tanzanicum</i> em meio peptonado tratado com procainamida (em verde) e em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3.....	99
---	----

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

- Tabela 1.** Fungos produtores de metabólitos antioxidantes e estruturas químicas.....28
- Tabela 2.** Efeito na expressão gênica de fungos cultivados na presença de moduladores epigenéticos do tipo inibidores de DNA metiltransferases (DNMT) e histona desacetilase (HDAC), em diferentes condições de cultivo.....36

Capítulo I

- Tabela 1.** Proporção e quantidade de eluentes recolhidos no fracionamento cromatográfico do extrato do *Penicillium flavigenum*.....50

Capítulo II

- Tabela 1.** Atividades biológicas das fiscalinas A e C produzidas sob diferentes condições de cultivo.....65
- Tabela 2.** Composição dos meios de cultura dos experimentos PT1, PT2 e PT3.....69
- Tabela 3.** Teor percentual de ácidos graxos em extratos brutos de *P. tanzanicum* cultivado em caldo batata dextrosado (PDB) na ausência (CPT1) e presença de 5-azacitidina nas concentrações de 50 (PT1_50), 200 (PT1_200), 350 (PT1_350) e 500 μ M (PT1_500).....77
- Tabela 4.** Ação antioxidante dos extratos de *P. tanzanicum* (PT) cultivados na presença de moduladores epigenéticos (AZA, BUT, HID, PRO e SAHA) em comparação com o extrato do fungo cultivado da ausência do modulador epigenético (CPT2) do experimento PT2.....82
- Tabela 5.** Valor das integrais dos picos referentes ao ácido pulvilórico no extrato bruto de *P. tanzanicum* (CPT3) e nos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos ou combinados do experimento PT3.....90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-AZA	5-azacitidina
AChE	Acetilcolinesterase
ARA	Ácido araquidônico
ATCI	Acetiltiocolina
BDA	Batata dextrose ágar
BUT	Butirato de sódio
CFPF	Caldo fermentado de <i>Penicillium flavigenum</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNMTs	DNA metiltransferases
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EAG	Equivalente de ácido gálico
EBPF	Extrato bruto de <i>P. flavigenum</i>
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
HDACs	Histona-desacetilases
HID	Hidralazina
LaßB	Laboratório de Bioensaios e Biotecnologia
MLP	Meio líquido padronizado contendo peptona, sacarose e sais
PRO	Procainamida
PS-MS	Paper spray acoplado a espectrometria de massas
SAHA	Ácido suberoxâmico
UPLC-QqTOF-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao sistema de massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Utilização dos fungos em processos biotecnológicos	22
3.2 Metabólitos fúngicos relevantes na área de alimentos	23
3.3 Estresse oxidativo e antioxidantes	25
3.4 Doença de Alzheimer	27
3.5 Antioxidantes provenientes de fungos.....	28
3.6 Avaliação da capacidade antioxidante	31
3.7 Metabolismo fúngico	33
3.8 Referências bibliográficas	38
4 CAPÍTULO I: Fungos filamentosos como fonte de metabólitos biotecnologicamente úteis para neuroproteção.....	44
4.1 Introdução	45
4.2 Materiais e métodos	46
4.2.1 Materiais.....	46
4.2.2 Métodos.....	47
4.2.2.1 Ensaio da capacidade antioxidante total (método do fosfomolibdato).....	47
4.2.2.2 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)	48
4.2.2.3 Identificação das espécies de interesse	49
4.2.2.4 Obtenção do extrato bruto da espécie <i>P. flavigenum</i>	49
4.2.2.5 Cromatografia em coluna do extrato bruto de <i>P. flavigenum</i>	50
4.2.2.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	51
4.2.2.7 Análise por <i>paper spray</i> acoplado a espectrometria de massas (PS-MS).....	51
4.2.2.8 Análise estatística	52
4.3 Resultados e discussão.....	52
4.3.1 Capacidade antioxidante total	52
4.3.2 Capacidade de inibição da acetilcolinesterase (AChE)	54
4.3.3 Seleção da primeira espécie para análise química: <i>Penicillium flavigenum</i>	55
4.4 Conclusões.....	57
4.5 Referências bibliográficas	58
5 CAPÍTULO II: Variação metabólica do <i>Penicillium tanzanicum</i> induzida por moduladores epigenéticos.....	62

5.1 Introdução.....	62
5.2 Materiais e métodos	68
5.2.1 Materiais	68
5.2.2 Métodos.....	68
5.2.2.1 Inoculação do <i>P. tanzanicum</i> nos meios de cultura	68
5.2.2.2 Preparo dos extratos brutos.....	69
5.2.2.3 Análise da variação da produção de ácidos graxos produzidos por <i>P. tanzanicum</i> (PT1) na presença de 5-azacitidina.....	70
5.2.2.4 Análise por <i>Paper Spray</i> acoplado a espectrometria de massas (PS-MS) (PT2)	71
5.2.2.5 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2 e PT3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis).....	71
5.2.2.6 Avaliação da capacidade antioxidante total dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)	72
5.2.2.7 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2).....	72
5.2.2.8 Avaliação do poder redutor férrico dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)	72
5.2.2.9 Avaliação do teor de flavonoides totais dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)	73
5.2.3.0 Ensaio de captura de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)	73
5.2.3.1 Ensaio de atividade inibitória de acetilcolinesterase dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2).....	74
5.2.3.2 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT3) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UPLC-QqTOF-MS/MS).....	74
5.2.3.3 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT3) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	75
5.2.3.4 Análise estatística.....	75
5.3 Resultados e discussão.....	75
5.3.1 Variação do perfil de ácidos graxos produzidos por <i>P. tanzanicum</i> (PT1) na presença de 5-azacitidina.....	75
5.3.2 Análise por <i>Paper spray</i> acoplado à espectrometria de massas (PS-MS) (PT2)	78

5.3.3 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)	80
5.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)....	81
5.3.5 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT2)	83
5.3.6 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)	85
5.3.7 Análise dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT3) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UPLC-QqTOF-MS/MS).....	88
5.3.8 Análises dos extratos de <i>P. tanzanicum</i> (PT3) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	91
5.3.8.1 Efeito da 5-azacitidina	95
5.3.8.2 Efeito da hidralazina	96
5.3.8.3 Efeito da procainamida.....	97
5.4 Conclusões.....	99
5.5 Referências bibliográficas	101

1 INTRODUÇÃO

Fungos são microrganismos eucarióticos, heterotróficos e decompositores, que contribuem para o equilíbrio do ecossistema. Eles também possuem enorme potencial biotecnológico por serem capazes de sintetizar metabólitos secundários biologicamente ativos que têm sido utilizados principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Fungos filamentosos produzem enzimas com aplicação industrial como lipases e proteases, ácidos orgânicos como o ácido cítrico, bem como compostos responsáveis pelo aroma e textura de alimentos, entre outros (AZIZAN et al., 2016). Determinadas espécies de fungos filamentosos produzem substâncias biologicamente ativas que podem ser purificadas e identificadas por métodos químicos, avaliadas em estudos *in vitro*, *in vivo* e em testes clínicos, para o desenvolvimento de medicamentos e suplementos alimentares (ACEVEDO-ROCHA et al., 2019). A síntese de produtos naturais com atividade biológica a partir de fungos é relativamente de baixo custo levando-se em consideração a ampla complexidade química e aplicabilidade destes produtos (DUFOSSÉ et al. 2014). Além disso, a produção ocorre sem limitações impostas por safra, irrigação ou pluviometria, entre outras variáveis. Algumas atividades biológicas dos metabólitos de fungos filamentosos são antimicrobiana, hipoglicemiante, antioxidante e de inibição enzimática (AZIZAN et al., 2016).

Substâncias com propriedade antioxidante e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, tem sido alvo de pesquisas voltadas para o tratamento e prevenção da doença de Alzheimer. A alta prevalência desta doença na população mundial tornou-se um grave problema de saúde pública. Estima-se que nos próximos 12 anos cerca de 70 milhões de indivíduos apresentem algum tipo de demência, sendo o Alzheimer correspondente a 70% dos casos. Os processos bioquímicos presentes em pacientes com esse acometimento envolvem, além da redução de acetilcolina no cérebro, níveis de estresse oxidativo elevados, alta peroxidação lipídica no sangue e capacidade antioxidante cerebral diminuída (VALKO et al., 2007). O principal tratamento utilizado é paliativo, com uso de inibidores de acetilcolinesterase para controlar o aparecimento dos sintomas da doença e desacelerar a progressão da mesma, que ainda não possui cura (AHMAD et al., 2016). Pesquisas recentes têm apontado para os benefícios do

uso de substâncias antioxidantes para a prevenção da doença de Alzheimer (ASHLEY et al., 2019; VEURINK et al., 2020). Sendo assim, a busca por substâncias com capacidade antioxidante e inibidoras de acetilcolinesterase é relevante e pode contribuir para o desenvolvimento de nutracêuticos neuroprotetores.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a produção de metabólitos antioxidantes e inibidores de acetilcolinesterase por fungos filamentosos, bem como avaliar alterações na biossíntese decorrentes da utilização de moduladores epigenéticos no meio de cultura.

Os objetivos específicos foram:

- i) Realizar triagem de 50 fungos filamentosos quanto à produção de metabólitos com ação antioxidante e atividade inibitória de acetilcolinesterase;
- ii) Selecionar as espécies mais promissoras;
- iii) Avaliar a variação do perfil metabólico da espécie selecionada na presença de moduladores epigenéticos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H ;
- iv) Avaliar a capacidade antioxidante e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase dos extratos obtidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Utilização dos fungos em processos biotecnológicos

Os fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos capazes de sintetizar uma ampla gama de metabólitos de grande relevância para o setor econômico (SUBHAN et al., 2016). Fungos são amplamente utilizados na indústria de alimentos fermentados, devido à sua capacidade de alterar pH, sabor, aroma e textura durante a fermentação para a produção de alimentos e bebidas (TAKAHASHI et al., 2017). Um bom exemplo é o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, utilizado na fermentação de cereais e leguminosas, cujos produtos finais são o molho de soja, o miso e o saquê (ALBERTI et al., 2017). O saquê é uma bebida de origem japonesa, apreciada mundialmente e produzido há mais de 1200 anos, obtida a partir de fermentação mista do fungo filamentoso *A. oryzae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Possui teor alcoólico moderado e alto teor de aminoácidos, vitaminas, oligossacarídeos e polifenóis (ZHANG et al., 2020). Na fermentação para produção de queijos, diferentes fungos do gênero *Penicillium* são utilizados, como *P. roqueforti*, que contribui tanto no desenvolvimento de características organolépticas quanto para as características macroscópicas do queijo azul. *P. roqueforti* atua como agente de produção e maturação de queijos conhecidos no mundo inteiro, como Roquefort, Fourme d'Ambert e Bleus na França, Cabrales e Valdeón na Espanha, Danablu na Dinamarca, Gorgonzola na Itália, Stilton e Dorset Blue no Reino Unido, Niva na República Tcheca e Bleuchâtel na Suíça (COTON et al., 2020).

O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* produz enzimas como xilanase, quitanase, pectinase, hemicelulase, celulase e protease, que atuam hidrolisando a parede celular de sementes oleaginosas e por isso são utilizadas no pré-tratamento da extração de óleos vegetais na indústria alimentícia. A utilização dessas enzimas aumentou em 6%, 3% e 2% o rendimento da obtenção de óleos de gergelim, amendoim e girassol, respectivamente, além de reduzir gastos com solventes orgânicos (BHOWMIK e PATIL, 2018). Outra área na qual os fungos têm impactado positivamente é a agricultura, por sintetizarem hormônios de crescimento de plantas, como o ácido giberélico (Figura 1, pág. 26), produzido por *Fusarium moniliforme*, e alcaloides com ação inseticida (contra nematoides e pulgões), produzida por *Epichloë* sp. Além disso, na indústria farmacêutica, diversas classes de medicamentos

possuem princípios ativos de origem fúngica, dentre as quais se destacam antimicrobianos como a penicilina G, hipocolesterolemiantes como a lovastatina e imunossupressores, como a ciclosporina A (Figura 1, pág. 26) (AZIZAN et al., 2016).

Em virtude das suas diversas aplicabilidades em vários âmbitos da sociedade, os fungos são um importante alvo de estudos biotecnológicos visando novas descobertas e funcionalidades para estes microrganismos e seus metabólitos.

3.2 Metabólitos fúngicos relevantes na área de alimentos

Fungos filamentosos e seus metabólitos são importantes também como suplementos alimentares e nutracêuticos (VONGSANGNAK et al., 2013). No Brasil, suplemento alimentar foi regulamentado como “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (ANVISA, 2018). Essa definição está em concordância com aquela do órgão de regulamentação dos países da União Europeia (EFSA), que define suplemento alimentar como um concentrado de nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico comercializado em formas farmacêuticas (cápsulas, comprimidos, líquidos, etc.) (EFSA, 2021). O termo nutracêutico, etimologicamente provém da junção das palavras “nutriente” e “farmacêutica”, fazendo alusão a substâncias isoladas ou combinadas, administradas em formas farmacêuticas que atuam prevenindo ou tratando doenças crônicas (BISHOP et al., 2015).

Alguns metabólitos produzidos por fungos e utilizados em suplementos alimentares e/ou nutracêuticos são enzimas, vitaminas, pigmentos, antioxidantes, entre outros (BHOWMIK e PATIL, 2018). Fungos do gênero *Aspergillus* sp., por exemplo, produzem as enzimas digestivas α -galactosidase e β -galactosidase (lactase) por secreção extracelular no meio de cultura, facilitando sua obtenção. Tais enzimas são utilizadas como suplementos alimentares por indivíduos que não as possuem em quantidade suficiente para a digestão de açúcares de cereais e do leite, respectivamente (VIDYA et al., 2020). Devido à tendência natural do organismo humano em reduzir a produção da enzima lactase com o passar dos anos, mais de 50% da população adulta possui deficiência na sua produção, passando a ter um distúrbio digestivo denominado intolerância à lactose. A ingestão da lactase permite

que os indivíduos com distúrbio em sua produção consumam produtos lácteos sem passar pelos sintomas característicos da intolerância à lactose como diarreia, flatulência, inchaço abdominal, dor e náusea (SAQIB et al., 2017).

O processo sintético de obtenção de riboflavina (vitamina B2) foi totalmente substituído por bioprocessos durante os últimos 15 anos. Essa vitamina é utilizada como aditivo em rações, aditivo alimentar e na indústria farmacêutica (SCHWECHHEIMER et al., 2016). O fungo *Ashbya gossypii* produz vitamina B2 (Figura 1, pág. 26) por processo fermentativo que está sendo utilizado como modelo para obtenção de vitaminas da mesma classe a partir de outros fungos. Entre 1999 e 2012, a redução do custo de produção de vitaminas por fermentação foi de 43% em relação ao processo sintético (ACEVEDO-ROCHA et al., 2019).

Outro ingrediente presente em suplementos alimentares é o ácido araquidônico (Figura 1, pág. 26) (ARA), recomendado para lactentes e crianças de primeira infância. Este ácido graxo poli-insaturado, além de ser necessário para a formação do sistema nervoso e da retina, sendo por isso considerado um suplemento nutricional, também tem seu consumo associado à prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias (YAO et al., 2019), podendo, portanto, ser considerado nutracêutico. Ele também está associado ao bom funcionamento do sistema imunológico e nos últimos anos sua obtenção a partir de microrganismos tem sido cada vez maior em relação às fontes animal e vegetal. O principal fungo que produz ARA é o *Mortierella alpina*, com mais de 250 patentes registradas nos últimos 30 anos. A estimativa prevista é de que mais de 400.000 toneladas de ARA sejam produzidas até 2025, quantidade que provavelmente será insuficiente para atender a demanda mundial (MAMANI et al., 2019).

Compostos da classe dos carotenoides são produzidos por fungos *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides* (SAINI e KEUM, 2019) e *Ashbya gossypii* (VONGSANGNAK et al., 2013). Tais compostos são corantes naturais com propriedades anti-inflamatória, imunomoduladora e antioxidante, sendo a última de grande relevância por estar associada à prevenção de várias doenças crônicas (SAINI e KEUM, 2019). Sendo assim, metabólitos fúngicos desta classe podem ser utilizados como nutracêuticos.

3.3 Estresse oxidativo e antioxidantes

O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre espécies antioxidantes e pró-oxidantes no organismo, levando à formação de radicais livres em excesso, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o óxido de nitrogênio (NO^{\bullet}), além de espécies reativas de oxigênio não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SANTOS-SANCHEZ et al., 2019). Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas com elétrons desemparelhados. O radical ânion superóxido, proveniente do oxigênio molecular com ganho de um elétron, é denominado primário por ser gerado a partir de processos metabólicos ou por irradiação. A partir da reação do radical superóxido com outras moléculas, catalisada por metais ou enzimas, são produzidos radicais secundários. O radical secundário hidroxila ($\bullet OH$) é conhecidamente capaz de danificar componentes do DNA como a purina, a pirimidina e a desoxirribose, gerando modificações permanentes no material genético, que representa o início de processos de mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (VALKO et al., 2007).

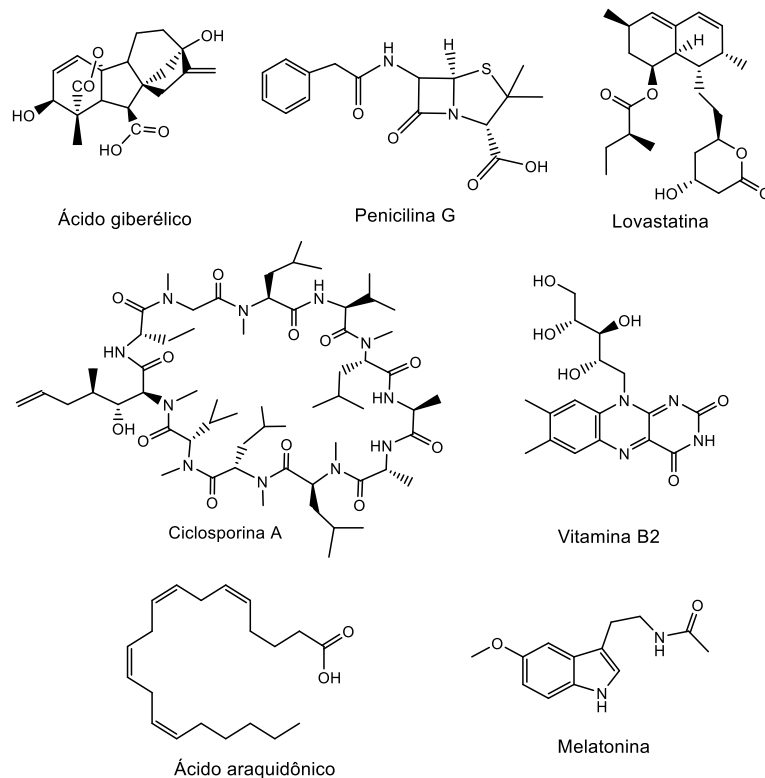
Processos fisiológicos e fisiopatológicos como envelhecimento, mutagênese, câncer, arteriosclerose, infarto do miocárdio, diabetes, doenças inflamatórias e desordens do sistema nervoso central estão associados ao estresse oxidativo. Os processos inflamatórios, por exemplo, são caracterizados pela presença de radicais livres no interior das células que atuam na eliminação de microrganismos patogênicos. Entretanto, danos às células são gerados pelo excesso desses radicais. Isso pode ser evidenciado pelo mecanismo de defesa de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo 1, doença celíaca, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, psoríase e vitiligo que é caracterizado pela produção acentuada de espécies reativas de nitrogênio (NO^{\bullet}), resultando em peroxidação lipídica nas lipoproteínas (SANTOS-SANCHEZ et al., 2019).

Os antioxidantes endógenos enzimáticos atuam de formas diferentes para impedir o estresse oxidativo, como a superóxido dismutase, que catalisa a transformação do ânion superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio, a catalase, que participa da conversão do peróxido de oxigênio a água e oxigênio molecular e a glutatona peroxidase, que controla a taxa de peroxidação lipídica (KRYL'SKII et al., 2019). Os antioxidantes endógenos não enzimáticos podem prevenir a formação de

espécies reativas por se ligarem a íons metálicos de transição, como é o caso da ceruloplasmina, ferritina, transferrina e albumina (MIRONCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018) ou por capturar radicais livres, como ocorre com a melatonina (Figura 1, pág. 26), um hormônio identificado como fator chave na regulação do ritmo circadiano e no ciclo sono-vigília (KRYL'SKII et al., 2019).

Quando a concentração de radicais livres no organismo é alta, os antioxidantes adquiridos pela dieta (exógenos) podem impedir o estresse oxidativo (SANTOS-SANCHEZ et al., 2019). Desta forma, o consumo de substâncias antioxidantes por meio da dieta ou de suplementos alimentares tem aumentado, pois, em baixa concentração, são capazes de inibir ou retardar intensamente a oxidação de componentes facilmente oxidáveis (MACDONALD-WICKS et al., 2006). Alguns exemplos de antioxidantes adquiridos pela alimentação ou suplementação são ácido ascórbico, carotenoides, compostos fenólicos (Tabela 1, pág. 28), zinco, cobre, selênio, magnésio (PEREIRA e CARDOSO, 2012) e vitamina E (Figura 5, pág. 34) (DIKSHIT e TALLAPRAGADA, 2017).

Figura 1 - Estruturas químicas de metabólitos produzidos por fungos: ácido giberélico, penicilina G, lovastatina, ciclosporina A, vitamina B2, ácido araquidônico e melatonina.



3.4 Doença de Alzheimer

Com o envelhecimento populacional, o Alzheimer tornou-se um grave problema de saúde pública, sendo responsável, juntamente com outras demências, pela sétima posição no ranking mundial de causas de mortes e segunda causa de mortes em países de alta renda (WHO, 2020). Indivíduos acometidos por essa doença apresentam perda progressiva de memória e disfunções cognitivas, anormalidades em relação à noção de espaço e campo visual, dificuldades de coordenação motora e distúrbios psicológicos comportamentais (HUANG et al., 2020).

Nos pacientes com Alzheimer, neurônios originados da inervação colinérgica do córtex cerebral e hipocampo sofrem uma degeneração seletiva e profunda, gerando redução nos níveis de acetilcolina no estágio inicial da doença (CARDINALI et al., 2014). Assim, o principal alvo dos medicamentos utilizados atualmente para amenizar seus sintomas é a acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina no cérebro. Ao inibir essa enzima, os fármacos utilizados mantêm por mais tempo este neurotransmissor na fenda sináptica (AHMAD et al., 2016).

Além do distúrbio colinérgico, o cérebro de pacientes com Alzheimer apresenta evidências diretas de estresse oxidativo, tais como aumento da peroxidação lipídica, redução do teor de ácidos graxos poli-insaturados, aumento da oxidação do DNA, redução do metabolismo energético e do teor da enzima citocromo C oxidase, aumento de 4-hidroxinonenal (aldeído proveniente da peroxidação lipídica no fluido ventricular) e de cobre, ferro, alumínio e mercúrio (VALKO et al., 2007). Devido a essas evidências, estudos que investigam a associação entre antioxidantes e a doença de Alzheimer, relacionaram a dieta mediterrânea, que possui alta concentração de compostos fenólicos, vitaminas E (α -tocoferol), C e carotenoides, com redução do risco de desenvolvimento do Alzheimer em indivíduos idosos (VEURINK et al., 2020). Outros estudos descrevem que pacientes com Alzheimer apresentaram concentração sérica inferior de tocoferóis em relação ao grupo controle, sugerindo que os níveis reduzidos no sangue pode ser fator de risco para essa doença (ASHLEY et al., 2019). Além disso, a ingestão de α -tocoferol (vitamina E) por pacientes com Alzheimer de intensidade leve a moderada contribuiu para redução do declínio cognitivo em estudo descrito por Dysken et al. (2014).

3.5 Antioxidantes provenientes de fungos

Os fungos produzem uma variedade de compostos conhecidos por suas características antioxidantes (Tabela 1). A ação antioxidante dos compostos fenólicos pode ser direta, quando estes estabilizam radicais, ou indireta, quando impedem reações que geram espécies radicalares. A ação direta se dá predominantemente pela transferência de átomos de hidrogênio para os radicais após ruptura homolítica da ligação O–H (Figura 2). O novo radical gerado é menos reativo, devido ao fato de o elétron desemparelhado estar deslocado por ressonância (LEOPOLDINI et al., 2011).

Tabela 1 - Fungos produtores de metabólitos antioxidantes e suas estruturas químicas.

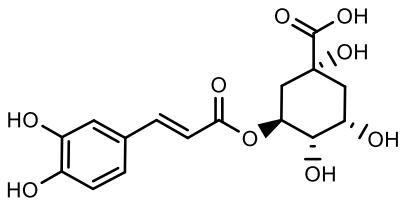
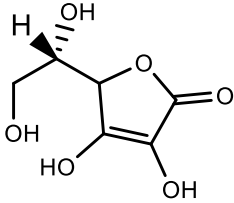
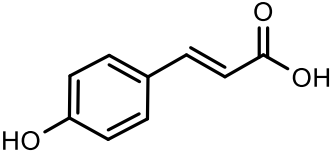
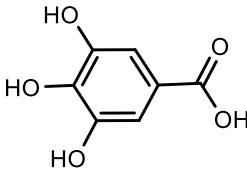
Fungo	Metabólito antioxidante	Estrutura química
<i>Sordariomycete</i> sp. ^a	Ácido clorogênico	
	Ácido ascórbico	
<i>Aspergillus awamori</i> ^b	Ácido p-cumárico	
	Ácido gálico	

Tabela 1 - Fungos produtores de metabólitos antioxidantes e suas estruturas químicas (continuação).

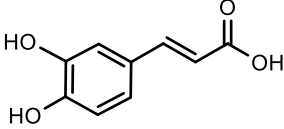
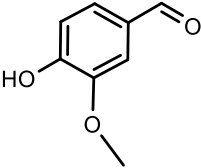
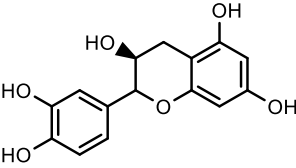
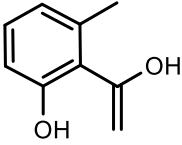
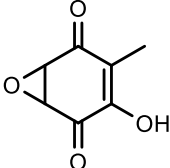
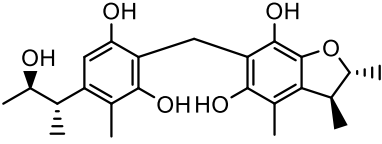
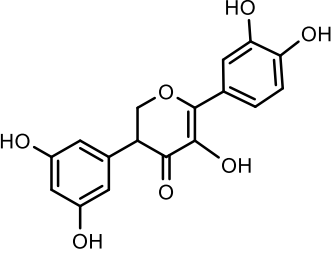
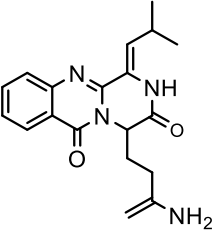
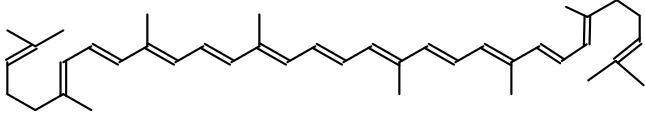
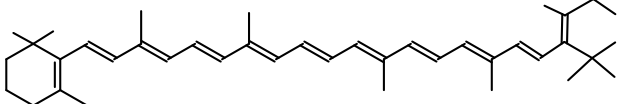
Fungo	Metabólito antioxidante	Estrutura química
<i>P. flavigenum</i> ^c	Ácido cafeico	
<i>P. flavigenum</i> ^c	Vanilina	
<i>P. flavigenum</i> ^c	Catequina	
<i>Pseudocercospora</i> sp. ^d	Ácido 6-metilsalicílico	
<i>Pseudocercospora</i> sp. ^d	Ácido terreico	
<i>P. citrinum</i> ^e	Dicitrinona E	
<i>Penicillium</i> sp. ^f	Quercetina	

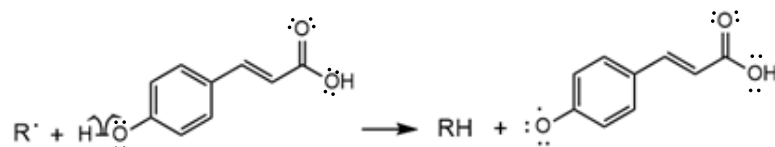
Tabela 1 - Fungos produtores de metabólitos antioxidantes e suas estruturas químicas (continuação).

Fungo	Metabólito antioxidante	Estrutura química
<i>Penicillium</i> sp. ^g	Aurantiomida C	
<i>Blakeslea trispora</i> ^h	Licopeno	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> ⁱ	β-caroteno	

^a CHEN et al., 2010; ^b SALAR et al., 2017; ^c TAVARES et al., 2018; ^d PRIHANTINI e TACHIBANA, 2017; ^e WANG et al., 2019; ^f GEORGE et al., 2019; ^g BOULIS et al., 2020; ^h SAINI e KEUM, 2019; ⁱ BHOWMIK e PATIL, 2018.

A ação antioxidante indireta consiste na reação de quelação de metais de transição. Os flavonoides são os principais compostos que atuam por esse mecanismo, por possuírem grupos hidroxila e grupos carbonila que atuam como sítios para quelar metais (LEOPOLDINI, 2011).

Figura 2 - Reação de transferência de hidrogênio do ácido p-cumárico para radicais livres.



Ao quelar metais de transição, como o Fe^{2+} , os antioxidantes impedem sua reação com o peróxido de hidrogênio (reação de Fenton, Figura 3) e a formação de radicais hidroxila, que são uma das espécies mais reativas presentes no organismo humano (HARB et al., 2016).

Figura 3 - Reação de Fenton com geração de radical hidroxila.

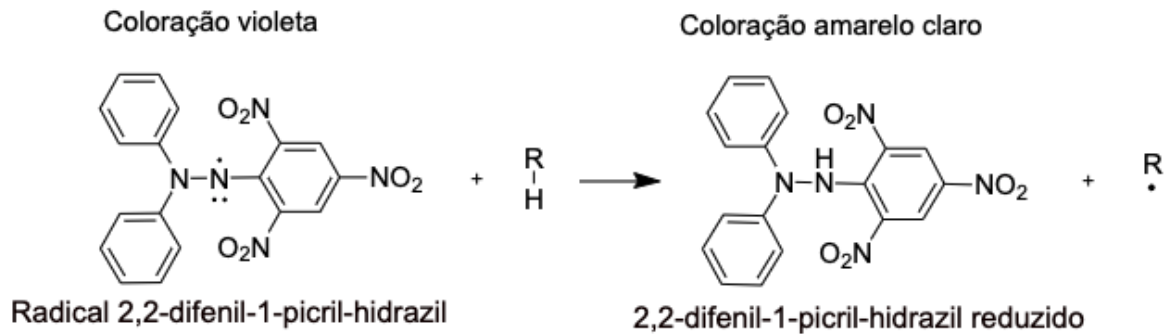
Os carotenoides apresentam mecanismo de ação antioxidante por transferência de elétron único, formação de aduto e, mais raramente, por transferência de hidrogênio (LEOPOLDINI, 2011). O ácido ascórbico, que possui dois grupos hidroxila ligados à lactona, atua como antioxidante por transferência de hidrogênio ou transferência de elétron único. No plasma humano, ele está presente na forma de ascorbato e atua como co-antioxidante com a vitamina E, protegendo o colesterol LDL da peroxidação (SANTOS-SACHEZ, 2019).

3.6 Avaliação da capacidade antioxidante

Devido ao estresse oxidativo estar relacionado a um grande número de doenças crônicas, o estudo de substâncias com ação antioxidante que possam ser incorporadas à dieta humana tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas. A capacidade antioxidante de produtos de origem microbiana ou vegetal, em geral, é avaliada por mais de um ensaio devido à sua complexidade, bem como devido aos diferentes mecanismos de ação dos compostos antioxidantes (SADEER et al., 2020).

Os ensaios *in vitro* utilizados para avaliação do potencial antioxidante são baseados em métodos químicos que envolvem principalmente transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons para redução de compostos radicalares ou íons metálicos (APAK et al., 2013). Dentre os ensaios existentes, os colorimétricos são os mais comuns e estão fundamentados na mudança que ocorre na transição eletrônica de compostos presentes no meio reacional. Um exemplo é o ensaio em que o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de coloração violeta, ao receber um átomo de hidrogênio, apresenta alteração de sua cor para amarelo claro, visualizada a 517 nm (SADEER et al., 2020). A reação que ocorre entre o radical DPPH e o composto antioxidante, representado como R-H, está mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Reação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil com um composto antioxidante hipotético (RH)



Outros exemplos de ensaios colorimétricos de avaliação do potencial antioxidante são aqueles que avaliam compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante total, flavonoides totais e poder redutor férrico. O ensaio de compostos fenólicos totais baseia-se na reação de uma mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, também denominado reagente de Folin Ciocalteou, com ânions fenolatos que provém das substâncias fenólicas em meio alcalino. Esses ânions reduzem os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, cuja coloração é detectável na banda do espectro de 760 nm por quantificação espectrofotométrica (PIRES et al., 2017). A capacidade antioxidante total é mensurada por um ensaio que tem como fundamento a reação do fosfomolibdato de amônio com um analito presente na amostra, ocorrendo redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) e formação de complexo verde. Para a realização do ensaio, a amostra diluída é colocada na presença de mistura de ácido sulfúrico, fosfato de sódio e molibdato de amônio em água destilada. A alteração resultante é medida pela leitura em espectrofotômetro a 695 nm (GYESI et al., 2019). Já o ensaio de poder redutor férrico baseia-se na capacidade dos componentes presentes na amostra de reduzirem o íon Fe (III) a Fe (II), formando um complexo azul em meio ácido. Para a realização do ensaio, em uma primeira etapa a amostra diluída é colocada na presença de tampão fosfato (pH 6,6) e solução de ferricianeto de potássio. Posteriormente, a mistura é colocada na presença de ácido tricloroacético e cloreto férrico. O valor é calculado a partir da leitura em espectrofotômetro a 700 nm, sendo diretamente proporcional ao poder de redução do composto químico presente na amostra testada. (KARADAG, 2009). O ácido ascórbico é utilizado como padrão positivo neste ensaio.

Após se detectar a presença de compostos capazes de doar elétrons e/ou transferir hidrogênios por ensaios *in vitro*, é possível avaliar o potencial desses compostos por ensaios *in vivo*. Um dos ensaios antioxidantes *in vivo* mais utilizados avalia a peroxidação lipídica, processo autocatalítico decorrente da morte celular. Este ensaio utiliza o malondialdeído como padrão positivo e os níveis de peróxidos lipídicos são determinados pela formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico dos animais testados, após serem submetidos à dieta contendo o composto antioxidante comparativamente à condição controle (ALAM et al., 2013).

3.7 Metabolismo fúngico

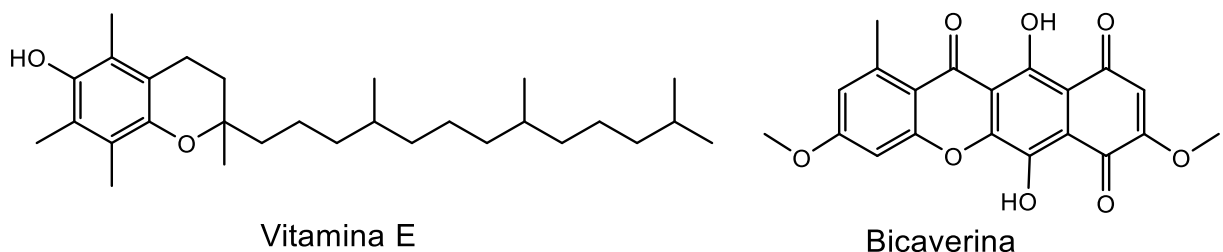
O metabolismo fúngico consiste de reações bioquímicas que geram metabólitos classificados como primários e secundários. Embora nem sempre haja uma separação clara, denominam-se metabólitos primários as substâncias comumente presentes nos seres vivos e indispensáveis à sua sobrevivência, enquanto os secundários são produzidos por organismos específicos e, a princípio, não são essenciais à sua sobrevivência. A biossíntese de metabólitos secundários ocorre a partir de uma sequência de reações pelas quais as células convertem os metabólitos primários em moléculas mais complexas. Apesar do grande número de metabólitos secundários conhecidos, estes são reunidos em poucos grupos, pois são produzidos a partir dos mesmos precursores (DEWICK, 2002).

Diferentemente do metabolismo primário, os genes biossintéticos envolvidos na produção de metabólitos secundários estão organizados em agrupamentos (*clusters*) no genoma, variando de dois a mais de vinte genes por *cluster* (PFANNENSTIEL e KELLER, 2019). Com as técnicas modernas de biologia molecular foi possível a elucidação completa das sequências de genomas fúngicos, o que levou à constatação de que o número de *clusters* gênicos que codificam as vias metabólicas é muito superior ao número de metabólitos secundários conhecidos para esses organismos (VANDERMOLEN et al., 2014). Assim, deduziu-se que grande parte desses genes fúngicos pode estar silenciada em condições *ex-situ* (ASAI et al., 2013).

Os *clusters* de genes dos metabólitos secundários dos fungos são co-regulados pela sua relação com o ambiente externo, fenômeno evidenciado pela

produção da bicaverina (Figura 5), um composto antibacteriano produzido pelo *Fusarium* sp. quando interage com a bactéria *Ralstonia solanacearum*, e também pela produção de tricotecenos (responsável por seu fator de virulência) pelo *Fusarium graminearum*, quando colonizado por plantas (PFANNENSTIEL e KELLER, 2019). Assim, diversas metodologias têm sido utilizadas para induzir a produção metabólica de fungos. Uma delas é a técnica de co-cultivo, que consiste na inoculação de duas ou mais espécies de microrganismos no mesmo meio de cultura de maneira a mimetizar o estresse biótico. Experimentos utilizando *Chaetomium* sp. e *Bacillus subtilis* (AKONE et al., 2016), *Paecilomyces lilacinus* e *Salmonella typhimurium* (TELES et al., 2013), co-cultivos de fungos e bactérias, comprovaram a eficácia desta metodologia para a produção de novas substâncias. O estresse causado pela interação fungo-fungo também pode ser efetivo. *Fusarium tricinctum* e *Fusarium begoniae* cultivados concomitantemente produziram metabólitos ausentes no metabolismo quando cultivados de forma isolada (WANG et al., 2013).

Figura 5 - Estruturas químicas de metabólitos fúngicos vitamina E e bicaverina.

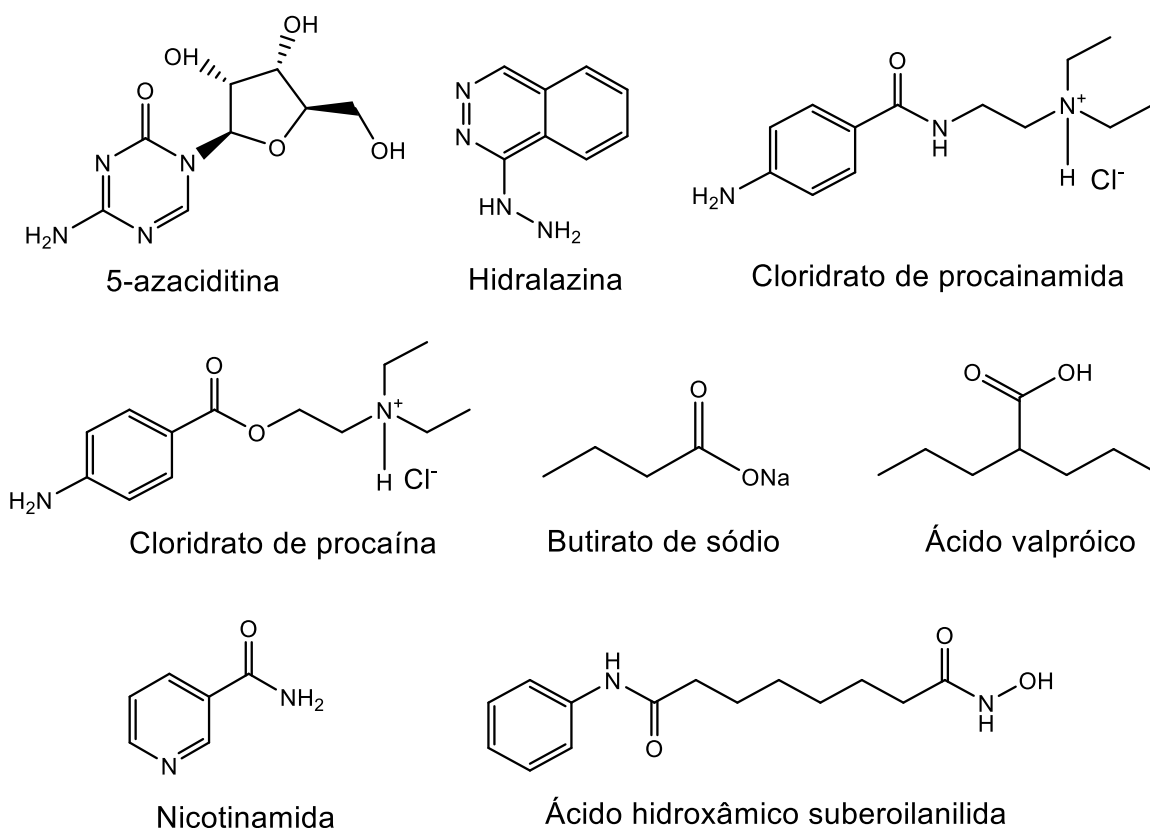


Uma abordagem mais comum para estimular o metabolismo secundário fúngico consiste na alteração dos parâmetros físicos (luminosidade, aeração, temperatura) (YOGABAANU et al., 2017), químicos (pH, composição de nutrientes) do meio de cultura (HAMEED et al., 2017) ou adição de modificadores da expressão gênica (epigenéticos) capazes de ativar genes suprimidos (STRAUSS e REYER-DOMINGUEZ, 2011).

Os moduladores epigenéticos mais comuns atuam sobre as enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e histona-desacetilases (HDACs), que participam dos processos da regulação gênica denominados metilação do DNA e modificação de histonas, proteínas que estão localizadas no nucleossomo, unidade básica da cromatina (STRAUSS e REYER-DOMINGUEZ, 2011). Alguns exemplos de moduladores epigenéticos inibidores de DNMT são 5-azacitidina (AZA) (AKONE et al.,

2016), hidralazina (HID), cloridrato de procainamida (PRO) e de procaína (PR). Dentre os inibidores de HDAC, os principais são butirato de sódio (BUT), ácido vaipróico (AV), nicotinamida (NIC) e ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA) (RAMESHA et al., 2018). As estruturas químicas desses moduladores são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Estruturas químicas dos moduladores epigenéticos 5-azacitidina, hidralazina, cloridrato de procainamida, cloridrato de procaína, butirato de sódio, ácido valproico, nicotinamida e ácido hidroxâmico suberoilânida.



Algumas alterações da expressão gênica em decorrência da modulação epigenética em fungos filamentosos estão apresentadas na Tabela 2. As estruturas químicas desses metabólitos, produzidos em decorrência da modulação epigenética, estão apresentadas na Figura 7 (pág. 37).

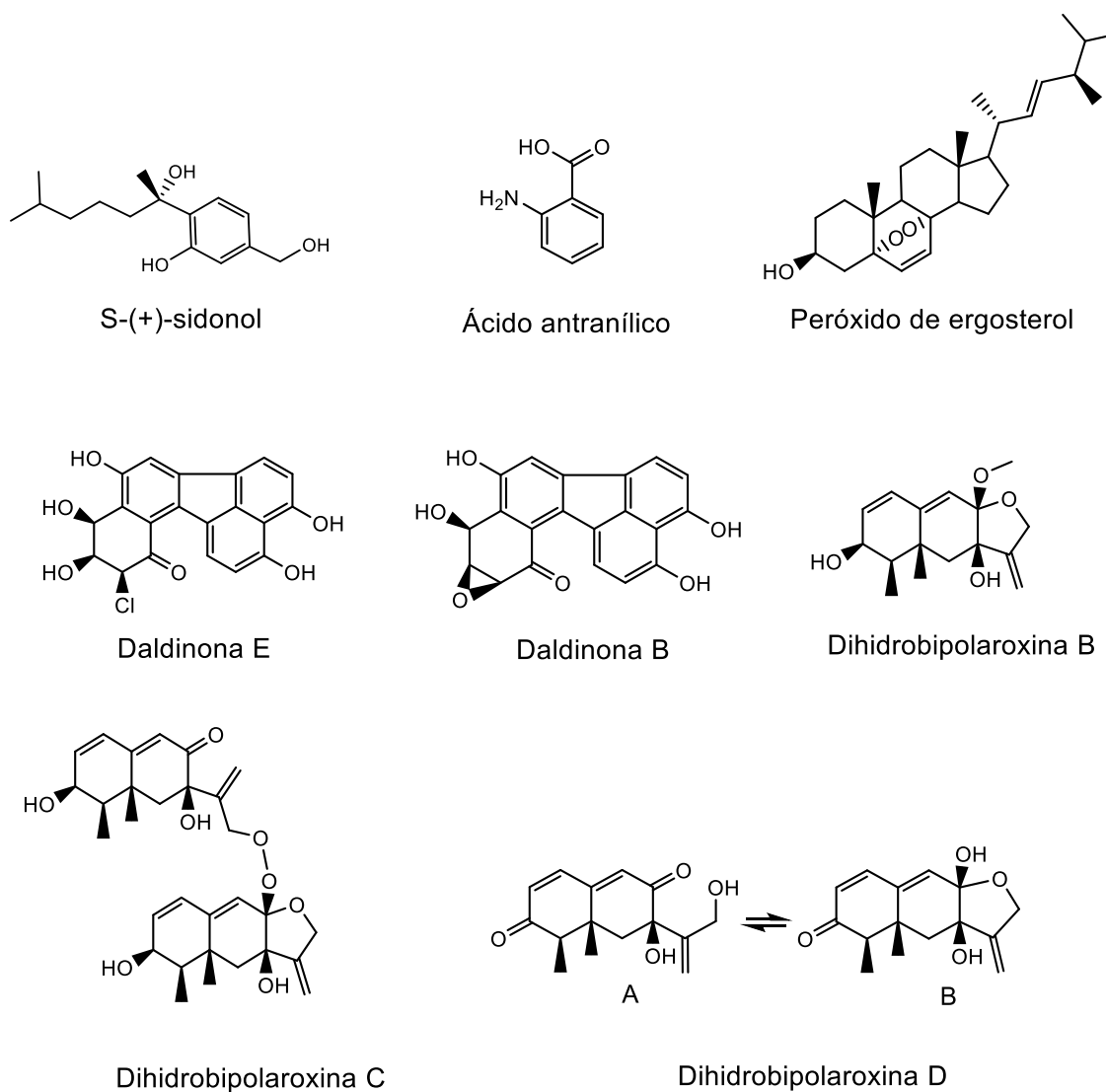
Tabela 2 - Efeito na expressão gênica de fungos cultivados na presença de moduladores epigenéticos do tipo inibidores de DNA metiltransferases (DNMT) e histona desacetilase (HDAC), em diferentes condições de cultivo.

Modulador epigenético (concentração)	Alvo de inibição	Fungo	Efeito na expressão gênica
AZA (100 µM)	DNMT	<i>Aspergillus sydowi</i> ^a	Aumento da produção de S-(+)-sidonol
BUT (0,02 M)	HDAC	<i>Penicillium brevicompactum</i> ^b	Produção de ácido antranílico e peróxido de ergosterol
SAHA (800 µM)	HDAC	<i>Daldinia</i> sp. ^c	Produção de daldinona E e aumento do rendimento da daldinona B
AZA (1 mM)	DNMT	<i>Aspergillus</i> sp. ^d	Produção de dihidrobipolaroxinas
SAHA (1 mM)	HDAC		B – D

AZA: 5-azacitidina; BUT: Butirato de sódio; SAHA: Ácido hidroxâmico suberoilânilida. Parâmetros fermentativos: ^a 10 dias de cultivo em caldo batata dextrosado (CHUNG et al., 2013); ^b 28 dias de cultivo em extrato de malte (EL-HAWARY et al., 2018); ^c 30 dias de cultivo em meio contendo cereal e sacarose (DU et al., 2014); ^d 15 dias de cultivo em meio contendo glicose, peptona, extrato de levedura e sal marinho (WANG et al., 2016); Extratos preparados utilizando acetato de etila como solvente extrator.

O uso de AZA (inibidor de DNMT), SAHA e BUT (inibidor de HDAC) foi capaz de induzir ou aumentar a produção de novos metabólitos pelas espécies *A. sydowii* (S-(+)-sidonol, com ação antidiabética e anti-inflamatória) (CHUNG et al., 2013), *P. brevicompactum* (EL-HAWARY et al., 2018) (ácido antranílico e peróxido de ergosterol com ação antioxidante intermediária), *Daldinia* sp. (daldinona E e B, com alta capacidade antioxidante) (DU et al., 2014) e *Aspergillus* sp. (dihidrobipolaroxinas B – D, com alta capacidade antioxidante) (WANG et al., 2016). Em todos os casos, a fermentação ocorreu entre 25 e 28 °C e sem agitação, exceto no experimento com *A. sydowii*, em que o experimento foi conduzido sob agitação a 150 rpm.

Figura 7 - Metabólitos fúngicos S-(+)-sidonol, ácido antranílico, peróxido de ergosterol, daldinona E, daldinona B e dihidrobipolaroxinas B – D, produzidos na presença de diferentes moduladores epigenéticos.



Desta forma, além dos inúmeros metabólitos secundários bioativos produzidos naturalmente por fungos, diversas alterações na etapa de cultivo podem levar à produção de novos metabólitos, o que pode ser devidamente explorado em estudos de triagem, como no presente trabalho.

3.8 Referências bibliográficas

ACEVEDO-ROCHA, C. G.; GRONENBERG, L. S.; MACK, M.; COMMICHAU, F. M.; GENEÉ, H. J. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 18-29, 2019.

AHMAD, S.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; AYAZ, M.; IMRAN, M.; ALI, I.; ZEB, A.; ULLAH, F.; SHAH, M. R. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase potentials of essential oil of *Rumex hastatus* D. Don collected from the North West of Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 29, p. 1-11, 2016.

AKONE, S. H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; LIN, W.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. **Tetrahedron**, v. 72, p. 6340-6347, 2016.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

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.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/documento-orienta-sobre-suplementos-alimentares>.

APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K. M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIRATA, N.; TANIGUCHE, T.; MONDE, K.; FUJII, I.; GOMI, K.; OSHIMA, Y. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. **Organic Letters**, v. 15, n. 13, p. 3346-3349, 2013.

ASHLEY, S.; BRADBURN, S.; MURGATROYD, C. A meta-analysis of peripheral tocopherol levels in age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. **Nutritional neuroscience**, p. 1-15, 2019.

AZIZAN, M. S.; ZAMANI, A. I.; STAHMANN, K. P.; NG, C. L. Fungal metabolites and their industrial importance: A brief review. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 19, p. 15-23, 2016.

BHOWMIK, S. N.; PATIL, R. T. Application of microbial biotechnology in food processing. In: PRASAD, R.; GILL, S. S.; TUTEJA, N. (ed.). *New and Future*

Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Crop Improvement through Microbial Biotechnology. Amsterdam: Elsevier, 2018: v. 1, cap. 5, p. 73-106.

BISHOP, K. S.; KAO, C. H.; XU, Y.; GLUCINA, M. P.; PATERSON, R. R. M.; FERGUSON, L. R. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. **Phytochemistry**, v. 114, p. 56-65, 2015.

BOULIS, A. G.; HAMED, A. A.; EL-AWADY, M. E.; MOHAMED, A. R.; ELIWA, E. M.; ASKER, M. M.; SHAABAN, M. Diverse bioactive metabolites from *Penicillium* sp. MMA derived from the red sea: structure identification and biological activity studies. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1985-1996, 2020.

CARDINALI, D. P.; VIGO, D. E.; OLIVAR, N.; VIDAL, M. F.; BRUSCO, L. I. Melatonin therapy in patients with Alzheimer's disease. **Antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 245-277, 2014.

CHEN, X.; SANG, X.; LI, S.; ZHANG, S.; BAI, L. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 447-454, 2010.

CHUNG, Y.; WEI, C.; CHUANG, D.; EL-SHAZLY, M.; HSIEH, C.; ASAI, T.; OSHIMA, Y.; HSIEH, T.; HWANG, T.; WU, Y.; CHANG, F. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3866-3872, 2013.

COTON, E.; COTON, M.; HYMERY, N.; MOUNIER, J.; JANY, J. L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59-73, 2020.

DEWICK, P. M. Secondary metabolism: The building blocks and construction mechanisms. In: Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach. Nottingham: Wiley, cap. 2, p. 7-11, 2002.

DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. Comparative study of *Monascus sanguineus* and its albino mutant based on molecular and chemical profiling. **Food Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 42-56, 2017.

DU, L.; KING, J. B.; CICHEWICZ, R. H. Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 2454-2458, 2014.

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014.

DYSKEN, M. W.; SANO, M.; ASTHANA, S.; VERTREES, J. E.; PALLAKI, M.; LLORENTE, M.; GUARINO, P. D. et al. (36 autores). Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. **Jama**, v. 311, n. 1, p. 33-44, 2014.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Food supplements, 2021. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-supplements>.

EL-HAWARY, S. S.; SAYED, A. M.; MOHAMMED, R.; HASSAN, H. M.; ZAKI, M. A.; RATEB, M. E.; ABDELMOHSEN, U. R. Epigenetic modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *Penicillium brevicompactum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 253, 2018.

GEORGE, T. K.; DEVADASAN, D.; JISHA, M. S. Chemotaxonomic profiling of *Penicillium setosum* using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02484, 2019.

GYESI, J. N.; OPOKU, R.; BORQUAYE, L. S. Chemical composition, total phenolic content, and antioxidant activities of the essential oils of the leaves and fruit pulp of *Annona muricata* L. (Soursop) from Ghana. **Biochemistry Research International**, v. 2019, 2019.

HAMEED, A.; HUSSAIN, S. A.; YANG, J.; IJAZ, M. U.; LIU, Q.; SULERIA, H. A. R.; SONG, Y. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1101, 2017.

HARB, T. B.; TORRES, P. B.; PIRES, J. S.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 2-6, 2016.

HUANG, L. K.; CHAO, S. P.; HU, C. J. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2020.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KRYL'SKII, E. D.; POPOVA, T. N.; SAFONOVA, O. A.; STOLYAROVA, A. O.; RAZUVAEV, G. A.; CARVALHO, M. A. P. Transcriptional regulation of antioxidant enzymes activity and modulation of oxidative stress by melatonin in rats under cerebral ischemia/reperfusion conditions. **Neuroscience**, v. 406, p. 653-666, 2019.

LEOPOLDINI, M.; CHIODO, S. G.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Detailed investigation of the OH radical quenching by natural antioxidant caffeic acid studied by quantum mechanical models. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4218-4233, 2011.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2046-2056, 2006.

MAMANI, L. D. G.; MAGALHÃES, A. I.; RUAN, Z.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. Industrial production, patent landscape, and market trends of arachidonic acid-rich oil of *Mortierella alpina*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 103-119, 2019.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: how epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, 2019.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 1-5, 2017.

PRIHANTINI, A. I.; TACHIBANA, S. Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7 n. 2, p. 110-115, 2017.

RAMESHA, K. P.; MOHANA, N. C.; NUTHAN, B. R.; RAKSHITH, D.; SATISH, S. Epigenetic modulations of mycoendophytes for novel bioactive molecules. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 663-668, 2018.

SADEER, N.; MONTESANO, D.; ALBRIZIO, S.; ZENGİN, G.; MAHOMOODALLY, M. F. The versatility of antioxidant assays in food science and safety — Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 709, 2020.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 657-674, 2019.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; SANDHU, K. S. Bioactive profile, free-radical scavenging potential, DNA damage protection activity, and mycochemicals in *Aspergillus awamori* (MTCC 548) extracts: a novel report on filamentous fungi. **3 Biotech**, v. 7, n. 164, 2017.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In SHALABY, E. (ed.). **Antioxidants**. Cairo: IntechOpen, 2019.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S. A.; TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 79, 2017.

SCHWECHHEIMER, S. K.; PARK, E. Y.; REVUELTA, J. L.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2107-2119, 2016.

STRAUSS, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 62-69, 2011.

SUBHAN, M.; FARYAL, R.; MACREADIE, I. Exploitation of *Aspergillus terreus* for the production of natural statins. **Journal of Fungi**, v. 2, p 1-13, 2016.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVA HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, 2017.

TAVARES, D. G.; BARBOSA, B. V. L.; FERREIRA, R. L.; DUARTE, W. F.; CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 148-154, 2018.

TELES, A. P.; ATALIBA, G. S.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of *Paecilomyces lilacinus* antimicrobial metabolite production by co-culturing with *Salmonella typhimurium*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 17, p. 1598-1601, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. DOI: 10.1016/j. biocel.2006.07.001

VANDERMOLEN, K. M.; DARVEAUX, B. A.; CHEN, W.; SWANSON, S. M.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Epigenetic manipulation of a filamentous fungus by the proteasome-inhibitor Bortezomib induces the production of an additional secondary metabolite. **RSC Advances**, v. 35, n. 4, p. 18329-18335, 2014.

VIDYA, C. H.; KUMAR, B. G.; CHINMAYEE, C. V.; SINGH, S. A. Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 885-895, 2020.

VEURINK, G.; PERRY, G.; SINGH, S. K. Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease. **Open Biology**, v. 10, n. 6, p. 1-16, 2020.

VONGSANGNAK, W.; RUENWAI, R.; TANG, X.; HU, X.; ZHANG, H.; SHEN, B.; SONG, Y.; LAOTENG, K. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous *Zygomycete fungi*. **Gene**, v. 521, n. 1, p. 180-190, 2013.

WANG, J. P.; LIN, W.; WRAY, V.; LAI, D.; PROKSCH, P. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 20, p. 2492-2496, 2013.

WANG, L.; LI, C.; YU, G.; SUN, Z.; ZHANG, G.; GU, Q.; ZHU, T.; CHE, Q.; GUAN, H. LI, D. Dicitrinones E and F, citrinin dimers from the marine derived fungus *Penicillium citrinum* HDN-152-088. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 44, p. 151182, 2019.

WANG, Y.; WANG, H.; CHEN, H. AChE inhibition-based multi-target-directed ligands, a novel pharmacological approach for the symptomatic and disease-modifying therapy of Alzheimer's disease. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 4, p. 364-375, 2016.

WHO, World Health Organization. The top 10 causes of death, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

YAO, Q.; CHEN, H.; WANG, S.; TANG, X.; GU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q. An efficient strategy for screening polyunsaturated fatty acid-producing oleaginous filamentous fungi from soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 158, p. 80-85, 2019.

YOGABAANU, U.; WEBER, J-F. F. W.; CONVEY, P.; RIZMAN-IDID, M.; ALIAS, S. A. Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. **Polar Science**, v. 14, p. 60-67, 2017.

ZHANG, K.; WU, W.; YAN, Q. Research advances on sake rice, koji, and sake yeast: A review. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 7, p. 2995-3003, 2020.

4 CAPÍTULO I: Fungos filamentosos como fonte de metabólitos biotecnologicamente úteis para neuroproteção

DOMINGUETE, L.; TAKAHASHI, J. A. Filamentous Fungi as Source of Biotechnologically Useful Metabolites and Natural Supplements for Neurodegenerative Diseases Treatment. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 295-300, 2018. <https://doi.org/10.3303/CET1864050>

295



VOL. 64, 2018

Guest Editors: Enrico Bardone, Antonio Marzocchella, Tajalli Keshavarz

Copyright © 2018, AIDIC Servizi S.r.l.

ISBN 978-88-95608-56-3; ISSN 2283-9216



DOI: 10.3303/CET1864050

Filamentous Fungi as Source of Biotechnologically Useful Metabolites and Natural Supplements for Neurodegenerative Diseases Treatment

Laura Ciribelli Borges Dominguete^{*a}, Jacqueline Aparecida Takahashi^{ab}

^a Post-Graduation Course on Food Science, Pharmacy Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Este capítulo contém a metodologia e os resultados experimentais obtidos para a triagem e seleção dos fungos filamentosos produtores de metabólitos com potencial antioxidante e atividade inibitória de acetilcolinesterase (dados publicados no artigo científico com o título “*Filamentous Fungi as Source of Biotechnologically Useful Metabolites and Natural Supplements for Neurodegenerative Diseases Treatment*”). Informações e resultados pertinentes obtidos posteriormente à publicação do artigo científico foram acrescentados ao capítulo.

4.1 Introdução

Fungos filamentosos são microrganismos que têm sido cada vez mais utilizados para obtenção de substâncias biologicamente ativas, devido à sua extraordinária capacidade biossintética e de crescimento relativamente rápido. Metabólitos fúngicos tem sido estudados para serem utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica como pigmentos (DUFOSSÉ et al. 2014), agentes antimicrobianos (NISA et al., 2015; LUCAS, CASTRO e TAKAHASHI, 2007), imunossupressores ou imunoestimulantes (LU et al., 2014), antioxidantes (SMITH, DOYLE e MURPHY, 2015; SURESHA e SRINIVASAN, 2013), inibidores enzimáticos (ALY, DEBBAB e PROKSCH, 2011; GUTIERREZ et al., 2005), citotóxicos para células cancerígenas (BHIMBA et al., 2012; ZHAO et al., 2013) entre outros (AKONE et al. 2016; MISHRA e MALIK, 2014).

Pigmentos antioxidantes como o licopeno e β -caroteno, provenientes da fermentação de *Blakeslea trispora* são comercializados mundialmente. Este último é um metabólito de alto rendimento, chegando a serem produzidos 17 g por litro de meio de cultura (DUFOSSÉ et al. 2014). Astaxantina e neuroesporaxantina também são carotenoides produzidos pelos fungos *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Fusarium fujikuroi*, respectivamente (PARRA-RIVERO et al., 2020). A maquinaria fúngica tem sido cada vez mais utilizada para obtenção de pigmentos antioxidantes devido à facilidade do cultivo em larga escala e o grande arsenal de informações das espécies com potencial biotecnológico (DUFOSSÉ et al. 2014).

Como o estresse oxidativo está relacionado a diversas doenças, dentre elas, as neurodegenerativas (LI et al., 2015; SCHRAG et al., 2013) alguns compostos antioxidantes também têm sido investigados quanto à atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE), enzima envolvida no processo patológico da doença de Alzheimer (MENDIOLA-PRECOMA et al., 2016; ZHANG et al., 2008).

A grande maioria dos estudos científicos que investigam os metabólitos secundários fúngicos quanto às possíveis atividades biológicas, obtém extratos a partir da utilização de solventes como metanol, etanol, acetato de etila, ou outros (ABRAHAM et al., 2015; BHIMBA et al 2012; SARAVANAKUMAR et al., 2015), o que gera grande gasto de tempo, mão de obra, reagentes e resíduos. No presente trabalho, investigaram-se os próprios caldos fermentados contendo metabólitos

secundários, para a seleção de uma das espécies com maior atividade. Mediante o exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar o potencial antioxidante e a capacidade inibitória de AChE dos caldos fermentados, identificar as espécies mais ativas e avaliar o extrato e fração purificada de uma delas por meio de diferentes técnicas analíticas.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais

Os reagentes utilizados para análise de capacidade antioxidante total foram: ácido sulfúrico P. A. (Química Moderna, São Paulo, Brasil), molibdato de amônio P. A. (Labsynth, Diadema, Brasil), fosfato bibásico de sódio (Labsynth, Diadema, Brasil), ácido L-ascórbico P. A. (Neon, São Paulo, Brasil). Para análise de inibição de AChE utilizou-se albumina sérica bovina (Sigma, St. Loius, USA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Sigma, St. Loius, USA), Tris/HCl iodeto de acetiltiocolina (ATCI) (Sigma, St. Loius, USA), acetilcolinesterase de enguia elétrica, tipo V-S (Sigma, St. Loius, USA) e eserina (Sigma, St. Loius, USA). Os solventes utilizados para análises por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) foram metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA) e clorofórmio deuterado (Merck, Alemanha), respectivamente. Para cromatografia em coluna foram utilizados os solventes hexano, metanol e acetato de etila P. A. (Anidrol, São Paulo, Brasil), sendo este último utilizado também para extração do caldo fermentado e biomassa por partição líquido-líquido do fungo selecionado.

Os fungos filamentosos utilizados no presente trabalho foram isolados de solo pobre em compostos orgânicos e cedidos pelo Dr. Ivanildo Evódio Marriel, da EMBRAPA Milho e Sorgo. Os mesmos foram preservados pela técnica de Castelani e armazenados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaβB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Para o desenvolvimento do estudo, eles foram cultivados à temperatura ambiente (25 °C) por 28 dias em 200 mL de meio líquido padronizado (MLP) previamente esterilizado em autoclave vertical (Phoenix) a 120 °C por 20 min. O MLP foi composto por peptona (5 g/L), sacarose (30 g/L), fosfato de potássio dibásico (1g/L), sulfato cúprico

pentahidratado (0,005 g/L) (Synth, Diadema, São Paulo), nitrato de sódio (2,5 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,5 g/L), sulfato ferroso heptahidratado (0,001g/L) e cloreto de potássio (0,5 g/L) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (BRACARENSE e TAKAHASHI, 2014). Os caldos fermentados foram submetidos a ensaios *in vitro* da capacidade antioxidante total pelo método colorimétrico do fosfomolibdato e da atividade inibitória de acetilcolinesterase (AChE) pelo método espectrofotométrico proposto por Ellman (1961), ambos descritos a seguir. Somente os fungos com melhor desempenho em ambos os ensaios realizados foram identificados por biologia molecular.

Para análise por espectrometria de massas foi utilizado o espectrômetro de massas LCQ Fleet (ThermoScientific, São José, CA, EUA) acoplado a uma fonte de ionização em paper (*Paper Spray*) e para análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizado espectrômetro Bruker AVANCE DRX400 de ressonância magnética nuclear de alta resolução. Os dois equipamentos estão localizados no Departamento de Química da UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Ensaio da capacidade antioxidante total (método do fosfomolibdato)

A capacidade antioxidante total (CAT) dos caldos foi avaliada pelo método proposto por UMAMAHESWARI e CHATTERJEE (2008). Ácido L-ascórbico foi utilizado como padrão. Uma solução estoque de ácido ascórbico (500 µL/mL) foi preparada em água destilada, a partir da qual foram preparadas diluições de 3 a 20 µg/mL. Em tubos de ensaio, 300 µL de caldo foram misturados com 3 mL de reativo de trabalho (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). Os tubos foram cobertos com papel alumínio e levados em estufa por 90 min, a temperatura de 95 °C. Posteriormente, 200 µL do conteúdo de cada tubo foram pipetados em uma microplaca de 96 poços para leitura em um leitor de microplacas (Multiscan FC) a 695 nm. A capacidade antioxidante total foi expressa em µg equivalente de ácido ascórbico (EAA) por mL de caldo. O ensaio foi feito em triplicata.

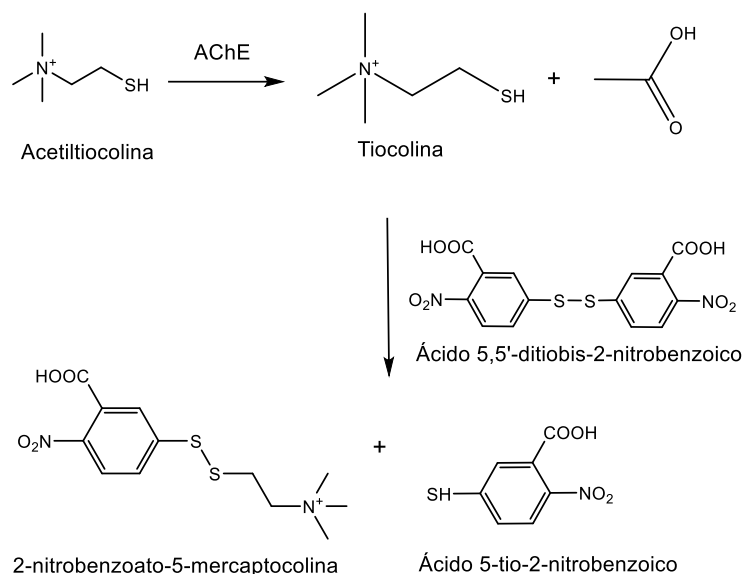
4.2.2.2 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Para se determinar a capacidade inibitória da AChE dos compostos presentes nos caldos, realizou-se o ensaio de acordo com o método desenvolvido por Ellmann (1961).

Em poços de microplaca, adicionaram-se 25 µL da solução padrão de ATCI (15 mM), 125 µL da solução de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico ou reagente de Ellman (3 mM), 50 µL da solução tampão Tris/HCl (50 mM) pH 8,0 contendo albumina sérica bovina (0,1% p/v) e 25 µL dos diferentes caldos fermentados pelos fungos. Para comparação dos resultados obtidos, no lugar do caldo pipetaram-se 25 µL do padrão de eserina (controle positivo do teste) e separadamente, pipetaram-se 25 µL DMSO (controle negativo do teste). A absorbância das amostras e dos controles foi mensurada por leitor de microplacas (Multiscan FC) a um comprimento de onda de 406 nm, sendo a leitura feita a cada 60s, por 8 vezes (totalizando 8 minutos). Após finalização desta leitura, adicionaram-se 25 µL de solução contendo a enzima AChE (0.222 U/mL) aos poços da placa e a absorbância foi mensurada novamente a cada 60 s, por 8 vezes (8 minutos de leitura). A enzima AChE utilizada foi dissolvida em solução tampão Tris/HCl e a eserina, padrão positivo do teste, foi preparada na concentração de 1 mg/mL, em DMSO. O ensaio foi feito em quadruplicata. As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as velocidades de reação promovida pela amostra com a velocidade de reação do controle negativo das amostras (água destilada) por meio do seguinte cálculo: % inibição = $100 - (\text{velocidade de reação da amostra} / \text{velocidade de reação do controle negativo} \times 100)$. Para apresentação dos resultados das amostras testadas, calcularam-se suas porcentagens de inibição considerando-se o resultado da eserina (controle positivo) como sendo 100%.

Este ensaio é baseado na reação química entre o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) e a tiocolina, que é produzida a partir da hidrólise da acetiltiocolina pela ação da enzima acetilcolinesterase. Um dos produtos da reação do DTNB com a tiocolina, o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, possui coloração amarelada, cuja absorbância é lida a 405 nm (POHANKA et al., 2011). Sendo assim, o valor de absorbância do meio reacional é inversamente proporcional à ação inibitória da acetilcolinesterase. As reações descritas anteriormente estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Reação da tiocolina, produzida pela hidrólise da acetiltiocolina pela acetilcolinesterase, com ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico com produção de 2-nitrobenzoato-5-mercaptocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (de coloração amarelada).



4.2.2.3 Identificação das espécies de interesse

Dentre os 50 fungos cujos caldos foram avaliados, três apresentaram resultados superiores em relação aos demais para capacidade antioxidante total e atividade inibitória da acetilcolinesterase, sendo por isso, identificados por biologia molecular em parceria com a EMBRAPA (Sete Lagoas), pelo pesquisador Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana. Estes fungos foram identificados como *H. lixii*, *P. flavigenum* e *P. tanzanicum*. A espécie *P. flavigenum* foi selecionada para caracterização química do caldo, extrato bruto e frações purificadas por diferentes técnicas apresentadas no presente capítulo.

4.2.2.4 Obtenção do extrato bruto da espécie *P. flavigenum*

Após 28 dias de cultivo do *P. flavigenum* no meio de cultura MLP, foram adicionados 30 mL de acetato de etila à biomassa contida no frasco do experimento. Em seguida, a biomassa foi separada por filtração em papel e o caldo fermentado extraído com 30% de acetato de etila (3 vezes; 30% de solvente extrator v/v). As frações orgânicas foram combinadas, o solvente foi removido com a utilização de um rotaevaporador a 70°C e o extrato concentrado foi transferido para frasco pesado.

Após completa evaporação do solvente, o extrato seco foi pesado e armazenado sob refrigeração até ser analisado.

4.2.2.5 Cromatografia em coluna do extrato bruto de *P. flavigenum*

Uma massa de 107,63 mg do extrato bruto de *P. flavigenum* foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta empacotada com sílica-gel. Foram recolhidas 62 frações de 100 mL cada, usando o gradiente hexano, acetato de etila e metanol, conforme mostrado na Tabela 1, apresentada a seguir.

Tabela 1 - Proporção e quantidade de eluentes recolhidos no fracionamento cromatográfico do extrato do *Penicillium flavigenum*.

Fração (ou frações)	Eluente utilizado (porcentagem)	Volume (mL) adicionado de eluente
1	Hexano (100%)	80
2 a 24	Hexano/acetato de etila (80%)	120
25	Hexano/acetato de etila (70%)	120
26 a 30	Hexano/acetato de etila (50%)	120
31 a 34	Hexano/acetato de etila (40%)	160
35 a 41	Hexano/acetato de etila (20%)	150
42 a 47	Acetato de etila (100%)	120
48 a 52	Acetato de etila/metanol (90%)	100
53 a 59	Acetato de etila/metanol (80%)	100
60 a 62	Acetato de etila/metanol (50%)	100

A combinação de frações de 8-16 (39,68 mg) mostrou alto grau de pureza por cromatografia em camada delgada e foi submetida à análise por ressonância magnética nuclear (RMN) e por *Paper Spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS).

4.2.2.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, 5,0 mg da substância isolada de *P. flavigenum* foram solubilizados em 300 µL de clorofórmio deuterado e transferidos para tubos de 5 mm de diâmetro. As análises foram feitas em espectrômetro Bruker AVANCE DRX400 de ressonância magnética de alta resolução. Foram realizados experimentos unidimensionais (RMN de ^1H) na frequência de 400 MHz.

4.2.2.7 Análise por *paper spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS)

A técnica de ionização por *Paper Spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS) permite uma caracterização química parcial ou total de amostras complexas com utilização de volumes muito baixos de amostra e de solventes orgânicos, além de poder ser realizada com um mínimo preparo de amostra e em poucos minutos (WANG et al., 2010). Neste trabalho, por meio da técnica de PS-MS foram analisados meio de cultura (branco), caldo fermentado, extrato bruto e as frações de 8-16 obtidas por fracionamento cromatográfico (item 4.2.2.4) do *P. flavigenum*. O extrato bruto e as frações 8-16 foram solubilizadas em metanol a 1,0 mg/mL. As análises foram realizadas em triplicata no modo de ionização positivo. As condições experimentais foram: faixa de massa de 100 a 1000 m/z, tensão da fonte: 5,0 kV, tensão capilar de 40 V, temperatura do tubo de transferência de 275 °C, voltagem de lentes de tubo de 120 V, distância da ponta do papel cromatográfico à entrada do espectrômetro: 0,5 cm e energia de colisão para fragmentação: 15 a 30 eV (PEREIRA et al., 2016). Para realizar as análises, um total de 2,0 µL das amostras foi adicionado ao papel cromatográfico (cortado em formato de um triângulo equilátero de 1,5 cm de comprimento lateral) que estava apoiado em um clipe metálico conectado a uma fonte de alta tensão do espectrômetro de massas. Em seguida, 30,0

μL de metanol foram aplicados ao papel cromatográfico e a fonte de tensão foi conectada para aquisição dos dados. Os íons foram utilizados para identificação dos compostos com base nos dados descritos na literatura.

4.2.2.8 Análise estatística

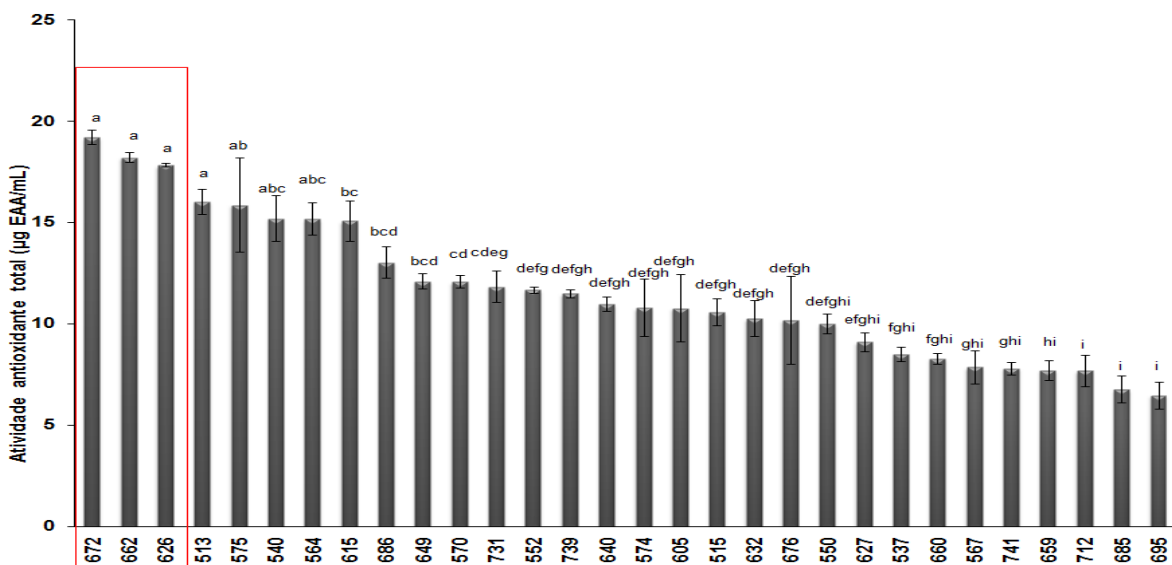
Foi realizada uma análise de variância (Anova de fator único) entre as médias dos resultados dos ensaios de atividade biológica dos caldos fermentados, seguida do teste de Tukey com 95 % de confiança para avaliar a diferença entre os valores encontrados. O programa utilizado foi Graphpad Prisma 5.02.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Capacidade antioxidante total

Dentre os caldos fermentados avaliados, os que apresentaram os maiores valores no ensaio de capacidade antioxidante total pelo método de fosfomolibdato foram avaliados quanto à inibição da AChE. Os resultados dos 30 fungos com maiores valores de capacidade antioxidante total estão apresentados no gráfico da Figura 2.

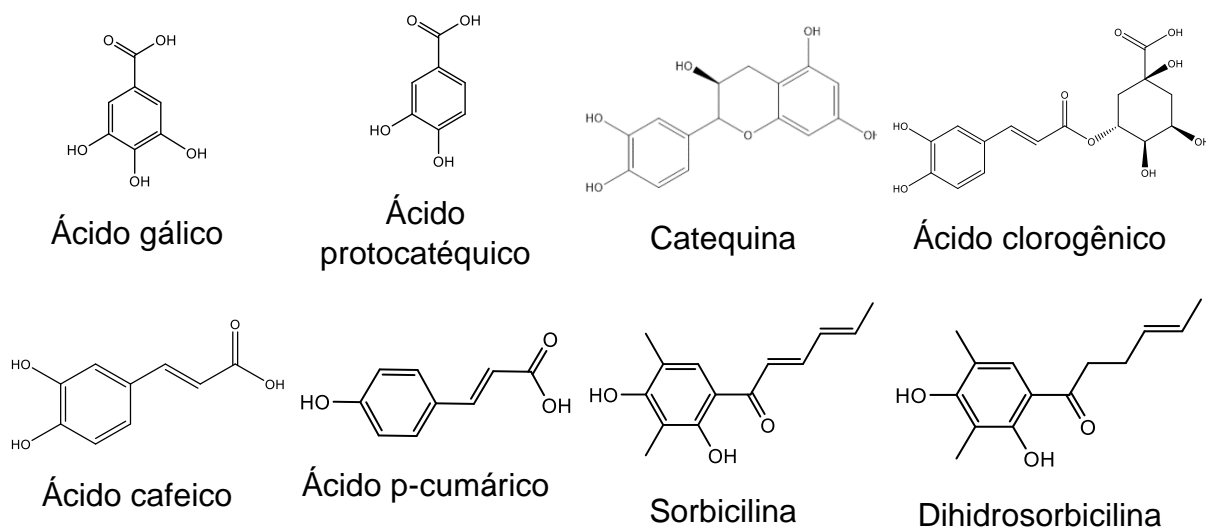
Figura 2 - Capacidade antioxidante total dos caldos de fungos filamentosos (μg equivalente de ácido ascórbico por mL de caldo).



Os fungos estão apresentados por diferentes códigos numéricos. Fungos identificados: códigos 672: *P. tanzanicum*; 662: *H. lixii*; 626: *P. flavigenum*. Colunas com letras diferentes são diferentes estatisticamente (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os caldos fermentados pelos fungos de códigos 672 (19,21 μg EAA/mL de caldo), 662 (18,22 μg EAA/mL de caldo), 626 (17,85 μg EAA/mL de caldo), identificados como *P. tanzanicum*, *H. lixii* e *P. flavigenum* respectivamente, apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante total, juntamente com os fungos de código 513 (16,04 μg EAA/mL de caldo), 575 (15,86 μg EAA/mL de caldo), 540 (15,20 μg EAA/mL de caldo) e 564 (15,18 μg EAA/mL de caldo). Estudo de Khalil e colaboradores (2020) relatou uma capacidade antioxidante total de 13 μg EAA/mL para o extrato do fungo *Aspergillus oryzae*, semelhante à encontrada neste estudo. Smith, Doyle e Murphy (2015) também demonstraram que extratos dos fungos filamentosos *Pleurotus* sp. e *Monascus purpureus*, após cultivo em meio líquido, apresentaram atividade antioxidante semelhante ao antioxidante comercial hidroxitolueno butilado (BHT), confirmando o potencial de alguns fungos filamentosos em produzirem substâncias com capacidade antioxidante com potencial aplicação na indústria alimentícia (BHIMBA et al., 2012). Outros trabalhos com a espécie *P. flavigenum* demonstraram um potencial antioxidante de seus extratos a partir de resultados do ensaio de compostos fenólicos totais, cujos valores foram 62,0 mg EAG/g (CANTURK et al., 2017), 201,0 mg EAG/g (cepa CML2965) e 18 mg EAG/g (cepa CML3827) (TAVARES et al., 2018). Além disso, esse fungo produziu ácido cafeico e catequina, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3 (TAVARES et al., 2018), confirmando seu potencial como produtor de metabólitos antioxidantes.

Figura 3 - Estruturas químicas de metabólitos produzidos por *P. flavigenum*.



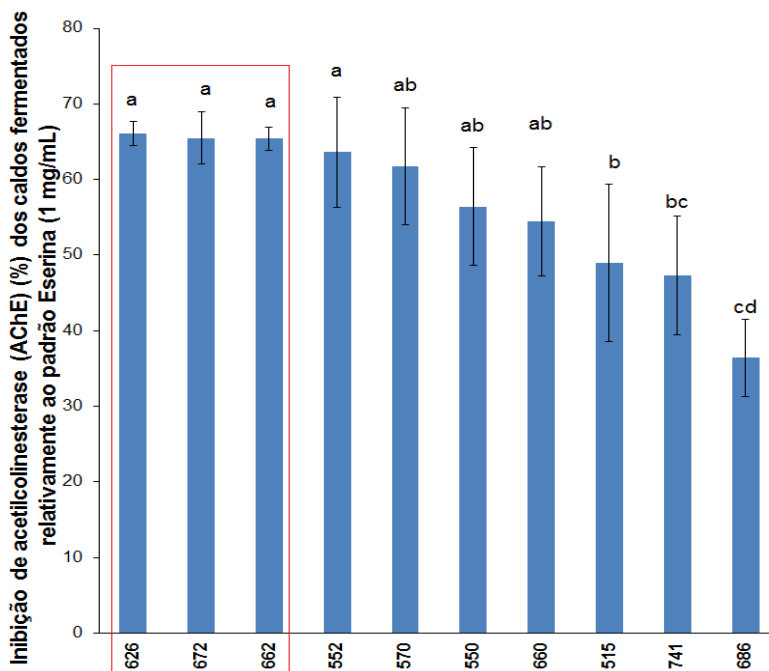
Em relação ao *P. tanzanicum* e *H. lixii*, não há estudos prévios sobre produção de compostos antioxidantes sendo, portanto, resultados inéditos.

4.3.2 Capacidade de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Os trinta caldos que apresentaram maior capacidade antioxidante foram testados quanto à inibição da acetilcolinesterase e dez apresentaram valores superiores a 20% de inibição de AChE, sendo descritos na Figura 4.

Os fungos cujos caldos apresentaram maior atividade inibitória da enzima em questão foram os de código 626 (*P. flavigenum*) com 66,1%, 672 (*P. tanzanicum*) com 65,8%, 662 (*H. lixii*) com 65,4%, 552 (63,6%), 570 (61,8%), 550 (56,4%) e 660 (54,5%) relativamente ao padrão eserina (1 mg/mL). Os que apresentaram porcentagens inferiores foram os de código 515 (49%), 741 (47,3%) e 686 (36,4%). Não foram encontrados estudos dos fungos *H. lixii*, *P. flavigenum* ou *P. tanzanicum* quanto à inibição de AChE.

Figura 4 - Percentual de inibição de AChE para dez caldos de fungos filamentosos em relação à eserina (1 mg/mL, padrão positivo).



Os fungos estão apresentados por diferentes códigos numéricos. Fungos identificados: códigos 626: *P. flavigenum*; 672: *P. tanzanicum* e 662: *Hypocrea lixii*. Colunas com letras diferentes são diferentes estatisticamente (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0,05$).

Não foram encontrados estudos sobre a atividade inibitória de AChE pelos fungos *P. flavigenum* e *P. tanzanicum*, mas a produção de compostos com esta atividade é relatada para fungos do mesmo gênero. A arisugasina A produzida por *Penicillium* sp. apresentou EC₅₀ de 1 nM (KUNO et al., 1996) e extratos brutos de *Penicillium janthinellum* cultivado em caldo batata inibiram a atividade de acetilcolinesterase em 40%. Este mesmo fungo cultivado tanto na presença do modulador epigenético procainamida e na presença de procainamida + hidralazina apresentou atividade inibitória de acetilcolinesterase de 100% (LIMA et al., 2018). Portanto, a utilização de moduladores epigenéticos pode ser uma ferramenta promissora para obtenção de metabólitos com alta atividade inibitória de AChE.

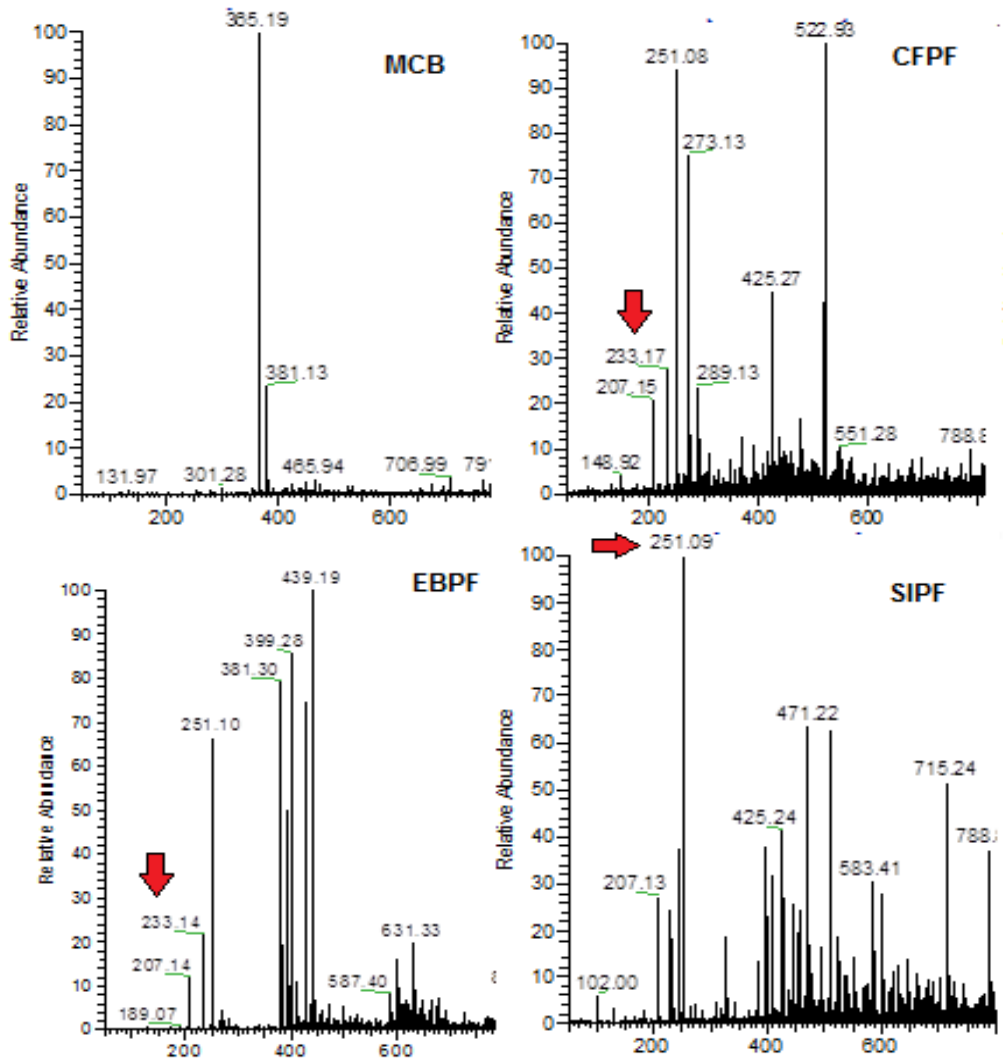
4.3.3 Seleção da primeira espécie para análise química: *Penicillium flavigenum*

Após a triagem, foram selecionados os fungos *H. lixii*, *P. flavigenum* e *P. tanzanicum* para novo cultivo e extração com acetato de etila. O fungo *H. lixii* apresentou baixo rendimento em massa de extrato seco e por isso, trabalhou-se somente com as outras duas espécies supracitadas, sendo a espécie *P. tanzanicum* descrita no capítulo II, apresentado no item 5.

O caldo fermentado (CFPF), o extrato bruto (EBPF) e a fração purificada do extrato do *P. flavigenum* (SIPF) foram analisados por PS-MS, cujos espectros estão apresentados na Figura 5. O meio de cultura líquido do experimento (MCB) também foi analisado para visualização dos possíveis interferentes presentes em sua composição.

O pico com m/z 233,14 visualizado nos espectros CFPF e EBPF sugerem a possibilidade da presença de sorbicilina (Figura 5) [M+1]⁺ no caldo e no extrato de *P. flavigenum*. Este metabólito é um pigmento que possui dois grupos hidroxila em sua estrutura, capazes de doar radicais hidrogênio para radicais livres, sendo portanto um metabólito com potencial antioxidante. Diferentes trabalhos na literatura relataram a produção desse composto por fungos como *P. flavigenum* (CANTURK et al., 2017), *P. chrysogenum*, *P. notatum* e *Penicillium* sp. (MENG et al., 2016) e sua importância devido às propriedades antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória (SALO et al., 2016). Esse metabólito também foi produzido por *Trichoderma* sp. quando cultivado por 20 dias em meio líquido peptonado (LAN et al., 2012).

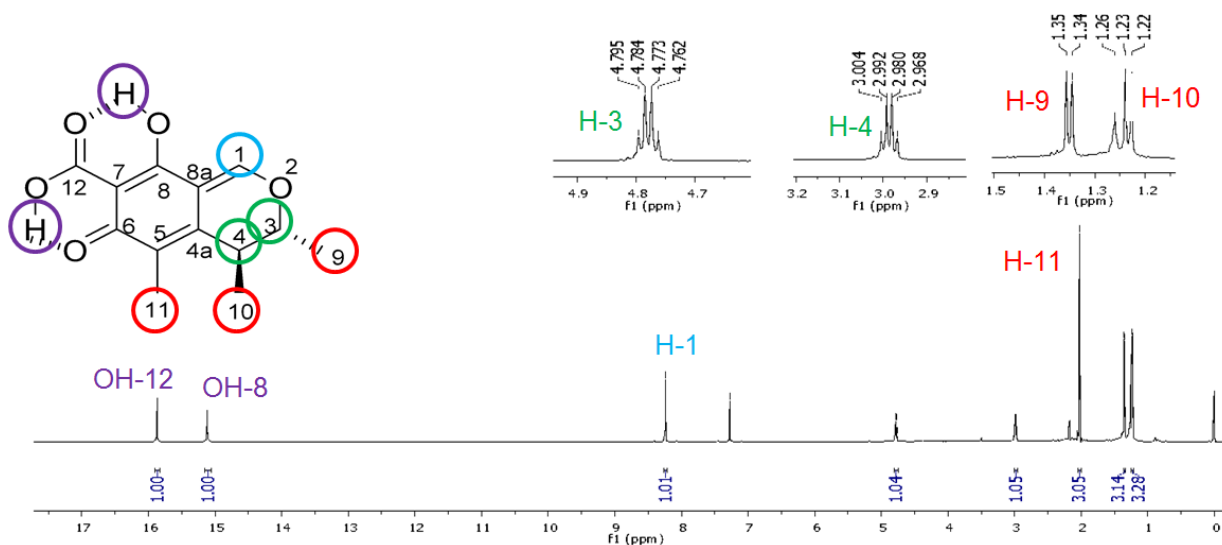
Figura 5 - Espectro de massas obtido por *Paper Spray* (PS-MS) no modo positivo do controle do meio de cultura (MCB); do caldo fermentado bruto (CFPF); do extrato bruto em acetato de etila (EBPF) e da fração purificada (SIPF) de *P. flavigenum*.



Um composto da mesma classe da sorbicilina, a sorbiterrina A, produzido por *Penicillium terrestre* apresentou efeito moderado para inibição de acetilcolinesterase ($EC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$) em trabalho de Chen et al. (2012).

No presente estudo, uma substância foi obtida após fracionamento do extrato e identificada por RMN de ^1H e comparação com a literatura (HAJJAJ et al., 1999) como sendo a citrinina (250.084124 g/mol), uma micotoxina comumente produzida por fungos do gênero *Penicillium* (OTERO et al., 2020) e por outras espécies fúngicas (TAKAHASHI et al., 2020). O pico em m/z 251,08 corresponderia ao $[M+1]^+$. A Figura 6 apresenta a estrutura da citrinina, o espectro de RMN de ^1H e a devida atribuição dos sinais do espectro.

Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3), estrutura e atribuição dos sinais dos hidrogênios da citrinina.



O caldo do *P. flavigenum* apresentou capacidade antioxidante total de 17,9 $\mu\text{g/mL}$ de equivalente de ácido ascórbico e 66,1% de inibição de AChE comparativamente à eserina e a fração purificada apresentou valor de 20% de inibição de AChE. Levando-se em consideração a presença da micotoxina citrinina no extrato e no caldo e que a atividade biológica detectada pode estar parcialmente relacionada a esta substância, não se prosseguiu com o estudo de *P. flavigenum*. O cultivo de *P. flavigenum* na presença de moduladores epigenéticos é uma perspectiva interessante para trabalhos futuros, pois a produção da citrinina poderia ser inibida e a produção de sorbicilina e de outros metabólitos bioativos poderia ser aumentada.

4.4 Conclusões

Dentre os 50 fungos estudados, três espécies se destacaram na triagem inicial onde foi monitorada a capacidade antioxidante total e a inibição de acetilcolinesterase. Estas espécies são *H. lixii*, *P. flavigenum* e *P. tanzanicum*. Problemas relacionados ao rendimento do extrato seco obtido a partir da partição líquido-líquido e à detecção de citrinina levaram à descontinuação do estudo com *H. lixii* e *P. flavigenum*, respectivamente. O fungo *P. tanzanicum* apresentou capacidade antioxidante total significativa em relação aos demais e inibição significativa de AChE, tendo sido então estudado mais profundamente, como será apresentado no capítulo II.

4.5 Referências bibliográficas

ABRAHAM, S.; BASUKRIADI, A.; PAWIROHARSONO, S.; SJAMSURIDZAL, W. Insecticidal activity of ethyl acetate extracts from culture filtrates of mangrove fungal endophytes. **Mycobiology**, v. 43, p. 137-149, 2015.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.

BHIMBA, B. V.; FRANCO, D. A. A. D.; MATHEW, J. M.; JOSE, G. M.; JOEL, E. L.; THANGARAJ, M. Anticancer and antimicrobial activity of mangrove derived fungi *Hypocrea lixii* VB1. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, p. 77-80, 2012.

BRACARENSE, A. A.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.

CANTURK, Z.; KOCABIYIK, E.; OZTURK, N.; İLHAN, S. E. M. R. A. Evaluation of antioxidant and antiproliferative metabolites of *Penicillium flavigenum* isolated from hypersaline environment: Tuz (Salt) Lake by Xcelligence technology. **Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 346-354, 2017.

CHEN, L.; ZHU, T.; DING, Y.; KHAN, I. A.; GU, Q.; LI, D. Sorbiterrin A, a novel sorbicillin derivative with cholinesterase inhibition activity from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. **Tetrahedron letters**, v. 53, n. 3, p. 325-328, 2012.

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO Y.; MAPARI, S. A. S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

GUTIERREZ, M.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; LOLAS, M.; SCHMEDA-HIRSHMAN, G. Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main Apple Canker Agent in Chile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7701-7708, 2005.

JO, D. S.; PARK, N. Y.; CHO, D. H. Peroxisome quality control and dysregulated lipid metabolism in neurodegenerative diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1486-1495, 2020.

HAJJAJ, H.; KLAÉBÉ, A.; LORET, M. O.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; FRANÇOIS, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 311-314, 1999.

KHALIL, D.; EL-ZAYAT, S. A.; EL-SAYED, M. A. Phytochemical screening and antioxidant potential of endophytic fungi isolated from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 7, n. 2, p. 116-124, 2020.

KUNO, F.; OTOGURO, K.; SHIOMI, K.; IWAI, Y.; OMURA, S. Arisugacins A and B, novel and selective acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium* sp. FO-4259 I. screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 8, p. 742-747, 1996.

LAN, W. J.; ZHAO, Y.; XIE, Z. L.; LIANG, L. Z.; SHAO, W. Y.; ZHU, L. P.; YANG, D. P.; ZHU, X. F.; LI, H. J. Novel sorbicillin analogues from the marine fungus *Trichoderma* sp. associated with the seastar *Acanthaster planci*. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 10, 2012.

LI, S.; TAN, H.; WANG, N.; ZHANG, Z.; LAO, L.; WONG, C.; FENG, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 26087-26124, 2015.

LIMA, M. T. N. S.; DOS SANTOS, L. B.; BASTOS, R. W.; NICOLI, J. R.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 169-176, 2018.

LU, S.; TIAN, J.; SUN, W.; MENG, J.; WANG, X.; FU, X.; WANG, A.; LAI, D.; LIU, Y.; ZHOU, L. Bis-naphtho- γ -pyrones from fungi and their bioactivities. **Molecules**, v. 19, p. 7169-7188, 2014. DOI:10.3390/molecules19067169.

LUCAS, E. M.; CASTRO, M. C.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 785-789, 2007.

MENDIOLA-PRECOMA, J.; BERUMEN, L. C.; PADILLA, K.; GARCIA-ALCOCER, G. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/2589276.

MENG, J.; WANG, X.; XU, D.; FU, X.; ZHANG, X.; LAI, D.; ZHOU, L.; ZHANG, G. Sorbicillinoids from fungi and their bioactivities. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 715, 2016.

MISHRA, A.; MALIK, A. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 217-226, 2014.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

OTERO, C.; ARREDONDO, C.; ECHEVERRÍA-VEGA, A.; GORDILLO-FUENZALIDA, F. *Penicillium* spp. mycotoxins found in food and feed and their health effects. **World Mycotoxin Journal**, v. 13, n. 3, p. 323-343, 2020.

PARRA-RIVERO, O.; BARROS, M. P.; PRADO, M. D. M., GIL, J. V.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; ZACARÍAS, L.; AVALOS, J. Neurosporaxanthin overproduction by *Fusarium fujikuroi* and evaluation of its antioxidant properties. **Antioxidants**, v. 9 n. 6, p. 528, 2020.

PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 104-112, 2016.

POHANKA, M.; HRABINOVA, M., KUCA, K.; SIMONATO, J. P. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2631-2640, 2011.

SALO, O.; GUZMÁN-CHÁVEZ, F.; RIES, M. I.; LANKHORST, P. P.; BOVENBERG, R. A.; VREEKEN, R. J.; DRIESSEN, A. J. Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3971-3978, 2016.

SARAVANAKUMAR, K.; VIVEK, R.; BOOPATHY, N. S.; YAQIAN, L.; KATHIRESAN, K.; CHEN, J. Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, p. 199-212, 2015.

SCHRAG, M.; MUELLER, C.; ZABEL, M.; CROFTON, A.; KIRSCH, W. M.; GHRIBI, O.; PERRY, G. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. **Neurobiology of Disease**, v. 59, p. 100-110, 2013.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 185, p. 389-397, 2015.

SURESHA, B. S.; SRINIVASAN, K. Antioxidant properties of fungal metabolite nigerloxin *in vitro*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, p. 587-591, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; BARBOSA, B. V.; MARTINS, B. D. A.; GUIRLANDA, C. P.; MOURA, M. A. F. Use of the versatility of fungal metabolism to meet modern demands for healthy aging, functional foods, and sustainability. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 223, 2020.

TAVARES, D. G.; BARBOSA, B. V. L.; FERREIRA, R. L.; DUARTE, W. F.; CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 148-154, 2018.

UMAMAHESWARI, M.; CHATTERJEE, T. K. *In vitro* antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, p. 61-73, 2008.

ZHANG, H. Y.; ZHENG, C. Y.; WANG, Z. F.; TANG, L. L.; GAO, X.; TANG, X. C. Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 396-402, 2008.

ZHAO, J.; WANG, W.; ZHAO, C.; LUO, M.; UM, F.; FU, Y.; ZU, Y.; YAO, M. *Hypocrea lixii*, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 102-113, 2013.

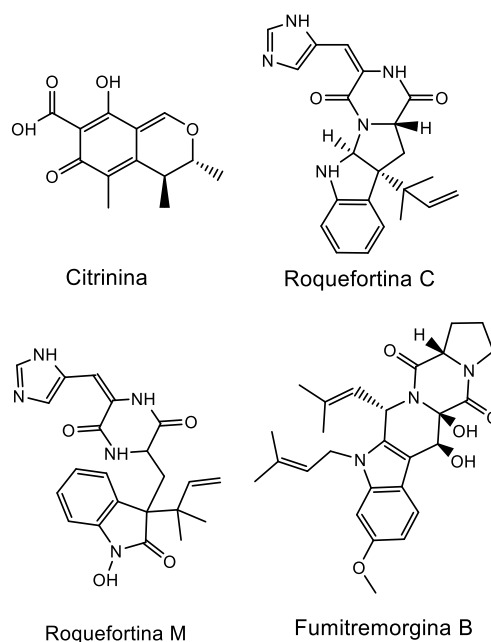
WANG, H.; LIU, J., COOKS; R. G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie**, v. 122, n. 5, p. 889-892, 2010.

5 CAPÍTULO II: Variação metabólica do *Penicillium tanzanicum* induzida por moduladores epigenéticos

5.1 Introdução

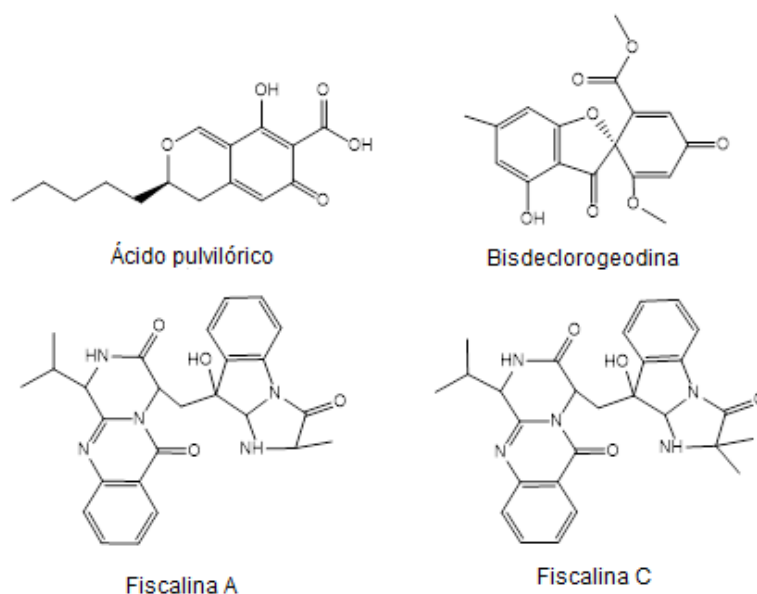
O gênero *Penicillium* compreende um grupo diverso de espécies, que possui importância industrial (COTON et al., 2020). A identificação de espécies deste gênero é realizada pela análise de sequências de DNA, mas referências e bancos de dados robustos ainda são insuficientes para sua análise filogenética (VISAGIE et al., 2014). Muitas alterações na lista de espécies do gênero *Penicillium* foram feitas ao longo do tempo, na medida em que novas regras e ferramentas de classificação se tornaram disponíveis. Atualmente, aspectos morfológicos, filogenética multigênica e perfilamento de metabólitos extracelulares (extrólitos) são utilizados para definir espécies do gênero *Penicillium* (VISAGIE et al., 2014). O fungo *P. tanzanicum* foi descrito pela primeira vez por Visagie et al. (2016), sendo caracterizado por morfologia clássica, análise de metabólitos extracelulares por LC-MS e filogenia multigênica baseada no ITS. Em relação à presença de extrólitos, esta espécie mostrou-se não produtora de micotoxinas como citrinina, roquefortinas C e M e fumitremorgina B (Figura 1), o que é de extrema relevância quando se busca aplicações alimentícias.

Figura 1 - Estruturas químicas da citrinina, fumitremorgina B e roquefortinas C e M.



P. tanzanicum é uma espécie que possui conidióforos ásperos. A parte inferior da colônia de *P. tanzanicum* apresenta coloração vermelha brilhante em ágar extrato de malte (MEA) e não se desenvolve no meio de cultura ágar extrato de levedura Czapeck (CYA) a 37 °C, o que é interessante para distingui-lo de algumas outras espécies semelhantes morfológicamente. Esta espécie é pouco estudada em termos da expressão de metabólitos secundários, mas ácido pulvilórico, bisdeclorogedina e fiscalinas A e C (Figura 2) foram detectados como seus extrólitos (VISAGIE et al., 2016).

Figura 2 - Estruturas químicas do ácido pulvilórico, bisdeclorogedina e fiscalinas A e C.

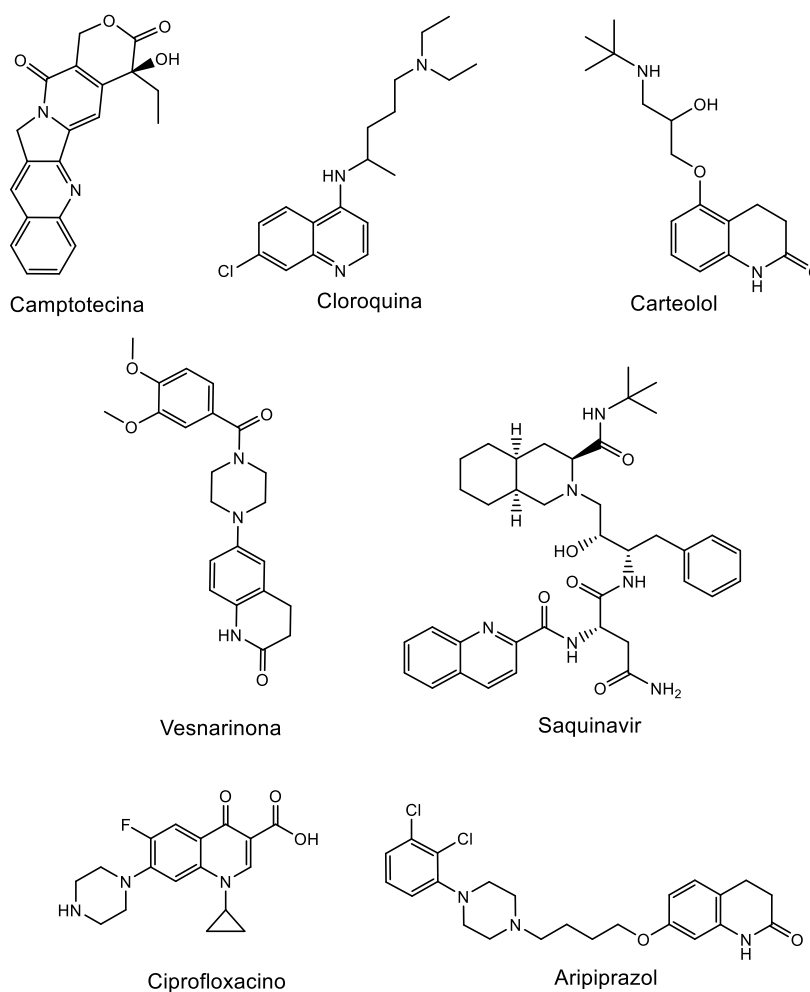


O ácido pulvilórico possui em sua estrutura uma unidade quinona metídeo. Azafilonas estruturalmente relacionadas ao ácido pulvilórico são relatadas na literatura, inclusive como resultado de estresse biótico causado pelo co-cultivo de *Nigrospora oryzae* e *Beauveria bassiana*. Azafilonas são produtos naturais de grande interesse, devido às suas atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica (GAO et al., 2013), bem como sua utilização como pigmento alimentício (MAPARI et al., 2010), sendo isoladas principalmente de espécies dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* (CHEN et al., 2020). Bisdeclorogedina já foi isolada como metabólito de *Aspergillus terreus*, sendo produzida em condições especiais, como na presença de óleo de canola. A redução de oxigênio no meio de

cultura, bem como o aumento da disponibilidade de nitrogênio não se mostraram eficazes para a produção desta antraquinona (BORUTA e BIZUKOJC, 2016).

Fiscalinas são um grupo de alcaloides heterocíclicos pirazinoquinazolinônicos que possuem uma unidade indólica ligada a um sistema tricíclico derivado do ácido antranílico (RESENDE et al., 2019). As fiscalinas A e C são uma classe de produtos naturais de grande importância, devido ao grande leque de atividades biológicas que seus representantes apresentam, tais como antitumoral (camptotecina), antimalárica (cloroquina), antiglaucoma (carteolol), cardioprotetora (vesnarinona), antiviral (saquinavir), antibacteriana (ciprofloxacino) e antipsicótica (aripiprazol) (Figura 3) (SHANG et al., 2018).

Figura 3 - Estruturas químicas dos alcaloides quinazolinônicos camptotecina, cloroquina, carteolol, vesnarinona, saquinavir, ciprofloxacino e aripiprazol.



As fiscalinas A e C foram isoladas pela primeira vez do fungo *Neosartorya fischeri* e desde então, tem sido descritas como metabólitos secundários de diversas

outras espécies fúngicas, sendo bastante estudadas em relação à sua atividade biológica (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades biológicas das fiscalinas A e C produzidas sob diferentes condições de cultivo.

Metabólito (espécie)	Composição do meio de cultura e condições de cultivo	Atividade biológica
Fiscalina C (<i>Neosartorya siamensis</i>) ^a	Arroz (quantidade não especificada) [28 °C, 30 dias, sem agitação ^b]	Atividade antimicrobiana sinérgica contra MRSA* combinada com oxacilina (MIC** = 16 µg/mL), podendo ser explorada como adjuvante em combinações terapêuticas ^b
Fiscalina A (<i>Neosartorya siamensis</i>) ^c	Arroz (quantidade não especificada) ^b [28 °C, 30 dias, sem agitação]	Atividade citotóxica contra células de câncer de pulmão (35% de diminuição da viabilidade celular a 100 µM) e atividade sinérgica (58% combinada com 0,54 µM de doxorubicina)
Fiscalina A (<i>Neosartorya siamensis</i>) ^d	Arroz (2 g/mL) [28 °C, 30 dias, sem agitação]	Atividade citotóxica contra células de câncer hepático (77% de inibição de proliferação celular a 50 µM)
Fiscalinas A e C (<i>Neosartorya fischeri</i>) ^e	Glicerol (2%), dextrina (2%), enzima digestiva de soja (1%), extrato de levedura, (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,2%) e CaCO ₃ (0,2%) [26 °C, 6 dias, 220 rpm]	Inibição da ligação da substância P à neuroquinina-1 (57 e 68 µM, respectivamente), sendo potenciais agentes anti-inflamatórios e analgésicos.
Fiscalina C (<i>Xylaria</i> cf. <i>cubensis</i>) ^f	Extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (5 g/L) e dextrose (10 g/L) [25 °C, 30 dias, sem agitação]	Atividade citotóxica contra células de câncer de mama (21 µg/mL)

*MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; **MIC: concentração inibitória mínima;
^aBUTTACHON et al., 2012; ^b BESSA et al., 2016; ^c RAMOS et al., 2019; ^dPRATA-SENA et al., 2016;
^eWONG et al., 1993; ^fSAWADSITANG et al., 2015.

Fiscalina A, um dos metabólitos presentes no extrato de *Neosartorya siamensis* KUFA 0017, foi avaliada em um ensaio de citotoxicidade em células

pulmonares, mostrando-se capaz de potencializar o efeito citotóxico da doxorubicina. Esta é um antibiótico da classe das antraciclinas com atividade antineoplásica, sendo empregado na terapia de diversas formas de linfoma, sarcoma e tumores sólidos (RAMOS et al., 2020).

A utilização de fungos para a produção de substâncias bioativas destinadas a aplicações industriais requer a superação de diversos obstáculos, como baixa toxicidade, se possível, uso de fungo Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) e o desenvolvimento de metodologias capazes de tornar a produção economicamente viável. Estas metodologias requerem estudos aprofundados de todas as etapas do processo, desde a seleção do fungo, a forma de cultivo, passando pelas formas de extração, purificação dos metabólitos bioativos (se for o caso), caracterização dos metabólitos presentes no extrato ou isolados a partir deles, *scale-up* e desenho do processo industrial (LOTIFY et al., 2021).

Após seleção da espécie alvo, a forma de cultivo é crucial para o desenvolvimento das etapas posteriores já que, nesta etapa, o metabolismo fúngico pode ser manipulado para trazer diversos benefícios ao processo, tais como:

- Aumento quantitativo da produção da substância bioativa, melhorando o rendimento do processo;
- Diversificação metabólica, com biossíntese de substâncias mais ativas do que a substância alvo ou substâncias com ação sinérgica;
- Redução qualitativa e quantitativa da produção de metabólitos inativos, pois isso direciona o metabolismo para a produção da substância bioativa e facilita a etapa de isolamento da mesma;
- Redução qualitativa e quantitativa da produção de metabólitos citotóxicos, aumentando a possibilidade de aprovação pelos órgãos reguladores do uso da substância bioativa em alimentos;
- Redução do custo da produção da substância bioativa.

Algumas destas alterações também podem ser endereçadas durante o *scale up*, por meio de estratégias modernas, capazes de identificar, modificar e integrar rotas biossintéticas em fungos, facilitando a produção otimizada de metabólitos por engenharia genética (DENG et al., 2020). No entanto, a solução de problemas como os anteriormente mencionados favorece a continuidade dos estudos para se chegar ao desenvolvimento de produtos, enquanto fatores como baixos

rendimentos iniciais podem reduzir investimentos no processo. Desta forma, a etapa inicial de pesquisa é de grande valor para subsidiar a produção de fármacos, alimentos funcionais, nutracêuticos, aditivos e outras substâncias a partir de fungos (YU et al., 2021).

Alterações na forma de cultivo podem ser muito abrangentes, já que pequenas variações nos parâmetros de cultivo, como os ingredientes presentes no meio de cultura, relação carbono/nitrogênio, adição de sais, pressão osmótica, e nos parâmetros físicos (temperatura, pH, condição de oxigênio) geralmente são refletidas no metabolismo fúngico (ARRUDA et al., 2021). A alteração da resposta metabólica em função da condição de cultivo de uma mesma espécie é conhecida na literatura como abordagem OSMAC (*one strain, many compounds*), sendo amplamente utilizada. Gao et al. (2020) isolaram onze novas lactamas utilizando esta abordagem com o fungo *Aplosporella javeedii*, após adição de nitrato de sódio e glutamato monossódico ao meio de cultura controle, onde estes metabólitos não foram detectados. Xie et al. (2021) por sua vez, relataram que a substituição de arroz por aveia no meio de cultura promoveu a produção de nove merotepenoides pela espécie *Penicillium allii-sativi*. Diversificação metabólica decorrente do uso de OSMAC também tem sido amplamente descrita (LOFTY et al., 2021; VIEIRA et al., 2021).

Nas últimas décadas, a adição de inibidores e ativadores epigenéticos e de precursores biossintéticos tem sido uma vertente da abordagem OSMAC muito utilizada para ativar *clusters* genéticos biossintéticos silenciosos. Moduladores epigenéticos são substâncias químicas capazes de induzir ou modificar a biossíntese de metabólitos fúngicos (PAN et al., 2019). A indução metabólica é importante porque os fungos, uma vez retirados de seu ambiente natural, provido de estímulos bióticos e abióticos, em geral reduzem a expressão *in vitro* de diversos metabólitos (PFANNENSTIEL e KELLER, 2019).

Alterações no perfil metabólico pela ação de moduladores epigenéticos podem ser visualizadas utilizando técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), dentre outras, de forma eficiente e rápida sem necessidade de isolar as substâncias, uma etapa que demanda grande gasto de tempo e de reagentes (MACHADO et al., 2019; EMWAS et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi avaliar a expressão metabólica da espécie *P. tanzanicum* por CLAE-UV-Vis, UPLC-MS e RMN de H^1 , visando identificar a resposta deste organismo à presença dos moduladores epigenéticos 5-azacitidina, butirato de sódio, hidralazina, procainamida e ácido suberoil hidroxâmico em comparação com o metabolismo basal. Neste estudo, a expressão “metabolismo basal” refere-se ao metabolismo normal do fungo *in vitro*, antes da adição de estímulos abióticos.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Materiais

Os materiais utilizados para obtenção dos extratos brutos, ensaios de capacidade antioxidante total e atividade inibitória de acetilcolinesterase e os dados referentes ao isolamento e identificação do *P. tanzanicum* estão descritos no item 4.2 (pág. 45) do capítulo I. Os materiais referentes às outras análises e ensaios deste capítulo estão descritos a seguir.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Inoculação do *P. tanzanicum* nos meios de cultura

P. tanzanicum foi inoculado em ágar batata dextrosado (PDA) (Kasvi, Espanha). Após sete dias, foi transferido para água destilada estéril (método de preservação de Castellani) e armazenado sob refrigeração. Foram realizados experimentos com esta espécie em caldo batata dextrose (PDB) (Experimento PT1), e em meio líquido padronizado contendo peptona, sais e sacarose (MLP) (Experimentos PT2 e PT3).

PDB foi o meio de cultura utilizado para se avaliar a variação da produção de ácidos graxos pelo *P. tanzanicum* na presença do modulador epigenético 5-azacitidina devido ao seu baixo custo, praticidade de preparo e por se mostrar adequado para a obtenção de ácidos graxos de interesse na área alimentícia a partir

de fungos filamentosos em estudo da literatura científica (POOLCHANUAN et al., 2020).

Para o preparo do meio de cultura, PDB (Kasvi, Espanha) foi adicionado em água destilada na concentração de 13,5 g/L. O conteúdo foi homogeneizado, vertido em frascos do tipo erlenmeyers (20 mL/frasco) e esterilizados em autoclave. O preparo do MLP foi descrito no item 4.2.1 (pág. 45) do capítulo I. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix) a 120 °C por 20 min e após o resfriamento, adicionaram-se 3 mL de suspensão de esporos do *P. tanzanicum* em cada erlenmeyer. Foram preparadas soluções estoque concentrada contendo separadamente cada um dos moduladores epigenéticos utilizados (5-azacitidina, butirato de sódio, hidralazina e ácido suberoil hidroxâmico - Sigma) em água destilada estéril. Em seguida, volumes adequados da solução estoque dos moduladores foram adicionados em cada erlenmeyer, para se atingir as concentrações finais mostradas na Tabela 2. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura dos experimentos PT1, PT2 e PT3.

Experimento	Meio de cultura	Modulador (concentração)
PT1	PDB	AZA (50, 200, 350 e 500 µM)
PT2	MLP	AZA, BUT, HID, PRO e SAHA (500 µM)
PT3	MLP	AZA, HID, PRO, AZA+HID, AZA+PRO e HID+PRO (500 µM cada)

PDB: caldo batata dextrose. MLP: meio líquido padronizado contendo peptona, sais e sacarose. AZA: 5-azacitidina; BUT: butirato de sódio, HID: hidralazina, PRO: cloridrato de procainamida, SAHA: ácido suberoil hidroxâmico.

Para ambos os meios de cultura, foram preparados os controles fúngicos, nos quais o *P. tanzanicum* se desenvolveu sem adição de moduladores epigenéticos e o controle das condições de cultivo, contendo somente meio de cultura e os moduladores epigenéticos.

5.2.2.2 Preparo dos extratos brutos

Experimento PT1

Após 28 dias de cultivo, foram adicionados 20 mL de acetato de etila a cada frasco do experimento, que foram deixados sob agitação por 12 h. Posteriormente, as biomassas foram retiradas por filtração em papel e os caldos fermentados foram extraídos com 30% de acetato de etila (três vezes; 30% de solvente extrator v/v). As frações orgânicas foram combinadas, o solvente foi rotaevaporado a 70 °C e os extratos foram transferidos para frascos pesados. Após completa evaporação do solvente, os extratos secos foram pesados e armazenados sob refrigeração até serem analisados.

Experimento PT2

Após 28 dias de cultivo, foram adicionados 50 mL de acetato de etila a cada frasco do experimento. Posteriormente, as biomassas foram retiradas por filtração em papel e os caldos fermentados foram extraídos com 30% de acetato de etila (três vezes; 30% de solvente extrator v/v). As frações orgânicas foram combinadas, o solvente foi rotaevaporado a 70 °C e os extratos foram transferidos para frascos pesados. Após completa evaporação do solvente, os extratos secos foram pesados e armazenados sob refrigeração até serem analisados.

Experimento PT3

O procedimento foi o mesmo descrito para o experimento PT2, sem a etapa de adição de acetato de etila anteriormente à filtração das biomassas a fim de se extrair os metabólitos extracelulares presentes no caldo.

5.2.2.3 Análise da variação da produção de ácidos graxos produzidos por *P. tanzanicum* (PT1) na presença de 5-azacitidina

O preparo de amostra realizado anteriormente à análise do perfil por cromatografia gasosa (CG) consistiu na hidrólise de lipídeos seguida de metilação dos ácidos graxos. Para a hidrólise de lipídeos, dissolveram-se, em tubo criogênico de capacidade de 2 mL, 10 mg do extrato em 100 µL de solução de hidróxido de sódio (1 mol/L) em etanol/água (95:5). Após agitação em vórtex por 10 s, a mistura foi

hidrolisada em um forno de micro-ondas doméstico (Eletrolux MT030), à potência de 30%, durante 4 min. Após resfriamento, adicionaram-se 400 μL de ácido clorídrico (20% p/v), uma ponta de espátula de NaCl e 600 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubo de microcentrífuga e secada por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres (SANDE et al., 2018). Em seguida, foram adicionados 100 μL de fluoreto de boro em metanol (14%) aos ácidos graxos livres e o conteúdo foi aquecido durante 10 min em banho de água a 60 °C. A mistura foi diluída em 500 μL de hexano e as análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas, utilizando-se a coluna Supelcowax-10 30 m x 0,2 mm x 0,2 μm (Supelco). O gradiente de temperatura utilizado foi de 150 °C até 240 °C (10 °C/min), utilizou-se hidrogênio como gás de arraste (6 mL/min) e o volume de injeção foi de 1 μL . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME C14-C22 (Supelco cat no 18917).

5.2.2.4 Análise por *Paper Spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS) (PT2)

O caldo fermentado e extrato bruto do controle *P. tanzanicum* do experimento PT2 foram analisados por PS-MS. Os dados desta análise estão descritos no item 4.2.2.7 (pág. 50) do capítulo I.

5.2.2.5 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2 e PT3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)

Os extratos brutos dos experimentos PT2 e PT3 foram solubilizados em metanol grau HPLC (Merck, Alemanha) de maneira a se obter soluções finais de concentração de 1,0 mg/mL. Cada solução foi filtrada com filtros de tamanho de poro de 0,45 μm e injetada em cromatógrafo Shimadzu® equipado com desgaseificador DGU-A5R, bomba modelo LC-AT, auto amostrador modelo SIL-20AHT e detector UV-Vis modelo SPD-M20A. A coluna utilizada foi Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) e a leitura foi realizada a um comprimento de onda de 410 nm. A fase móvel foi constituída de solução de ácido fórmico aquoso a 0,1% (v/v) (AF) e metanol (MeOH).

O gradiente utilizado foi de 67-90% MeOH e 33-10% AF (0-15 min); 90-96% MeOH e 10-4% AF (15-35 min); 96-100% MeOH e 4-0% AF (35-37 min); MeOH 100% and AF 0% (37-50 min). A velocidade de fluxo utilizada foi de 0,45 mL/min.

5.2.2.6 Avaliação da capacidade antioxidante total dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

O ensaio de capacidade antioxidante total foi realizado conforme descrito no item 4.2.2.1 (pág. 46) do capítulo I, com a diferença que o ensaio foi realizado com os extratos solubilizados em metanol (1,0 mg/mL). A capacidade antioxidante total foi expressa em mg de equivalente de ácido ascórbico (EAA) por g de extrato.

5.2.2.7 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

O teor de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu (GAO et al., 2000). Um volume de 0,5 mL de amostra dissolvida em metanol (500 µg/mL) foi adicionado a 2,5 mL de reagente Folin Ciocalteu e agitou-se a mistura. Após repouso à temperatura ambiente, adicionou-se 0,3 mL de carbonato de sódio saturado (20% p/v). Incubaram-se os tubos com os conteúdos a 25 °C por 20 min em ambiente escuro e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Uma solução estoque de ácido gálico (500 µg/mL) em metanol foi utilizada para se preparar diluições sucessivas para a obtenção da curva analítica desse padrão. O ensaio foi realizado em triplicata. O resultado das amostras foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

5.2.2.8 Avaliação do poder redutor férrico dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

Avaliou-se a capacidade antioxidante de redução de íons ferro III de acordo com OYAIKU et al. (1986). Pipetaram-se 1,0 mL de amostra dissolvida em metanol (500 µg/mL), 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 mmol/L, pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio 1% (m/v). Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 50 °C por 20 min. Posteriormente, 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) foram adicionados e a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Uma alíquota do

sobrenadante (2,5 mL) foi coletada e misturada a 2,5 mL de água e 0,5 mL de cloreto férrico (0,1%, p/v). A leitura de absorvância foi realizada a 700 nm e os resultados foram expressos em % de poder redutor férrico, considerando os valores obtidos pelo ácido ascórbico (padrão positivo) como 100%.

5.2.2.9 Avaliação do teor de flavonoides totais dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

O conteúdo de flavonoides totais das amostras foi avaliado de acordo com o método utilizado por AZIEANA et al., (2017). O ensaio foi realizado pela adição de 2,5 mL de amostra dissolvida em metanol (500 µg/mL) a 0,3 mL de solução de nitrito de sódio (5% p/v), seguido de agitação em vórtex por 5 min. Em seguida, adicionou-se 0,3 mL de tricloreto de alumínio (10% p/v), agitou-se brevemente em vórtex e a mistura foi mantida em repouso por 6 min. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de NaOH (1 mol/L) e deixou-se em repouso por adicionais 10 min. Por fim, adicionaram-se 4,9 mL de água destilada e foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 510 nm, em triplicata. Uma solução estoque de quercetina, utilizada como padrão, foi preparada em água (1000 µg/mL), a partir da qual diluições sucessivas foram feitas para se construir a curva analítica do padrão. O resultado foi expresso em mg de equivalente de quercetina (EQ) por grama de amostra.

5.2.3.0 Ensaio de captura de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

Para determinar a capacidade de captura de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das amostras foi utilizado o método descrito por BURSAL e GÜLÇİN (2011). Foram preparadas soluções de amostras e de padrão (ácido ascórbico) com diferentes concentrações (0 a 500 µg/mL). Após a adição de 25 µL das amostras ou dos padrões em diferentes concentrações, pipetaram-se 175 µL da solução de DPPH (0,1 mmol/L) para cada um dos poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, agitou-se a mistura suavemente e a mesma foi deixada em repouso no escuro por 30 min. Após esse período, procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 492 nm. O ensaio foi feito em triplicata para cada ponto da curva das amostras e do

padrão usando metanol, solvente utilizado para o preparo das soluções como o branco do ensaio. O resultado final foi expresso como concentração de amostra capaz de estabilizar 50% dos radicais DPPH (EC₅₀).

5.2.3.1 Ensaio de atividade inibitória de acetilcolinesterase dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

O ensaio de atividade inibitória de acetilcolinesterase foi realizado conforme descrito no item 4.2.2.2 (pág. 46) do capítulo I, com a diferença que o ensaio foi realizado com os extratos solubilizados em DMSO (1,0 mg/mL) contendo 2,5% de Tween 20.

5.2.3.2 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT3) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UPLC-QqTOF-MS/MS)

Os extratos brutos do experimento PT3 foram analisados pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao sistema de massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UPLC-QqTOF-MS/MS). Os espectros de massas (MS/MS) foram adquiridos no modo DDA com a utilização de um cromatógrafo líquido modular de ultra-eficiência composto por uma bomba quaternária Acquity® HClass, um amostrador automático Acquity® FTN, e um detector de arranjo de fotodiodos Acquity® PDA eλ (Waters, Estados Unidos). Os extratos foram solubilizados em metanol grau HPLC (Merck LiChrosolv®, Alemanha) obtendo-se soluções com concentração 1,0 mg/mL. Essas soluções foram diluídas em metanol no interior de microtubos de 1,5 mL de maneira a obter concentrações finais de 100,0 µg/mL. As separações cromatográficas em fase reversa foram realizadas em uma coluna Acquity® HSS T3 C18 (100 mm x 2.1 mm), com partículas de 1,8 µm de diâmetro médio e 100 Å de diâmetro médio de poro. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi de 2 µL. As separações foram desenvolvidas em modo gradiente utilizando-se uma solução aquosa de ácido fórmico (Fluka, St. Louis, Estados Unidos) a uma concentração de (0,1% v/v) em água ultrapura (MilliQ Direct 8®, Merck-Millipore, França) (fase A) e acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido

fórmico (Merck LiChrosolv®, Alemanha) (fase B). A vazão da fase móvel foi ajustada a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e um gradiente de 5 a 100% de fase B em 15 min foi empregado na separação. Após o desenvolvimento do gradiente, a concentração de B foi mantida a 100% durante 5 min e posteriormente, a porcentagem de B foi restabelecida a 5% em um intervalo de tempo de 1,0 min, a qual foi mantida por 5,0 min para restabelecimento das condições das próximas corridas cromatográficas. O tratamento dos dados foi realizado através do software MassLynx, versão 4.1.

5.2.3.3 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT3) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, 5,0 mg dos extratos brutos foram solubilizados em 300 μL de clorofórmio deuterado (Merck) e transferidos para tubos de 3 mm de diâmetro. As análises foram feitas conforme descrito no item 4.2.2.6 (pág. 50) do capítulo I.

5.2.3.4 Análise estatística

Os resultados estatísticos dos diferentes ensaios do potencial antioxidante e da inibição de acetilcolinesterase dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2) foram obtidos por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre as médias de cada ensaio realizado. O programa utilizado foi o GraphPad Prism, Versão 5.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Variação do perfil de ácidos graxos produzidos por *P. tanzanicum* (PT1) na presença de 5-azacitidina

Os resultados das análises de ácidos graxos por cromatografia gasosa dos extratos obtidos a partir do cultivo do fungo *P. tanzanicum* em caldo batata dextrosado (PDB) sem modulação epigenética (CPT1) e na presença de 5-azacitidina nas concentrações de 50 (PT1_50), 200 (PT1_200), 350 (PT1_350) e 500 μM (PT1_500) estão apresentados Tabela 3.

O extrato do fungo *P. tanzanicum* (CPT1) apresentou, quando cultivado sem influência de moduladores, majoritariamente a presença dos ácidos graxos saturados palmítico (33,0%) e esteárico (20,5%) e, em menor quantidade, dos ácidos láurico (4,9%), mirístico (4,9%), lignocérico (4,8%) e behênico (1,3%). O ácido linoleico foi o ácido graxo insaturado encontrado em maior porcentagem (8%), seguido pelos ácidos graxos monoinsaturados oleico (4%), nervônico (2,5%), miristoleico (1%) e erúcico (1%), além do poli-insaturado linolênico (0,5%).

Os ácidos graxos palmítico e esteárico também foram os componentes predominantes detectados nos extratos obtidos na presença dos moduladores, variando entre 26,3 a 35,0% e 14,8 a 20,5%, respectivamente. Em comparação ao controle (CPT1), o extrato do fungo cultivado na presença de 200 μM de 5-azacitidina (PT1_200) apresentou aumento significativo da produção do ácido graxo insaturado ácido linoleico (14,8%), sendo que a produção desse ácido graxo insaturado variou entre 5,0 e 8,3% (CPT1 8%) nos demais. Tal resultado evidencia um provável efeito epigenético de aumento da biossíntese desse ácido graxo pela 5-azacitidina na concentração de 200 μM , o que pode ser explorado em escalada aumentada para utilização biotecnológica. Poolchanuan et al. (2020) também relataram aumento da biossíntese de ácido linoleico de 2,8% para 27,2% e de 12,5% para 23,6% para os fungos *Aspergillus aculeatus* e *Penicillium shearii* quando cultivados em caldo batata na presença do ácido valproico (100 μM), corroborando o efeito do aumento da biossíntese de ácido linoleico em fungos filamentosos sob influência de moduladores epigenéticos.

Tabela 3 - Teor percentual de ácidos graxos em extratos brutos de *P. tanzanicum* cultivado em caldo batata dextrosado (PDB) na ausência (CPT1) e presença de 5-azacitidina nas concentrações de 50 (PT1_50), 200 (PT1_200), 350 (PT1_350) e 500 μ M (PT1_500).

Ácidos graxos	Extrato				
	CPT1	PT1_50	PT1_200	PT1_350	PT1_500
Láurico (C12:0)	4,9	5,7	5,3	4,9	4,1
Mirístico (C14:0)	4,9	4,9	4,2	4,2	3,7
Miristoleico (C14:1)	1,0	0,5	1,3	0,8	0,9
Palmítico (C16:0)	33,0	28,2	26,3	28,3	35,0
Palmitoleico (C16:1)	0,0	0,0	0,0	1,4	3,2
Estearico (C18:0)	20,5	18,3	18,8	17,3	14,8
Oleico (C18:1)	3,9	3,8	4,1	3,5	4,6
Linoleico (C18:2)	8,0	5,5	14,8	8,3	5,0
Linolênico (C18:3)	0,5	0,4	0,7	0,4	1,0
Behênico (C22:0)	1,3	1,0	0,8	1,1	0,8
Erúcico (C22:1)	1,0	1,7	1,7	0,9	0,9
Lignocérico (C24:0)	4,8	0,0	5,0	3,9	3,9
Nervônico (C24:1)	2,5	1,6	2,1	1,7	2,1
Outros	13,6	28,3	14,9	23,1	20,0

Em relação aos extratos dos fungos modulados com 350 μ M (PT1_350) e 500 μ M (PT1_500) de 5-azacitidina, estes apresentaram 1,4 e 2,4%, respectivamente, do ácido graxo monoinsaturado ácido palmitoleico, ao passo que os demais não apresentaram esse ácido. No estudo de Poolchanuan et al. (2020), o fungo *Trichoderma reesei* aumentou a produção de ácido palmitoleico de 0,37% para 0,46%, quando cultivado em caldo batata na presença do modulador epigenético ácido valproico (100 μ M). Este ácido graxo possui potencial para ser utilizado na indústria de nutracêuticos, tendo em vista que, dados pré-clínicos apontam uma correlação entre sua ingestão e a prevenção de desordens metabólicas crônicas, além de proteção contra esteatose hepática e melhora do metabolismo de glicose (SOUZA et al., 2018). O ácido palmitoleico também foi associado à redução de expressão de mediadores pró-inflamatórios em estudos *in vivo* (YANG et al., 2011), sua suplementação em animais mostrou-se benéfica para o metabolismo do fígado (SOUZA et al., 2020), além de mostrar-se relevante na prevenção de hipertensão

(TANG et al., 2021). Desta forma, há indicativos da importância do ácido palmitoleico na alimentação e a detecção de organismos produtores deste ácido graxo e das condições em que sua produção é aumentada podem ser relevantes para futuras aplicações biotecnológicas.

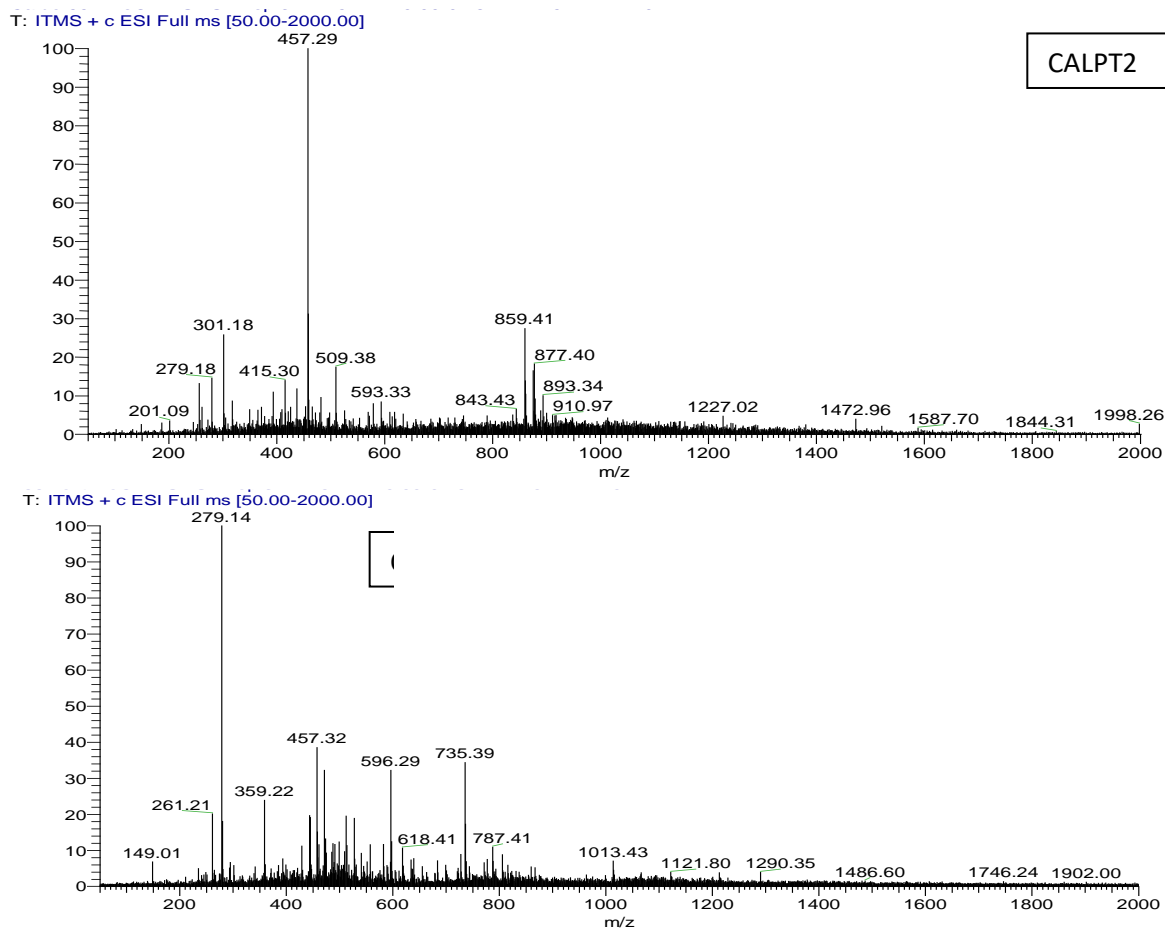
Dentre os extratos analisados, o PT1_50 foi o único que não apresentou ácido lignocérico em quantidades detectáveis, o qual foi detectado em baixas porcentagens (4 a 5%) nos demais extratos. A ausência desse ácido graxo pode ser desejável em suplementos alimentares com alegação de benefícios à saúde, especialmente para idosos, devido à sua ingestão estar associada ao aumento de risco para doença de Alzheimer (ZARROUK et al., 2012). Um estudo recente descreve que ácidos graxos de cadeia muito longa, como C24:0 e C26:0, estão associados à presença de emaranhados neurofibrilares e foram encontrados em maior concentração em regiões corticais do cérebro de pacientes com Alzheimer (JO et al., 2020).

5.3.2 Análise por *Paper spray* acoplado à espectrometria de massas (PS-MS) (PT2)

P. tanzanicum foi cultivado em MLP e seu caldo fermentando bruto (CALPT2), bem como o extrato bruto obtido a partir da partição líquido-líquido com acetato de etila (CPT2) foram analisados por PS-MS para avaliação do perfil de metabólitos basais presentes em ambos. Os respectivos espectros de massas na região entre m/z 0 e 650 podem ser visualizados na Figura 4.

A análise dos principais sinais observados nos espectros mostrou que os analitos com m/z 279 e 457 estão presentes tanto no caldo fermentado, quanto no extrato bruto do *P. tanzanicum* cultivado na ausência de moduladores epigenéticos. Considerando-se os metabólitos já isolados da espécie (Figura 2, pág. 63), os espectros sugerem a presença de ácido pulvilórico e fiscalina C, com abundâncias relativas variadas. O pico de m/z 457,29 atribuído à fiscalina C apresentou alta abundância relativa no caldo (CALPT2) e baixa abundância relativa no extrato (pico de m/z 457,32 no CPT2). A atribuição poderia ser justificada pelo íon $[M+H-31]^+$ proveniente da perda de um grupo metila e um átomo de oxigênio da molécula da fiscalina C.

Figura 4 - Perfil químico por *Paper Spray* acoplado a espectrometria de massas (PS-MS) no modo positivo, do caldo fermentado contendo os metabólitos de *P. tanzanicum* (CALPT2) e do extrato bruto obtido por extração líquido-líquido com acetato de etila (CPT2) do controle fúngico do experimento PT2.



O outro metabólito sugerido foi o ácido pulvilórico, baseando-se primeiramente na presença do pico em m/z 279,18 visualizado no espectro de massas do caldo (CALPT2) e do extrato (279,14 no CPT2). Este pico foi atribuído ao ácido pulvilórico protonado $[M+1]^+$ (calc. 279,1232). Corroborando esta atribuição, propôs-se que o pico m/z 301,18 (CALPT2) corresponda ao aduto de sódio do ácido pulvilórico $[M+Na]^+$ (calc. 301,1052).

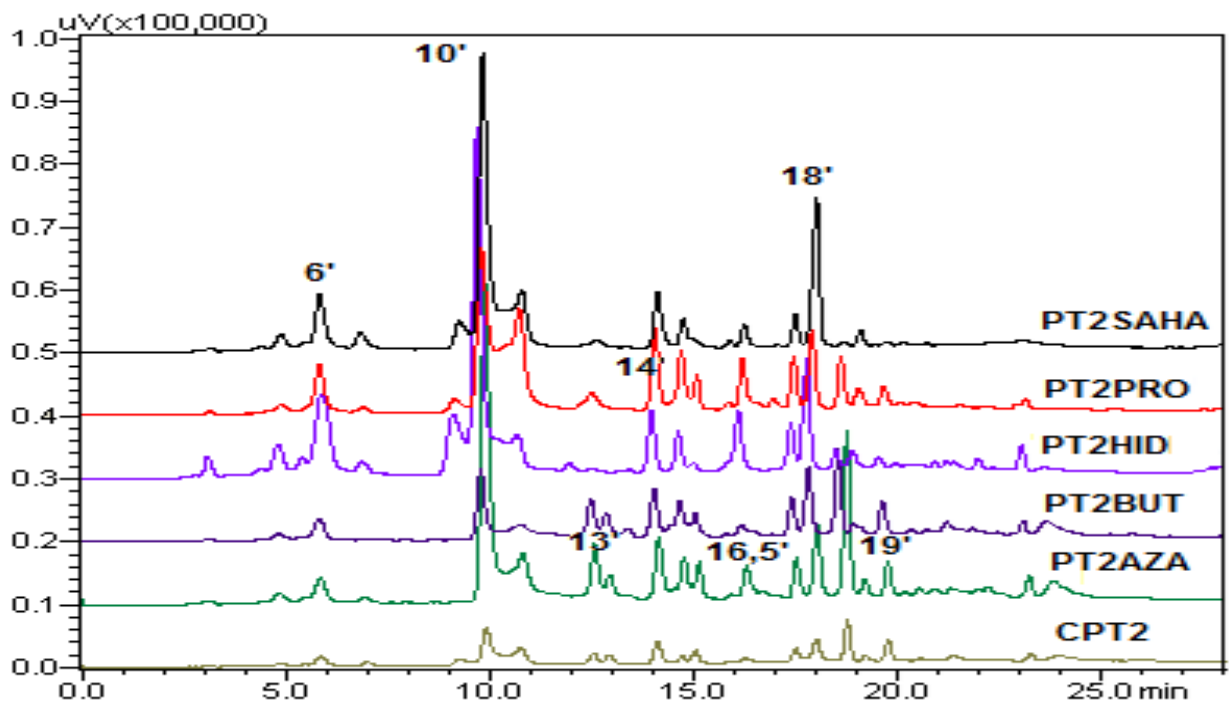
Sendo assim, sugere-se que a fiscalina C e o ácido pulvilórico foram produzidos no metabolismo basal do *P. tanzanicum* no presente estudo, a partir dos resultados obtidos pela técnica de PS-MS, com gasto mínimo de tempo e de solventes orgânicos. Técnicas analíticas complementares foram utilizadas para os extratos do experimento PT3, conforme descrito em item posterior.

5.3.3 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)

P. tanzanicum foi cultivado em MLP adicionando-se os moduladores AZA, BUT, HID, PRO e SAHA ao meio de cultura, para se avaliar os efeitos dos moduladores epigenéticos no perfil cromatográfico e nas atividades biológicas de interesse. Os extratos do meio de cultura MLP contendo cada um dos moduladores epigenéticos (500 µM) foram obtidos e analisados para controle do experimento. Estes não apresentaram sinais cromatográficos, e, portanto, os componentes do meio de cultura não interferiram nos resultados apresentados a seguir.

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos a partir do experimento PT2 evidenciou aumento da expressão de metabólitos por *P. tanzanicum* em todos os tratamentos, indicados pelos novos sinais observados: AZA (Rt 10, 13, 16,5 e 19 min), BUT (Rt 13, 15, 18 e 19 min), HID (Rt 6, 10, 16,5 e 18 min), PRO (Rt 6, 10, 14 e 16,5 min) e SAHA (Rt 6, 10 e 18 min), conforme pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 - Cromatogramas (CLAE-UV-Vis a 410 nm) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (CPT2) e dos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT2AZA), butirato de sódio (PT2BUT), hidralazina (PT2HID), procainamida (PT2PRO) e ácido hidroxâmico suberoilânilda (PT2SAHA) do experimento PT2.



O efeito predominante do modulador SAHA foi o aumento da produção dos metabólitos biossintetizados na condição basal (Rt 10 e 18 min), enquanto os moduladores PRO e HID induziram predominantemente a expressão de novos metabólitos (6 e 16,5 min), sendo, estes últimos, os moduladores que mais alteraram o perfil metabólico de *P. tanzanicum* em relação à condição basal do experimento. AZA e BUT induziram a expressão aumentada de metabólitos da condição basal de maneira similar entre si, porém menos expressiva em relação aos outros moduladores, sendo que AZA também induziu a expressão de um novo metabólito (Rt 16,5 min). BUT foi o modulador que menos alterou a expressão metabólica. Tendo em vista as mudanças no perfil cromatográfico dos extratos do fungo sob modulação em relação ao extrato controle, foram realizados ensaios *in vitro* para se verificar uma possível correlação entre o aparecimento de novos metabólitos e aumento das atividades biológicas de interesse.

5.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

Os resultados dos diferentes ensaios da capacidade antioxidante dos extratos do *P. tanzanicum* cultivado em meio MLP na presença de moduladores adicionados individualmente (500 µM) estão apresentados na Tabela 4.

Esse fungo sob o efeito do modulador AZA apresentou extrato com o maior teor de compostos fenólicos totais (30,96 mg EAG/g), já a presença de PRO e HID gerou os extratos com maior capacidade antioxidante total (69,23 e 52,08 mg EAA/g, respectivamente). Quanto ao poder redutor férrico e teor de flavonoides totais, o SAHA mostrou ser o modulador mais eficaz (23,24% e 252,33 mg QE/g, respectivamente). E em relação ao resultado de DPPH, os moduladores BUT, HID e PRO foram os que apresentaram menores EC₅₀, portanto maior capacidade antioxidante (0,69, 0,63 e 0,56 mg/mL) (Tabela 4). O ácido ascórbico, padrão positivo utilizado no ensaio, apresentou EC₅₀ de 0,055 mg/mL. Considerando os ensaios de capacidade antioxidante total e de captura de DPPH, os moduladores PRO e HID foram os que apresentaram maior efeito no aumento da ação antioxidante *in vitro*.

Em todos os tratamentos, os níveis totais de flavonoides foram maiores do que no controle, exceto para *P. tanzanicum* tratado com PRO (Tabela 4), cujo valor foi igual estatisticamente. Portanto, sugere-se que as alterações causadas pelos

modificadores epigenéticos na composição dos extratos de *P. tanzanicum* tiveram papel importante papel na ativação de genes responsáveis pela biossíntese compostos antioxidantes, em especial da classe dos flavonoides.

Tabela 4 - Ação antioxidante dos extratos de *P. tanzanicum* (PT) cultivados na presença de moduladores epigenéticos (AZA, BUT, HID, PRO e SAHA) em comparação com o extrato do fungo controle (CPT2) do experimento PT2.

	PT2AZA	PT2BUT	PT2HID	PT2PRO	PT2SAH	CPT2
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	30,96 ± 1,45 ^a	15,96 ± 0,82 ^c	16,88 ± 1,77 ^c	16,69 ± 1,56 ^c	8,92 ± 1,84 ^d	20,73 ± 1,15 ^b
Capacidade antioxidante total (mg EAA/g)	28,71 ± 2,01 ^c	18,66 ± 1,46 ^d	52,08 ± 3,81 ^b	69,23 ± 8,12 ^a	25,97 ± 2,87 ^{cd}	29,51 ± 1,55 ^c
Poder redutor férrico (%)	13,67 ± 1,67 ^b	12,01 ± 1,47 ^b	13,85 ± 0,70 ^b	11,40 ± 1,18 ^b	23,24 ± 3,33 ^a	9,26 ± 2,78 ^b
Flavonoides totais (mg EQ/g)	209,00 ± 1,58 ^{bc}	215,23 ± 1,94 ^b	198,47 ± 9,75 ^c	181,72 ± 4,23 ^d	252,33 ± 4,64 ^a	176,81 ± 2,24 ^d
DPPH (EC ₅₀ em mg/mL)	0,78 ± 0,03 ^a	0,69 ± 0,10 ^b	0,63 ± 0,03 ^b	0,56 ± 0,08 ^b	0,88 ± 0,10 ^a	0,97 ± 0,07 ^a

Os dados na mesma linha seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). PT2: referente ao experimento PT2; AZA: 5-azacitidina, HID: hidralazina, BUT: butirato de sódio, PRO: procainamida e SAH: ácido hidroxâmico suberoilânido. EAG: equivalente de ácido gálico; EAA: equivalente de ácido ascórbico; EQ: equivalente de quercetina. DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. EC₅₀: concentração capaz de capturar 50% dos radicais DPPH presentes no meio reacional.

Uma vez que todos os extratos provenientes de cultivos sob modulação apresentaram ação antioxidante superior ao controle para pelo menos um dos ensaios realizados, sugere-se que os moduladores tenham induzido a produção de novos metabólitos e/ou ao aumento da biossíntese de antioxidantes produzidos no metabolismo basal. Dados da literatura corroboram tais efeitos, como por exemplo o estudo de El-Hawary et al., (2018), em que nove compostos fenólicos foram produzidos pelo fungo *Penicillium brevicompactum* na presença de butirato de sódio (10 mM) sem ser produzido na condição controle, além do aumento da produção do ácido antranílico (de 3,2 para 9,8 mg/L), um composto conhecidamente antioxidante.

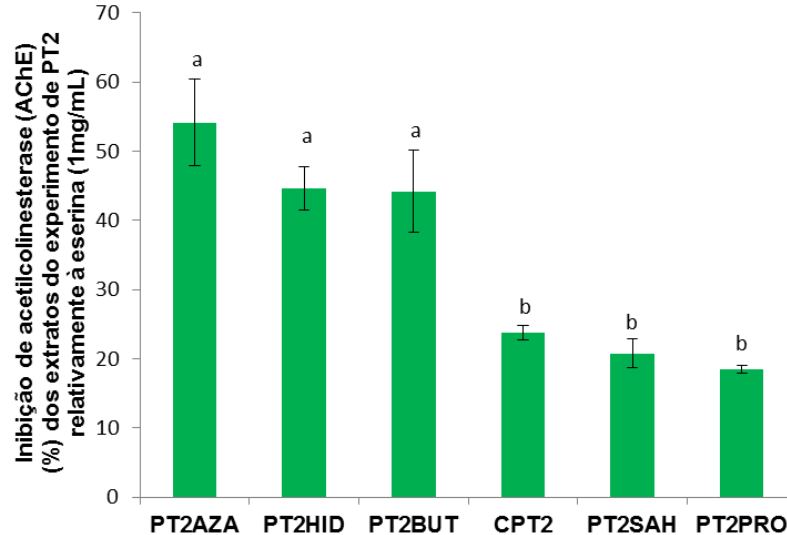
Dentre os nove compostos produzidos, três apresentaram destaque para a capacidade de captura de radical DPPH frente ao ácido gálico ($EC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$), sendo eles ácido siríngico, ácido sináptico e acetoseringona ($EC_{50} = 20, 30$ e $25 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (EL-HAWARY et al., 2018).

No trabalho de Dwibedi et al. (2019), o fungo *Xylaria psidii* cultivado na presença dos moduladores 5-azacitina ($10 \mu\text{M}$) e ácido suberoil hidroxâmico ($5 \mu\text{M}$), adicionados separadamente ao meio de cultura, aumentou a biossíntese do composto fenólico resveratrol em 38,13% e 47,67%, respectivamente, em comparação com a condição controle (sem nenhum modulador epigenético) (DWIBEDI et al., 2019). Portanto, tais dados também confirmam o efeito desses moduladores (AZA e SAHA) no aumento da biossíntese de metabólitos antioxidantes quando adicionados ao meio de cultura de fungos filamentosos.

5.3.5 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de *P. tanzanicum* (PT2)

O resultado relativo à atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos controle e provenientes do cultivo do *P. tanzanicum* com moduladores epigenéticos (5-azacitina, butirato de sódio, hidralazina, procainamida e ácido hidroxâmico suberoilanylida) está apresentado no gráfico da Figura 6. Os extratos resultantes do cultivo do *P. tanzanicum* com AZA, HID e BUT foram mais eficientes no aumento da biossíntese de inibidores da acetilcolinesterase (54%, 44% e 44%, respectivamente), sendo iguais estatisticamente entre si e superiores ao valor do extrato controle (24%).

Figura 6 - Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase (%) dos extratos do fungo *P. tanzanicum* (PT) cultivado na presença dos moduladores epigenéticos (AZA, HID, BUT, SAHA e PRO) em comparação com o extrato do fungo cultivado na ausência do modulador epigenético (CPT2), em relação à eserina (1 mg/mL, padrão positivo).



AZA: 5-azacitidina, HID: hidralazina; BUT: butirato de sódio, PRO: procainamida e SAHA: ácido hidroxâmico suberolilanilida.

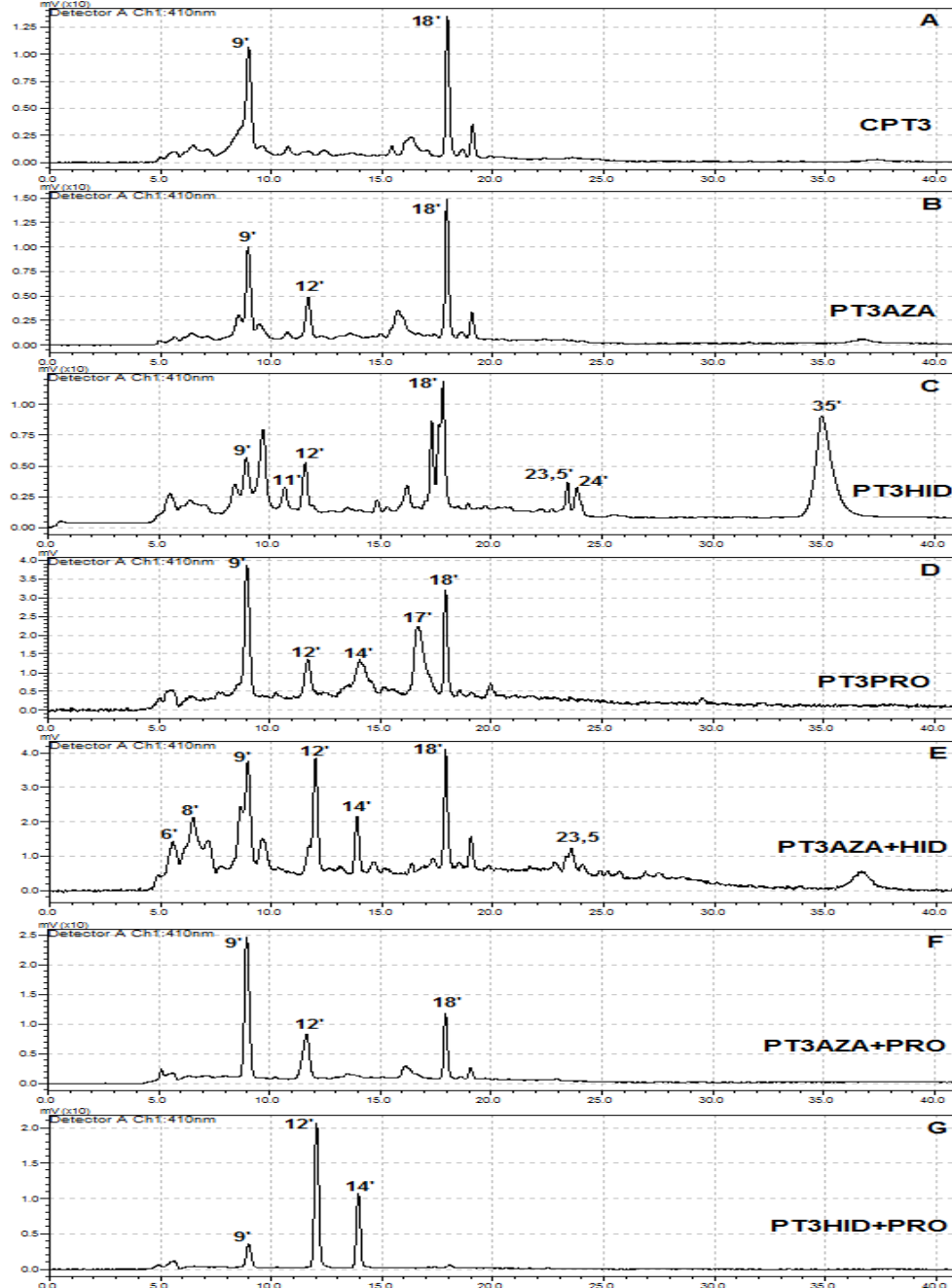
Estudos relataram compostos do metabolismo basal de *Penicillium* sp., tais como Arisugacin I e F (EC_{50} de 0,64 μ M e 0,37 μ M, respectivamente), Territrem B (EC_{50} de 7,03 μ M), além dos metabólitos produzidos por *Penicillium citrinum* (Quinolactacina A1 com EC_{50} de 280 μ M e Quinolactacina A2 com EC_{50} de 19,8 μ M), *P. chermesinum* (Terfenil com EC_{50} de 5,2 μ M) e *P. griseofulvum* (Hiperzine A com EC_{50} de 0,6 μ M) com atividade inibitória de acetilcolinesterase (SU et al., 2017). Esses metabólitos pertencem às classes químicas dos terpenos (Territrem B, Arisugacin I e F) e alcaloides (Hiperzine A e Quinolactacinas A1 e A2).

Na literatura foi descrita a ocorrência de sinergismo quando *Penicillium janthinellum* foi cultivado na presença de dois moduladores epigenéticos simultaneamente, aumentando a atividade de inibição de AChE de 39% (extrato controle) para 100% (extrato do fungo cultivado com PRO e HID) (LIMA et al., 2017). Tendo em vista tal evidência, o uso combinado de moduladores epigenéticos pode interferir positivamente no metabolismo do *P. tanzanicum*, efeito que foi avaliado por meio de análises cromatográficas no experimento PT3.

5.3.6 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)

No experimento PT3, *P. tanzanicum* foi cultivado na presença dos moduladores AZA, HID e PRO, sozinhos ou combinados em pares (AZA+HID, AZA+PRO e HID+PRO) para se avaliar o efeito individual e o sinergismo dos moduladores utilizados concomitantemente. Os perfis cromatográficos estão apresentados na Figura 7. O cromatograma do extrato contendo os metabólitos naturalmente produzidos pelo fungo *P. tanzanicum* (Figura 7A) mostra a presença de dois sinais majoritários (Rt 9 e 18 min), além de um sinal, em 19 min, referente a um terceiro composto, este último, minoritário. Os sinais referentes aos metabólitos majoritários também estão presentes nos cromatogramas dos extratos produzidos na presença de 5-azacitidina, hidralazina e procainamida (PT3AZA, PT3HID e PT3PRO, respectivamente) (Figura 7B, C e D), bem como nos extratos em que hidralazina e procainamida foram adicionados simultaneamente com 5-azacitidina (PT3AZA+HID e PT3AZA+PRO, respectivamente) (Figura 7E e F). A única exceção ocorreu quando *P. tanzanicum* cresceu na presença dos modificadores epigenéticos hidralazina e procainamida (PT3HID+PRO) (Figura 7G), adicionados concomitantemente no meio de cultura. O composto minoritário detectado em Rt 19 min (Figura 7A) também foi produzido, aproximadamente na mesma quantidade, em algumas condições (PT3AZA, PT3AZA+HID) e, em menor quantidade quando uma mistura de 5-azacitidina e procainamida foi incorporada ao meio de cultura (Figura 7F). Nas demais condições, a produção desse metabólito foi silenciada.

Figura 7 - Cromatogramas (CLAE-UV-Vis a 410 nm) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (A) (CPT3) e dos extratos obtidos adicionando-se moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos (cromatogramas B, C e D, respectivamente) ou combinados (E, F e G) do experimento PT3.

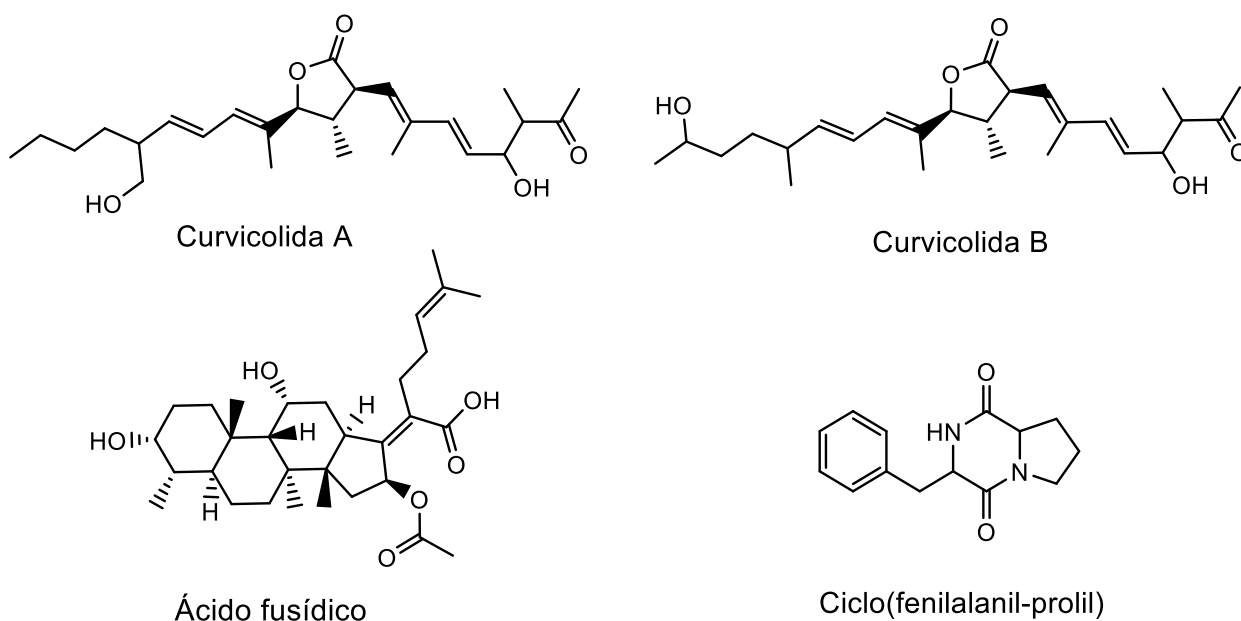


Em praticamente todos os experimentos foi verificado aumento da expressão metabólica por *P. tanzanicum*. O uso concomitante dos moduladores 5-azacitidina e hidralazina aumentou o número de sinais visualizados no cromatograma (Figura 7E), o que é uma indicação de ação sinérgica, já que, sozinhos não geraram a mesma expressão metabólica (Figura 7B e C).

A procainamida mostrou influenciar significativamente o metabolismo de *P. tanzanicum* (Figura 7D), inclusive em combinação com AZA (Figura 7F), levando à biossíntese de um metabólito com Rt 12 min. Já a mistura de procainamida com hidralazina, apesar de não induzir uma grande diversificação metabólica, apresentou esse metabólito com Rt 12 min (Figura 7G) como majoritário, também detectado em outros extratos em menor (Figura 7B, C, D e F) ou maior (7E) proporção.

Assim como ocorreu no presente estudo, resultados de Oliveira et al. (2019) evidenciaram maior diversificação metabólica, avaliada por CLAE-UV-Vis, do extrato do fungo *Penicillium sp.* cultivado na presença de hidralazina em comparação com o extrato obtido pela adição de procainamida no cultivo do mesmo fungo. Em estudo de González Melendez (2016), o fungo *Dothiora sp.* (cepa CF-285353) na presença de hidralazina (100 μ M) produziu maior quantidade de metabólitos, como as curvicolidas A e B e ácido fusídico, além de induzir a produção da dicetopiperazina ciclo(fenilalanil-prolil) (Figura 8).

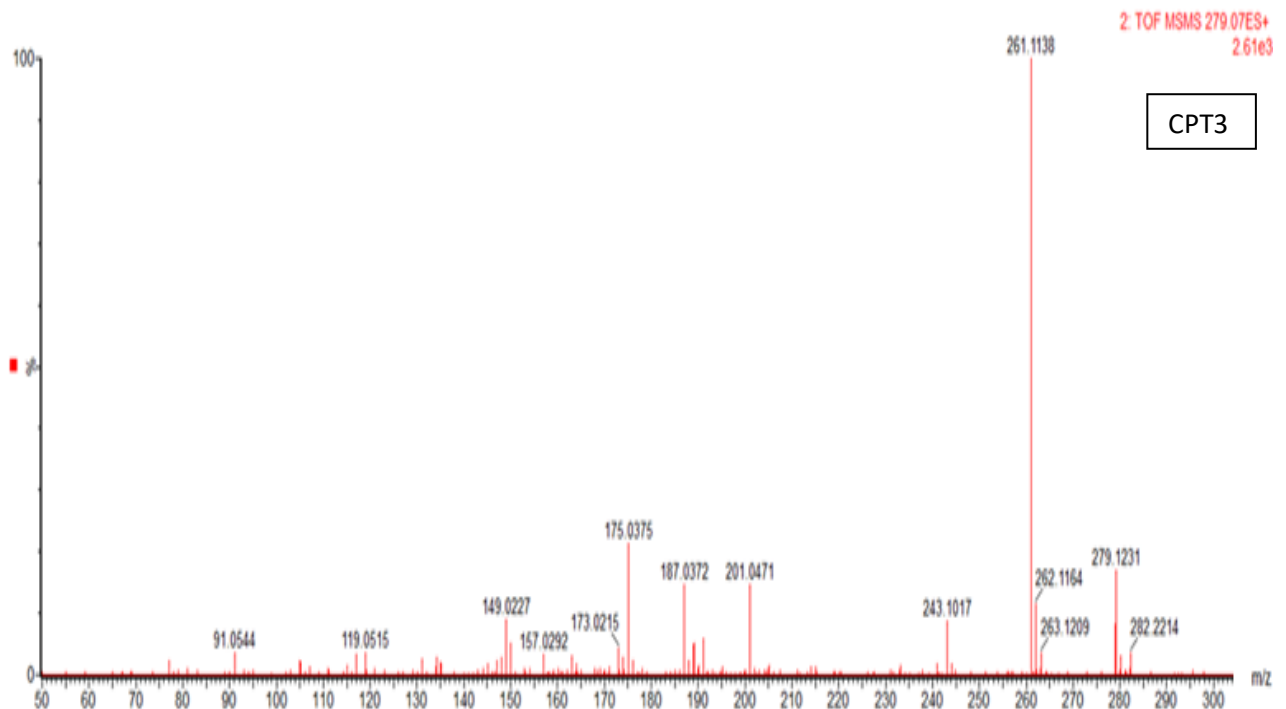
Figura 8 - Metabólitos produzidos em maior quantidade (curvicolida A e B e ácido fusídico) e exclusivamente (ciclo-fenilalanil-prolil) por *Dothiora sp.* na presença de hidralazina (100 μ M).



5.3.7 Análise dos extratos de *P. tanzanicum* (PT3) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UPLC-QqTOF-MS/MS)

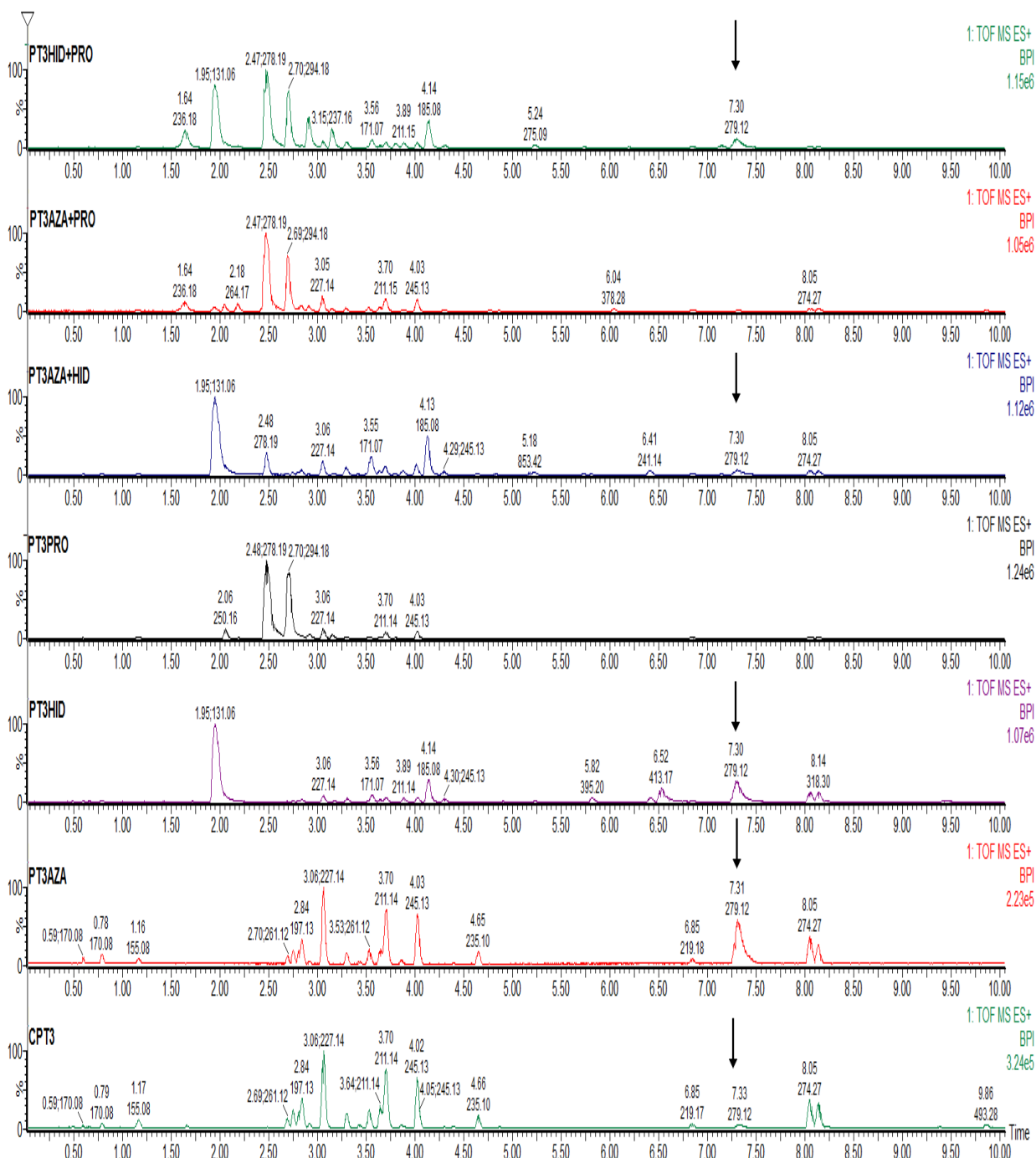
Para o extrato controle do experimento PT3, foi realizada a análise do espectro de massas de fragmentação (MSMS) do pico com m/z 279,1231 (Figura 9), a fim de se confirmar o principal produto de seu metabolismo basal. Este espectro apresentou o pico m/z 261,1138, atribuído ao fragmento resultante da perda de uma molécula de água a partir do $[M+1]^+$, confirmando a biossíntese do ácido pulvilórico no metabolismo basal do experimento PT3.

Figura 9 - Espectro de massas MSMS do extrato do *P. tanzanicum* crescido em meio líquido padronizado (MLP) sem modulador epigenético (CPT3) do experimento PT3.



Os perfis cromatográficos obtidos pela análise em UPLC-QqTOF-MS/MS referentes ao experimento PT3 estão apresentados na Figura 10. Analisando-se os espectros de massas dos diferentes tratamentos é possível verificar uma variação metabólica do *P. tanzanicum* decorrente da presença dos moduladores epigenéticos no meio de cultura. Um dos metabólitos que foi identificado em experimento anterior, o ácido pulvilórico, cujo R_t foi de 7,3 min, apresentou grandes variações devido à influência dos moduladores.

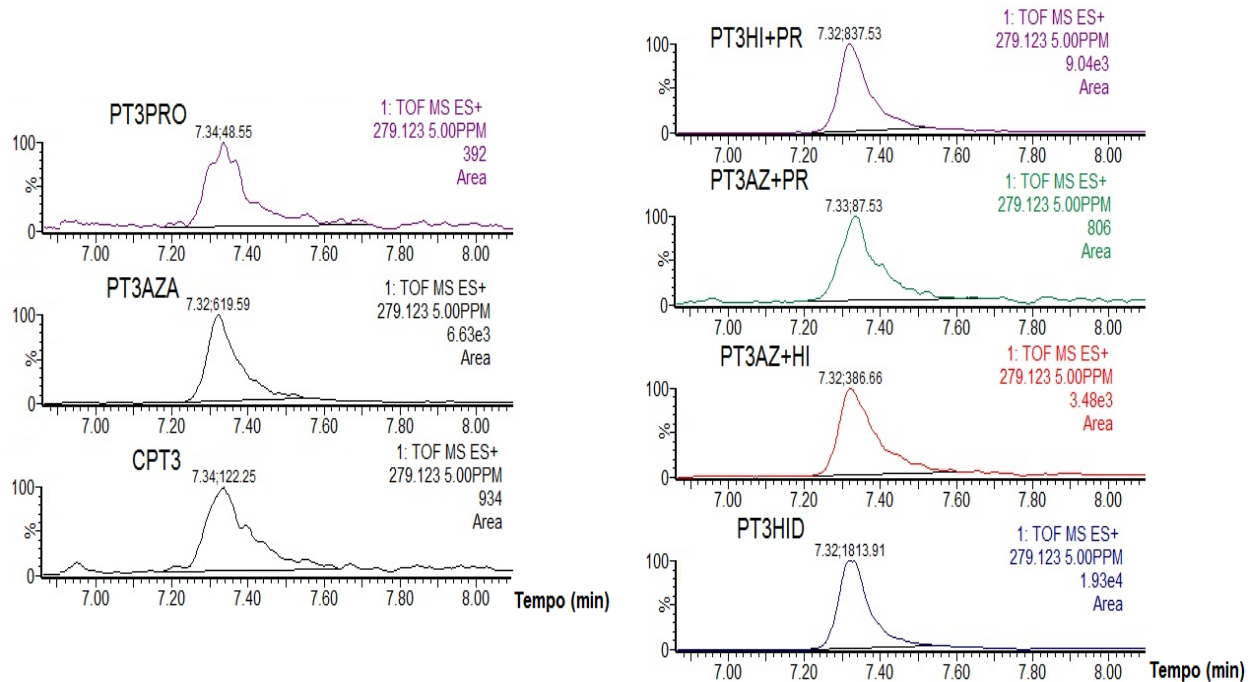
Figura 10 - Cromatogramas (UPLC-QqTOF-MS) do extrato bruto de *P. tanzanicum* (A) (CPT3) e dos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos (cromatogramas B, C e D, respectivamente) ou combinados (E, F e G) do experimento PT3.



NOTA: As setas indicam picos atribuídos ao ácido pulvilórico pela análise dos espectros de massas.

A Figura 11 apresenta a região do cromatograma em que o pico do ácido pulvilórico foi detectado (íon com m/z 279,1231) e os valores da integração do pico referente a este íon molecular.

Figura 11 - Cromatogramas dos extratos do experimento PT3, com destaque para a região correspondente ao íon com m/z de 279,1231 (correspondente ao ácido pulvilórico) e os valores da integração deste íon molecular.



Uma vez que todos os extratos brutos foram solubilizados em metanol na mesma concentração para serem analisados por espectrometria de massas, as áreas dos picos são proporcionais à quantidade de ácido pulvilórico em cada extrato. Considerando isso, os valores das áreas integradas foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valor das integrais dos picos referentes ao ácido pulvilórico no extrato bruto de *P. tanzanicum* (CPT3) e nos extratos obtidos adicionando-se os moduladores epigenéticos 5-azacitidina (PT3AZA), hidralazina (PT3HID) e procainamida (PT3PRO) sozinhos ou combinados do experimento PT3.

Extrato	CPT3	PT3 AZA	PT3 PRO	PT3 HID	PT3 AZA+ HID	PT3 AZA+ PRO	PT3 HID+ PRO
Valor da integral	122,2	619,6	48,5	1813,9	386,7	87,5	837,5
Variação relativa ao controle	Controle	↑5,1	↓2,5	↑14,8	↑3,2	↓1,40	↑6,8

NOTA: Aumento (↑) ou redução (↓) do valor da integral dos extratos tratados em comparação com o controle.

Como pode ser observado, na presença de procainamida e da mistura de procainamida com 5-azacitidina houve redução da produção de ácido pulvilórico (2,5 e 1,4 vezes, respectivamente). Já o modulador azacitidina sozinho, aumentou em 5,1 vezes a quantidade de ácido pulvilórico produzida por *P. tanzanicum*. Hidralazina foi o melhor estimulador da biossíntese desta substância, aumentando-a em 14,8 vezes. Porém, quando administrada junto com azacitidina ou procainamida, a indução foi menor (3,2 e 6,8 vezes, respectivamente). Desta forma, hidralazina mostrou-se muito efetiva para aumentar a produção deste metabólito que possui atividade antimicrobiana (CHEN et al., 2020).

5.3.8 Análises dos extratos de *P. tanzanicum* (PT3) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise do perfil por CLAE-UV-Vis, apresentado anteriormente, mostra o aumento ou diminuição do número de picos, o que revela respectivamente a ativação ou silenciamento de genes. Conforme discutido, houve alterações, mostrando que a presença dos moduladores nas condições de cultivo utilizadas foi capaz de alterar a produção metabólica de *P. tanzanicum*. No entanto, apesar da grande utilidade da CLAE-UV-Vis para mostrar alterações no perfil metabólico, esta técnica sozinha não fornece dados que possam levar a inferências relacionadas à estrutura das substâncias produzidas ou às classes de metabólitos produzidos. Para a obtenção de dados estruturais, os extratos foram analisados por RMN de ^1H . A RMN é uma técnica robusta, capaz de fornecer dados estruturais importantes como a presença de ácidos graxos, compostos aromáticos, terpenos, entre outros, já que os deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio presentes nestes grupos de substâncias são conhecidos e tabelados (ZABEK et al., 2017).

Para a análise do efeito dos moduladores 5-azacitidina, procainamida e hidralazina no perfil metabólico de *P. tanzanicum* por RMN de ^1H , foi necessário descartar inicialmente possíveis sinais presentes nos espectros referentes aos moduladores adicionados durante o cultivo. Para tal, os espectros de RMN de ^1H dos moduladores foram simulados utilizando o ChemDraw Professional 16.0 e são apresentados na Figura 12, junto com as respectivas estruturas químicas. Os valores em azul correspondem ao deslocamento químico dos respectivos átomos de

hidrogênio presentes nos espectros. No espectro simulado de cada modulador, foram selecionados dois sinais característicos (destacados em vermelho) e ausência dos mesmos nos espectros do extrato do fungo onde os moduladores foram adicionados foi avaliada. Isso foi feito porque quantidades residuais dos moduladores poderiam ter sido extraídas, fornecendo novos sinais nos espectros de RMN que não seriam provenientes da presença de novos metabólitos e, sim, dos moduladores.

A comparação dos espectros dos extratos obtidos com os espectros simulados confirmou ausência dos sinais selecionados para 5-azacitidina (simpleto em 7,13 e duplete em 5,85 ppm) (Figura 12A) e procainamida (dois dupletos em 6,54 e 7,56 ppm) (Figura 12B), enquanto que no espectro de RMN de ^1H do extrato obtido na presença de hidralazina (Figura 12C), foram avaliados os sinais em 7,9 e 4,59 ppm. Sinais intensos em 7,9 que poderiam corresponder à hidralazina foram detectados no espectro do extrato. Apesar de o sinal em 4,59 ppm não ter sido observado, pode ter havido perda do grupo amina (NH_2), justificando a ausência deste sinal, inferindo-se que a hidralazina e/ou um produto de decomposição desta poderiam estar presentes e os demais dados foram avaliados levando-se esta possibilidade em consideração.

Tendo-se avaliado a presença dos moduladores nos extratos, iniciou-se a comparação dos perfis pela análise do espectro de RMN de ^1H do extrato contendo os metabólitos produzidos por *P. tanzanicum* em caldo peptonado na ausência de moduladores epigenéticos, que é apresentado na Figura 13. Foram observados sinais intensos na região de hidrogênios alifáticos (δ 0,5-2,0 ppm), típicos de hidrocarbonetos de cadeia longa e terpenos, além de um sinal intenso em δ 1,3, que pode ser associado a grupos metilênicos da cadeia de ácidos graxos. Sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados são amplamente visualizados na região entre δ 3,0 e 4,5 ppm e sinais na região entre δ 5,3 e 6,0 ppm indicam a presença de ligações duplas. Na região entre δ 6,0 e 9,0 diversos sinais indicam a presença de hidrogênios aromáticos, alguns dos quais poderiam ser provenientes de polifenóis e flavonoides, já que esses compostos são tipicamente produzidos por fungos desse gênero (Tabela 1, pág. 28).

Figura 12 - Espectros de RMN de ^1H , estruturas químicas e deslocamento dos átomos de hidrogênio (em azul) dos moduladores 5-azacitidina (A), procainamida (B) e hidralazina (C) simulados utilizando o ChemDraw Professional 16.0.

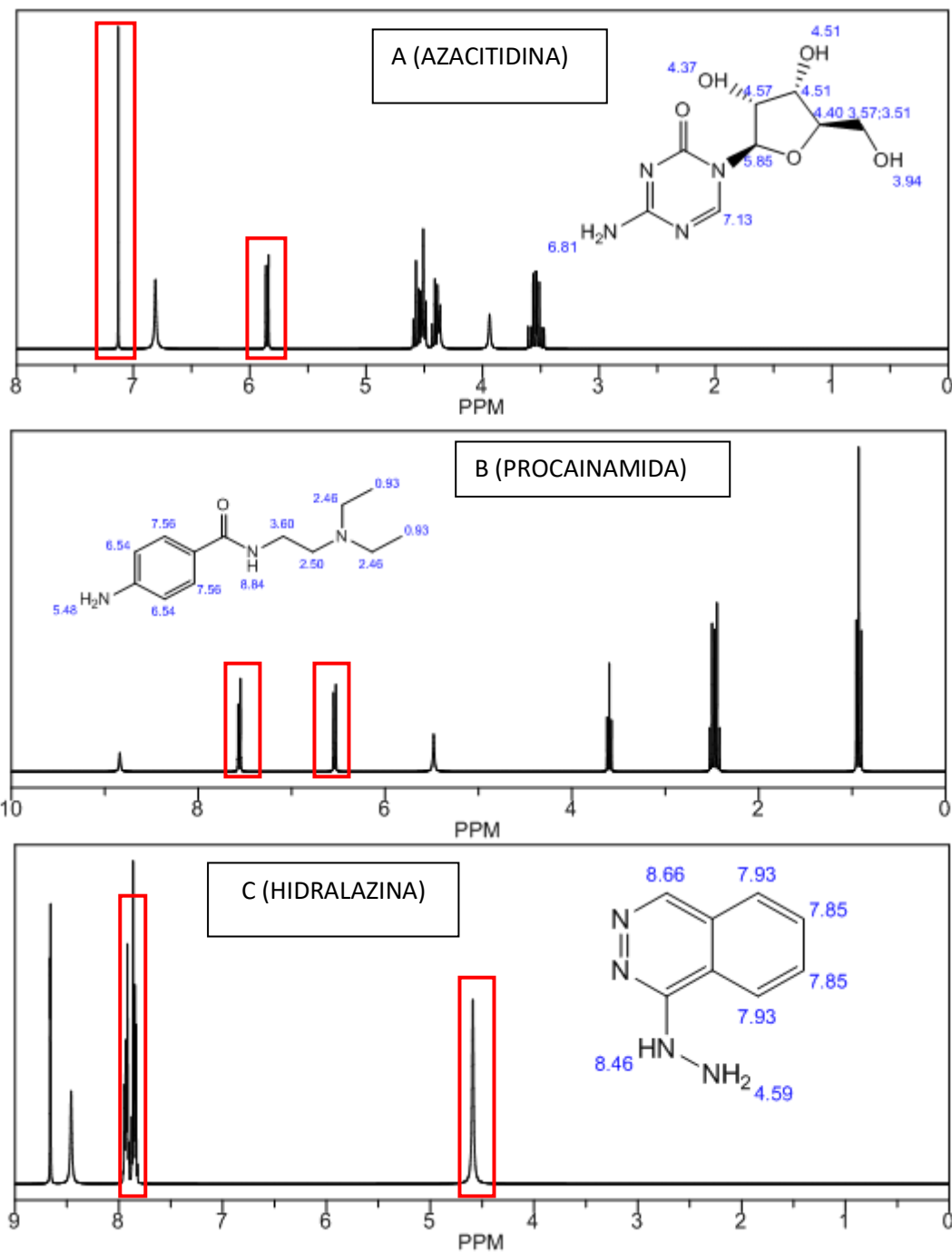
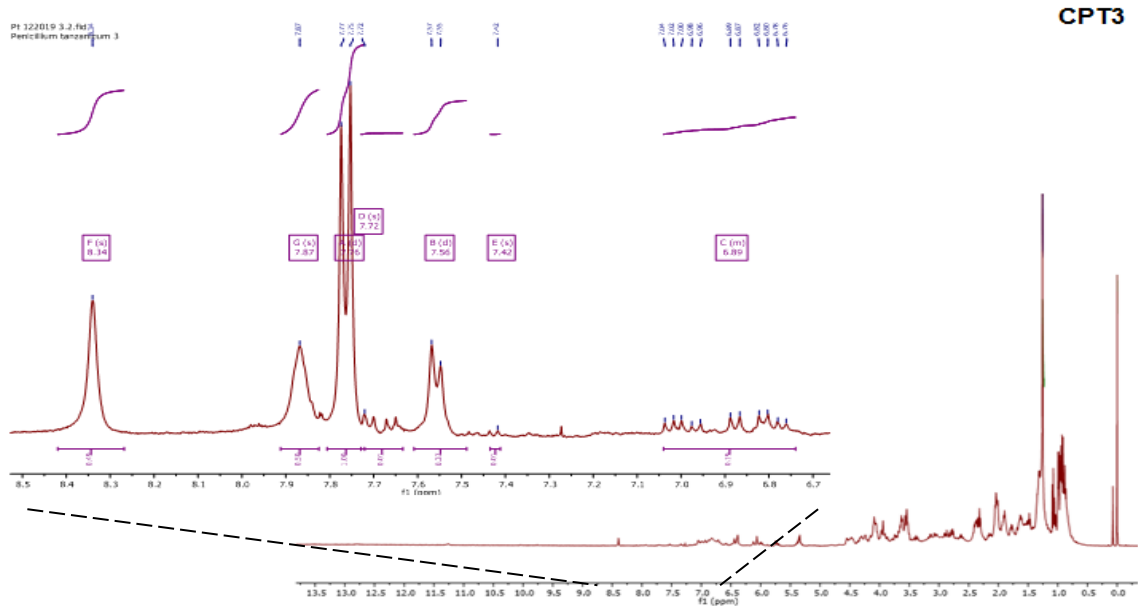


Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H do extrato de *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) do experimento PT3 e expansão da região entre de 6,7 a 8,5 ppm. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.

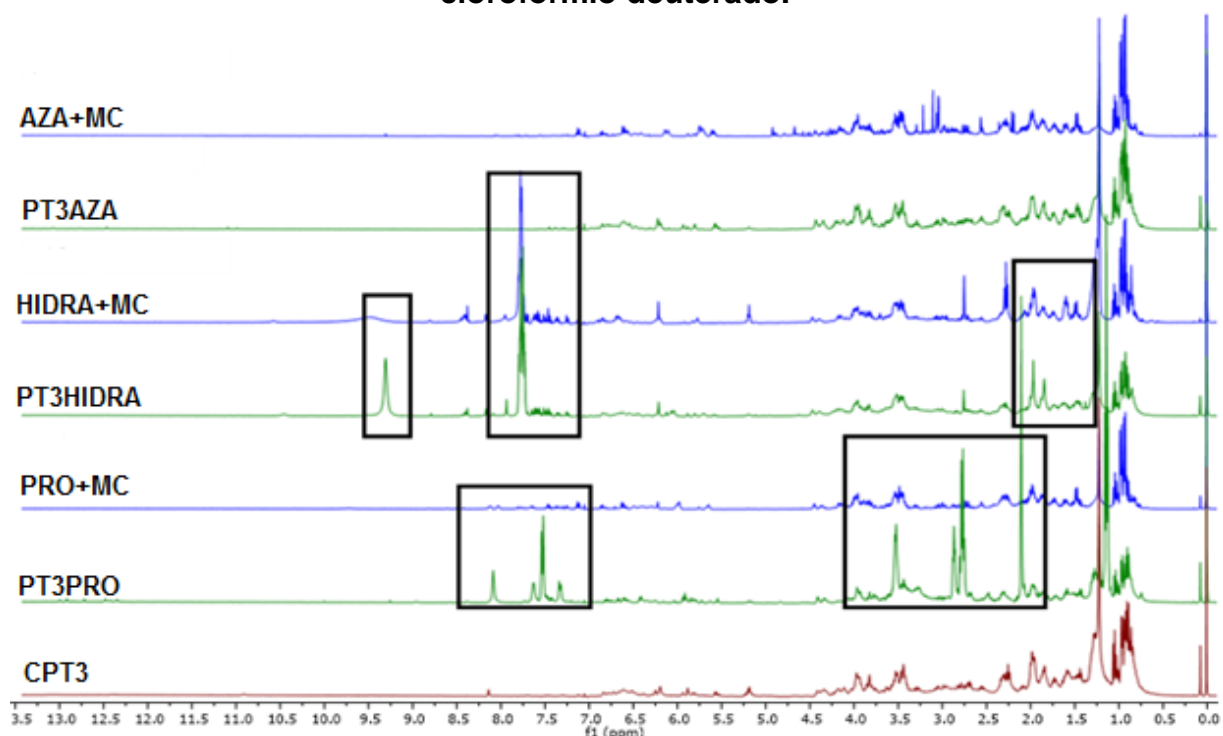


Em seguida, realizou-se um estudo comparativo dos espectros de RMN de ^1H do extrato de *P. tanzanicum* cultivado em meio peptonado na ausência (em vermelho) e na presença dos moduladores 5-azacitidina, procainamida e hidralazina (em verde) (Figura 14). Os espectros dos respectivos controles (meio de cultura e moduladores, em azul) também foram inseridos na figura para fins de comparação. Esses controles permitem eliminar o efeito da matriz (meio de cultura), bem como sinais referentes aos átomos de hidrogênio que por ventura poderia estar presentes nos moduladores.

Em geral, observa-se que o espectro do experimento (PT3AZA) e do controle contendo 5-azacitidina (Aza) são semelhantes, não havendo alterações significativas antes da ampliação de sinais, que será alvo de discussão mais adiante. Em relação ao experimento com hidralazina, notam-se sinais predominantes em $\sim 8,2$ ppm, bastante semelhantes àqueles em 7,85 ppm e 7,93 ppm, atribuídos anteriormente a átomos de hidrogênio aromáticos presentes no esqueleto da hidralazina (Figura 12C). Desta forma, estes sinais indicam ter ocorrido extração de hidralazina remanescente do tratamento de *P. tanzanicum* com este modulador (Figura 14, PT3HIDRA). As demais alterações foram ressaltadas e serão discutidas mais adiante. Já o tratamento do fungo com procainamida (PT3PRO) foi bastante

efetivo para alterar a produção metabólica do fungo e tais alterações serão discutidas a seguir.

Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos dos controles dos meios de cultura contendo moduladores (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com moduladores (em verde) e do *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3. As ressalvas em preto correspondem aos picos relacionados a valores citados no texto. Aza: 5-azacitidina, Pro: procainamida e Hidra: hidralazina. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.



5.3.8.1 Efeito da 5-azacitidina

A Figura 15 apresenta os espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle contendo 5-azacitidina (em azul), do experimento de modulação do fungo com 5-azacitidina (em verde) e do fungo na ausência de modulador (em vermelho), na região entre 5,6 e 7,6 ppm, bem como expansões dentro desta região. Pode-se observar um grande número de novos sinais nesta região (setas azuis), típica de hidrogênios aromáticos, evidenciando a biossíntese de novos metabólitos por indução da 5-azacitidina.

5.3.8.2 Efeito da hidralazina

O efeito da hidralazina na modulação (linha verde) foi mais discreto, como pode ser observado na Figura 14. No entanto, nota-se claramente a presença de novos sinais em 9,5 ppm e entre 6,2-6,4 ppm, indicativos da produção de metabólitos aromáticos por *P. tanzanicum* sob modulação com hidralazina (Figura 16).

Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo 5-azacitidina (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com 5-azacitidina (em verde) e do *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.

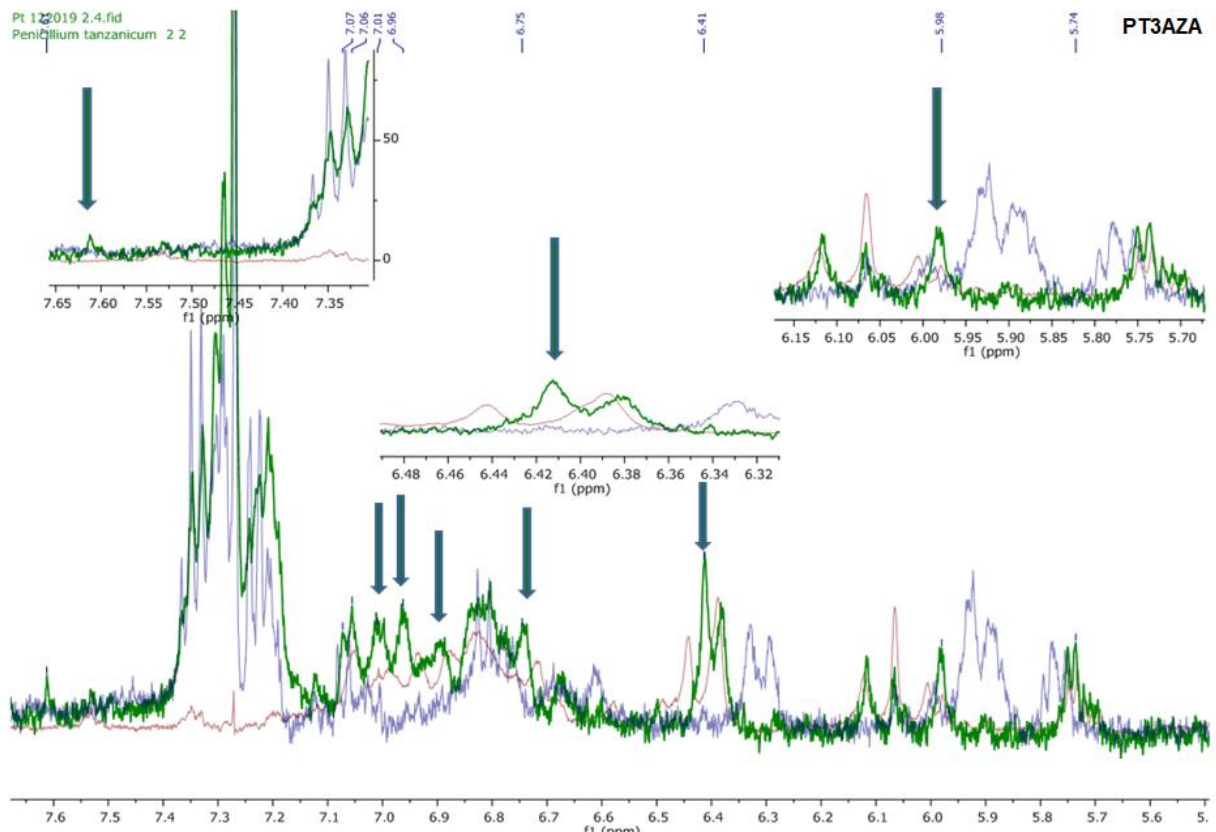
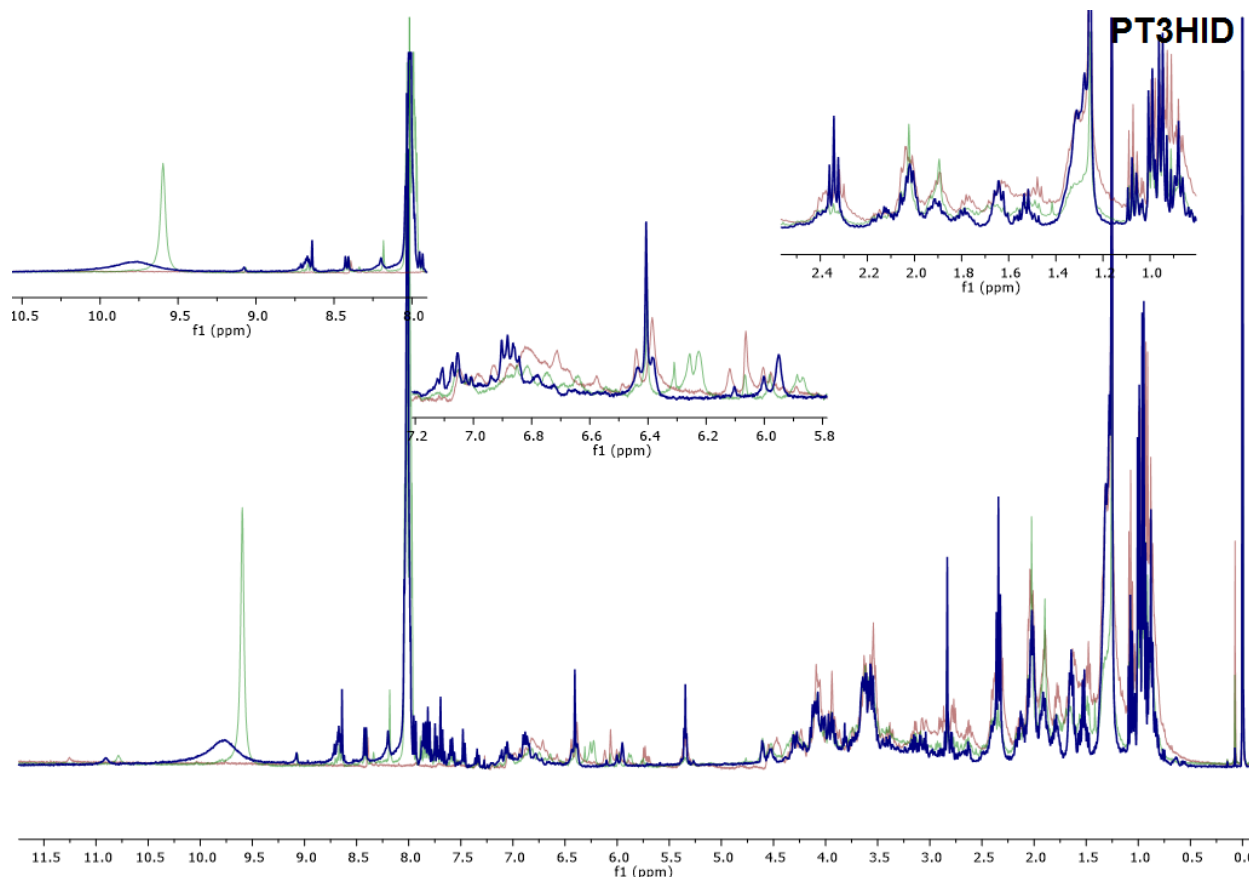


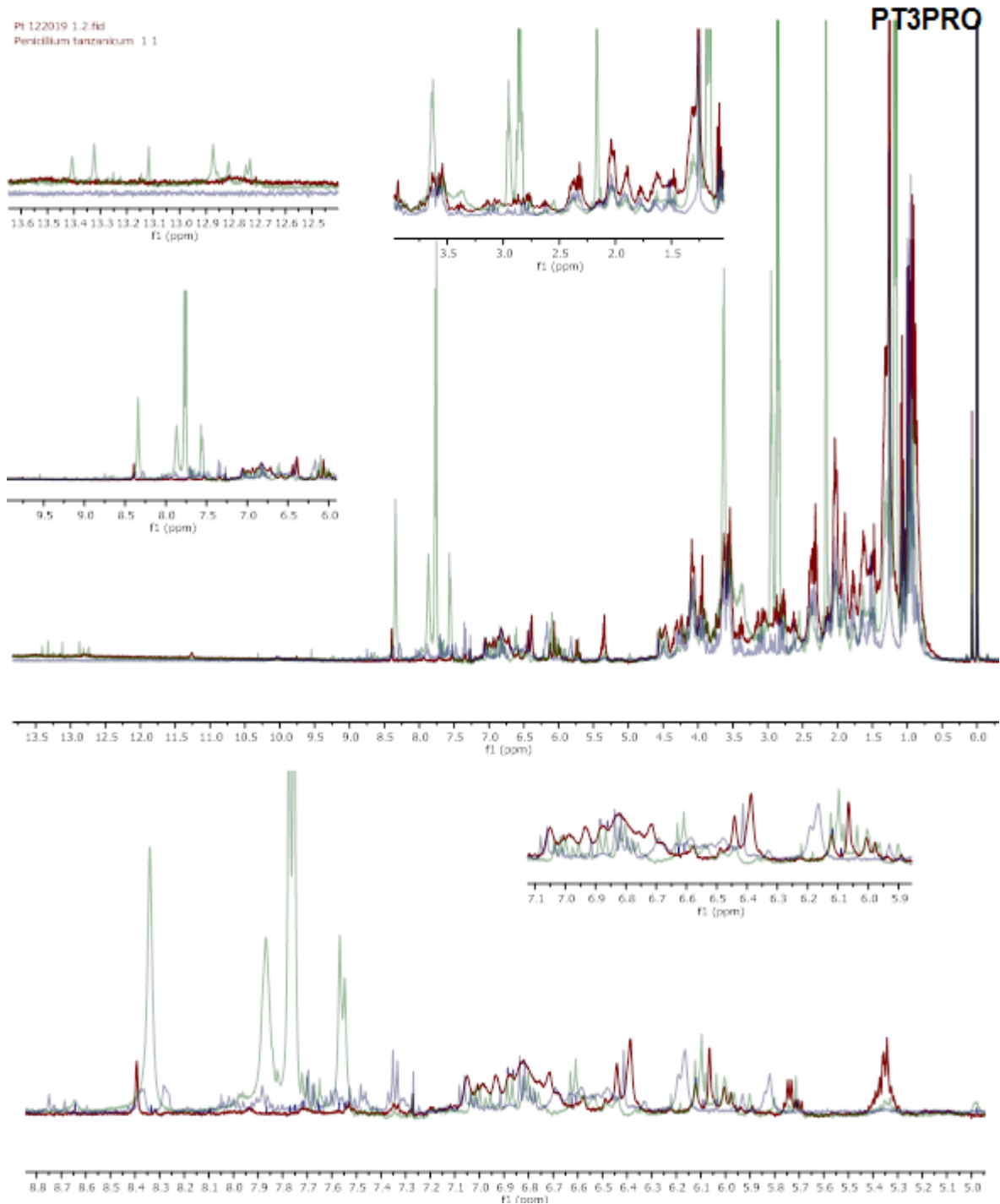
Figura 16 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo hidralazina (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com hidralazina (em verde) e do *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.



5.3.8.3 Efeito da procainamida

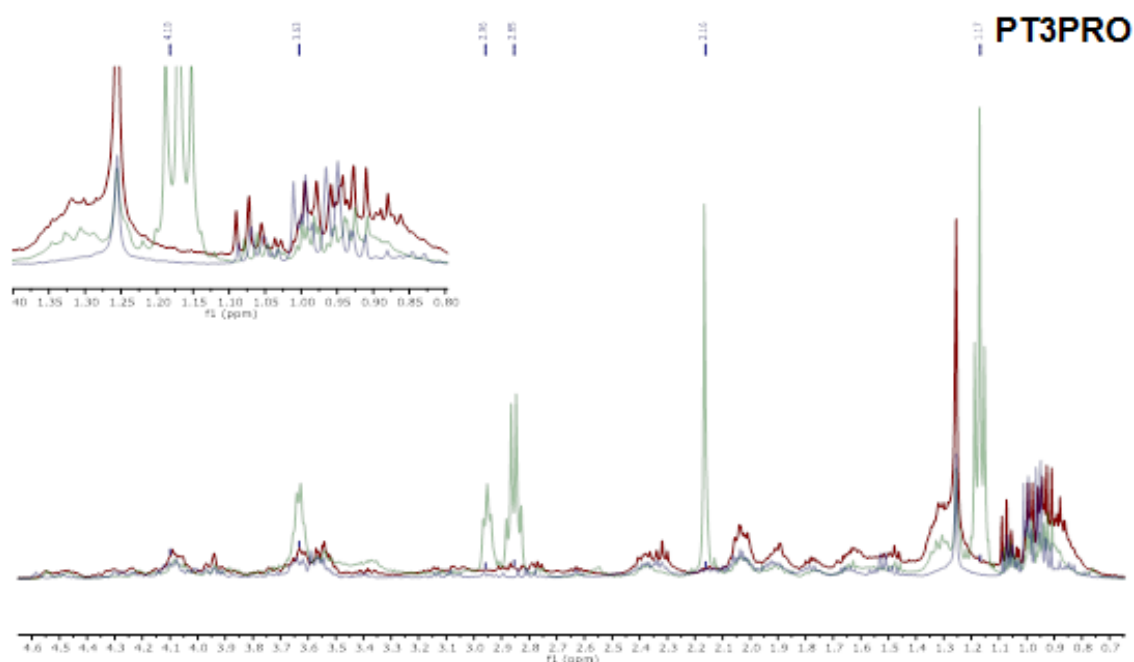
O espectro de RMN de ^1H do extrato contendo os metabólitos produzidos por *P. tanzanicum* na presença de procainamida (PTPRO) (Figura 14) apresenta várias diferenças em relação ao controle (PT), como sinais intensos em δ 2,2, 2,8, 2,9 e 3,7 ppm. Além disso, o perfil do espectro dos metabólitos produzidos por *P. tanzanicum* sob influência da procainamida possui os sinais intensos em δ 7,6, 7,8, 7,9 e 8,4 (Figura 17). Novos sinais também estão presentes na região de hidrogênios envolvidos em ligação de hidrogênio (12,6 a 13,6 ppm) e na região de hidrogênios aromáticos (5,6-7,7 ppm) (Figura 17). Tudo isso indica que a procainamida pode ter induzido o *P. tanzanicum* à produção de novos metabólitos aromáticos. Os sinais entre δ 12,3 e 13,5 podem indicar a presença de grupos hidroxila quelados, típicos de flavonoides como o kaempferol, por exemplo (LU e FOO, 1999).

Figura 17 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo procainamida (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com procainamida (em verde) e do *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3. Foram feitas ampliações das regiões entre 1,0 e 4,0 ppm, 6,0 e 9,5 ppm e entre 12,5 e 13,5 ppm. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.



Na região de hidrogênios alifáticos (Figura 18), também foram observados novos sinais, inferindo-se a produção de substâncias não-aromáticas ou de porções não-aromáticas nos novos metabólitos produzidos por indução epigenética da procainamida.

Figura 18 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos do controle do meio de cultura contendo procainamida (em azul), do *P. tanzanicum* em meio peptonado tratado com procainamida (em verde) e do *P. tanzanicum* em meio peptonado (metabolismo basal) (em vermelho) do experimento PT3. Foram feitas ampliações das regiões entre 0,7 e 4,6 ppm. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.



Desta forma, pôde-se verificar que houve alterações causadas pela adição dos moduladores e informações estruturais importantes foram obtidas utilizando ressonância magnética nuclear.

5.4 Conclusões

A utilização de moduladores epigenéticos foi eficiente para a produção de um *pool* de metabólitos secundários pelo fungo *P. tanzanicum*, conforme demonstrado pelos perfis cromatográficos por CLAE-UV-Vis e pelo aumento da capacidade antioxidante e atividade inibitória de acetilcolinesterase. Em meio peptonado contendo sais e sacarose, a adição do modulador epigenético hidralazina

induziu o *P. tanzanicum* à produção aumentada do metabólito basal ácido pulvilórico quando comparado com outros moduladores adicionados individualmente e com o controle (sem moduladores). Além disso, o extrato produzido pela influência deste modulador apresentou aumento da atividade antioxidante avaliada por três dos cinco ensaios realizados.

O extrato contendo os metabólitos elicitados pela procainamida demonstraram capacidade doadora de hidrogênio, evidenciado pelo aumento da capacidade de captura de DPPH e capacidade antioxidante total. A presença destas substâncias foi corroborada pela mudança do perfil do extrato por RMN, que indicou presença de compostos aromáticos e/ou compostos contendo hidroxilas queladas, compatível com flavonoides e outros compostos fenólicos reconhecidos como potentes antioxidantes.

O resultado do perfil pela análise de RMN evidenciaram que HID e AZA também produzem efeito na indução da produção de compostos aromáticos. Além disso, AZA aumentou a ação antioxidante (avaliada pelos ensaios de compostos fenólicos totais e flavonoides totais) e de inibição de acetilcolinesterase, bem como o modulador HID (aumentou o teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante total, captura de DPPH e inibição de acetilcolinesterase) em comparação com o extrato do fungo controle.

De forma geral, esse estudo demonstrou que nas condições avaliadas e na presença dos moduladores epigenéticos azacitidina, hidralazina e procainamida, *P. tanzanicum* foi capaz de aumentar sua produção de substâncias bioativas, o que pode ser útil para futuros trabalhos com aplicações biotecnológicas.

5.5 Referências bibliográficas

ARRUDA, G. L. D.; MORAES, G. K. A. D.; JUNIOR, A. F. C.; ARAUJO, A. R.; CHAPLA, V. M. Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2021.

AZIEANA, J.; ZAINON, M. N.; NORIHAM, A.; ROHANA, M. N. Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activities of ten malaysian wild mushrooms. **Open Access Library Journal**, v. 4, n.11, p. 1-9, 2017.

BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3009-3022, 2016.

BURSAL, E.; GÜLÇİN, I. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1482–1489, 2011.

CHEN, C.; TAO, H.; CHEN, W.; YANG, B.; ZHOU, X.; LUO, X.; LIU, Y. Recent advances in the chemistry and biology of azaphilones. **RSC Advances**, v. 10, n. 17, p. 10197-10220, 2020.

COTON, E.; COTON, M.; HYMERY, N.; MOUNIER, J.; JANY, J. L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59-73, 2020.

DENG, H.; BAI, Y.; FAN, T. P.; ZHENG, X.; CAI, Y. Advanced strategy for metabolite exploration in filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 180-198, 2020.

DWIBEDI, V.; KALIA, S.; SAXENA, S. Isolation and enhancement of resveratrol production in *Xylaria psidii* by exploring the phenomenon of epigenetics: using DNA methyltransferases and histone deacetylase as epigenetic modifiers. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 4, p. 4123-4137, 2019.

EL-HAWARY, S. S.; SAYED, A. M.; MOHAMMED, R.; HASSAN, H. M.; ZAKI, M. A.; RATEB, M. E.; ABDELMOHSEN, U. R. Epigenetic modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *Penicillium brevicompactum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 253, 2018.

EMWAS, A. H.; ROY, R.; MCKAY, R. T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D.; ALAHMARI, F.; JAREMKO, L.; JAREMKO, M; WISHART, D. S. NMR spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 123, 2019.

GAO, J. M.; YANG, S. X.; QIN, J. C.; Azaphilone: Chemistry and biology. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 7, p. 4755-4811, 2013.

GAO, X.; OHLANDER, M.; JEPSSON, N.; BJÖRK, L.; TRAJKOVSKI, V. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1485-1490, 2000.

GAO, Y.; STUHLREIER, F.; SCHMITT, L.; WESSELBORG, S.; GUO, Z.; ZOU, K.; PROKSCH, P. Induction of new lactam derivatives from the endophytic fungus *Aplosporella javeedii* through an OSMAC approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2796, 2020.

GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; PÉREZ-BONILLA, M.; PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J.; MUÑOZ, F.; REYES, F.; GENILLOU, T. O. Multicomponent analysis of the differential induction of secondary metabolite profiles in fungal endophytes. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 234, 2016.

JO, D. S.; PARK, N. Y.; CHO, D. H. Peroxisome quality control and dysregulated lipid metabolism in neurodegenerative diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1486-1495, 2020.

LIMA, M. T. N. S.; SANTOS, L. B.; BASTOS, R. W.; NICOLI, J. R.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 169-276, 2017.

LOTFY, M. M.; SAYED, A. M.; ABOULMAGD, A. M.; HASSAN, H. M.; EL AMIR, D.; ABOUZID, S. F.; MOHAMMED, R. Metabolomic profiling, biological evaluation of *Aspergillus awamori*, the river Nile-derived fungus using epigenetic and OSMAC approaches. **RSC Advances**, v. 11, n. 12, p. 6709-6719, 2021.

LU, Y.; FOO, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 1-8, 1999.

MACHADO, A. R.; MEDEIROS, F. S.; SOUZA FILHO, J. D. D.; SENA, M. M.; TERRA, W. C.; PIMENTA, L. P. NMR-Based Metabolomic Screening for Metabolites Associated with Resistance to *Meloidogyne javanica* in *Annona muricata* Roots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 6, p. 1276-1283, 2019.

MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010.

OLIVEIRA, G.; LOPES, B. O.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. P.; TAKAHASHI, J. A. Design of intelligent molecules as models for production of new anti-Alzheimer's medicines using epigenetic modulation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1561-1566, 2019.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 29, 2019.

POOLCHANUAN, P.; UNAGUL, P.; THONGNEST, S.; WIYAKRUTTA, S.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAR, S; KITTAKOOP, P. An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: how epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, 37, v. 6, 2019.

RAMOS, A. A.; CASTRO-CARVALHO, B.; PRATA-SENA, M.; MALHÃO, F.; BUTTACHON, S.; DETHOUP, T.; ROCHA, E. Can marine-derived fungus *Neosartorya siamensis* KUFA 0017 extract and its secondary metabolites enhance antitumor activity of doxorubicin? An *in vitro* survey unveils interactions against lung cancer cells. **Environmental Toxicology**, 35, v. 4, p. 507-517, 2020.

RESENDE, D. I.; BOONPOTHONG, P.; SOUSA, E.; KIJJOA, A.; PINTO, M. M. Chemistry of the fumiquinazolines and structurally related alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 1, p. 7-34, 2019.

SANDE, D.; COLEN, G.; DOS SANTOS, G. F.; FERRAZ, V. P.; TAKAHASHI, J. A. Production of omega 3, 6, and 9 fatty acids from hydrolysis of vegetable oils and animal fat with *Colletotrichum gloeosporioides* lipase. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 537-545, 2018.

SHANG, X. F.; MORRIS-NATSCHKE; S. L., LIU, Y. Q.; GUO, X.; XU, X. S.; GOTO, M.; LEE, K. H. Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 775-828, 2018.

SOUZA, C. O.; TEIXEIRA, A. A.; BIONDO, L. A.; SILVEIRA, L. S.; DE SOUZA BREDA, C. N.; BRAGA, T. T.; NETO, J. C. R. Palmitoleic acid reduces high fat diet-induced liver inflammation by promoting PPAR- γ -independent M2a polarization of myeloid cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 10, p. 158776, 2020.

SOUZA, C. O.; VANNICE, G. K.; ROSA NETO, J. C.; CALDER, P. C. Is palmitoleic acid a plausible nonpharmacological strategy to prevent or control chronic metabolic and inflammatory disorders? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 1, p. 1700504, 2018.

SU, J.; LIU, H.; GUO, K.; CHEN, L.; YANG, M.; CHEN, Q. Research advances and detection methodologies for microbe-derived acetylcholinesterase inhibitors: a systemic review. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 176, 2017.

TANG, J.; YANG, B.; YAN, Y.; TONG, W.; ZHOU, R.; ZHANG, J.; LI, D. Palmitoleic acid protects against hypertension by inhibiting NF- κ B-mediated inflammation. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 2001025, 2021.

VIEIRA, R.; SOUSA, K. A.; MONTEIRO, A. F.; PINTO, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Induction of metabolic variability of the endophytic fungus *Xylaria* sp. by OSMAC approach and experimental design. **Archives of Microbiology**, p. 1-8, 2021.

VISAGIE, C. M.; HIROOKA, Y.; TANNEY, J. B.; WHITFIELD, E.; MWANGE, K.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, p. 78, v. 63-139, 2014.

VISAGIE, C. M.; RENAUD, J. B.; BURGESS, K. M. N.; MALLOCH, D. W.; CLARK, D.; KETCH, L.; URB, M.; LOUIS-SEIZE, G.; ASSABGUI, R.; SUMARAH, M. W.; SEIFERT, K. A. Fifteen new species of *Penicillium*. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 36, p. 247, 2016.

XIE, C. L.; LIU, Q.; HE, Z. H.; GAI, Y. B.; ZOU, Z. B.; SHAO, Z. Z.; YANG, X. W. Discovery of andrastones from the deep-sea-derived *Penicillium allii-sativi* MCCC 3A00580 by OSMAC strategy. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, p. 104671, 2021.

YANG, ZH; MIYAHA, H.; HATANAKA, A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids Health Disease**, v. 10, p. 120, 2011.

YU, X.; GAO, Y.; FRANK, M.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; MÜLLER, W. E.; PROKSCH, P. Induction of ambuic acid derivatives by the endophytic fungus *Pestalotiopsis lespedezae* through an OSMAC approach. **Tetrahedron**, v. 79, p. 131876, 2021.

ZĄBEK, A.; KLIMEK-OCHAB, M.; JAWIEŃ, E.; MŁYNARZ, P. Biodiversity in targeted metabolomics analysis of filamentous fungal pathogens by ¹H NMR-based studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 1-12, 2017.

ZARROUK, A.; VEJUX, A.; NURY, T.; EL HAJJ, H. I.; HADDAD, M.; CHERKAOUI-MALKI, M.; RIEDINGER, J.; HAMMAMI, M.; LIZARD, G. Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22: 0, C24: 0, or C26: 0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-15, 2012.