

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Prospecção de Produtos Naturais de Fungos Endofíticos de *Bromelia balansae*  
Mez

FERNANDA MOTTA RIBEIRO DA SILVA

Campo Grande - MS

2023

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Prospecção de Produtos Naturais de Fungos Endofíticos de *Bromelia balansae*  
Mez

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientada: Fernanda Motta Ribeiro da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Denise Brentan da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Gecele Matos Paggi

Campo Grande - MS

2023



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



ATA DE DEFESA DE DOUTORADO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, às treze horas e trinta minutos, por videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Denise Brentan da Silva (UFMS), Cecília Veronica Nunez (INPA), Fernanda Oliveira das Chagas (UFRJ), Kely de Picoli Souza (UFGD) e Maria Rita Marques (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: FERNANDA MOTTA RIBEIRO DA SILVA, CPF 05582116745, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "Prospecção de Produtos Naturais de Fungos Endofíticos de Bromelia balansae Mez" e orientação de Denise Brentan da Silva. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

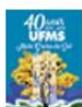
EXAMINADORES

Dra. Denise Brentan da Silva (Presidente)  
Dr. Carlos Alexandre Carollo (Interno) (Suplente)  
Dra. Cecília Veronica Nunez (Externo)  
Dr. Edson dos Anjos dos Santos (Interno) (Suplente)  
Dra. Fernanda Oliveira das Chagas (Externo)  
Dra. Kely de Picoli Souza (Externo)  
Dra. Maria Rita Marques (Interno)

RESULTADO FINAL: Aprovação

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Campo Grande, 31 de março de 2023.



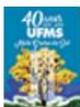
Documento assinado eletronicamente por **Denise Brentan da Silva**,  
**Professora do Magistério Superior**, em 03/04/2023, às 17:17, conforme  
horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do  
[Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

06/04/2023, 14:37

SEI/UFMS - 3968067 - Ata



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Oliveira das Chagas, Usuário Externo**, em 04/04/2023, às 11:03, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cecilia Veronica Nunez, Usuário Externo**, em 04/04/2023, às 16:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **KELY DE PICOLI SOUZA, Usuário Externo**, em 05/04/2023, às 22:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita Marques, Professora do Magistério Superior**, em 06/04/2023, às 14:10, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3968067** e o código CRC **50BCBF38**.

### COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Av. Costa e Silva, s/n

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.019835/2022-94

SEI nº 3968067

Dedico esse trabalho ao meu marido, Filipe Cavalcante de Lima Santos, pelo amor, cumplicidade, apoio e incentivo, na minha vida e em todas as etapas de realização desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria condições de ter sido realizado sozinho, contei com o apoio intelectual, financeiro, laboral, espiritual e com a amizade de várias pessoas dentro e fora do ambiente acadêmico, que foram essenciais no meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de realizar o doutorado e me sustentado em todos os momentos.

Ao meu marido, Filipe Cavalcante, por ter acreditado no meu potencial e me incentivado.

À minha mãe e aos meus sogros por todo amor, incentivo e suporte.

À Profa. Dra. Denise Brentan pela oportunidade de trabalhar no seu grupo e pelos ensinamentos proporcionados durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Gecele Matos Paggi por ter me acolhido desde o meu primeiro dia em Corumbá e ter me incentivado, apoiado antes e durante todo o doutorado.

Ao prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo por todas as valiosas discussões, auxílios e incentivos.

Às professoras do CPAN/UFMS, Dra. Marivaine Brasil e Dra. Luci Zanata, por me permitirem o acesso aos seus laboratórios, muito obrigada pela gentileza em todos os momentos que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), em especial Caroline Moura e Luana Bonifácio, obrigada por terem confiado em mim e segurado a minha mão quando eu mais precisei.

Aos amigos e técnicos dos laboratórios do CPAN, em especial a Thianny Viana por todo companheirismo durante esse tempo, principalmente na época da pandemia.

Aos colegas, professores, técnicos da UFMS, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram nesta etapa da minha formação como pesquisadora.

À UFRJ por ter cedido a licença, um dia eu volto para “casa”.

## RESUMO

Os fungos são produtores de metabólitos com elevada diversidade e complexidade estrutural e que são potencialmente bioativos. Os afloramentos rochosos (AR) que ocorrem na região da borda oeste do Pantanal Sul-matogrossense, Brasil, são locais inóspitos, por isso acredita-se que as espécies vegetais que existem neste local podem estar adaptadas e em simbiose com microrganismos que ajudam o seu sistema de defesa. O presente trabalho teve como objetivo a bioprospecção de metabólitos bioativos de fungos endofíticos de *Bromelia balansae* Mez, coletada em AR do Pantanal. Foram isolados 61 fungos endofíticos, sendo que dez foram identificados molecularmente, entre os quais foram identificados os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Daldinia* e *Neodeighonia*. Os isolados foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e em caldo batata dextrose, os extratos orgânicos obtidos deste cultivo foram avaliados em bioensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana, antibiofilme, antileishmania e citotóxica. Destes, 25 endófitos apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* com CIM (concentração inibitória mínima)  $\leq 500$   $\mu\text{g/mL}$ , sendo que 12 destes apresentaram CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$ . Nenhum dos microrganismos isolados foi promissor frente a *Pseudomonas aeruginosa*. No ensaio com *Leishmania infantum* quatro cepas apresentaram índice de infecção menor que 15 % em relação ao controle. Na avaliação da citotoxicidade frente as linhagens leucêmicas, Kasumi e KG-1, cinco isolados inibiram mais que 90% do crescimento celular na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . O isolado 5MP2F4, identificado como *Penicillium* sp., apresentou CIM de 32  $\mu\text{g/mL}$  frente a *S. aureus*, e por isso, este foi selecionado para um estudo utilizando a estratégia OSMAC, triagem antibacteriana e antibiofilme, com aplicação da metabolômica, análises estatísticas e construção de rede molecular para determinação de possíveis metabólitos bioativos e compreensão do perfil químico do fungo. Neste experimento, os extratos obtidos apresentaram diferentes perfis químicos e potencial antimicrobiano. Diversos metabólitos foram anotados, dentre eles diferentes brasilamidas, verruculogeno, fumitremorgina, ácido penicílico, viridicatum toxina A e espirohexalina. Foi realizado também um estudo de otimização da extração de micélios fúngicos do isolado 5MP2F4, utilizando extração acelerada por solvente (ASE), e a viridicatum toxina A (VRA) foi purificada a partir desta metodologia. VRA foi avaliada quanto a sua atividade anti-leishmania, antibiofilme e citotóxica frente as linhagens de células leucêmicas e seu mostrou promissora em todos os experimentos. Os isolados fúngicos de *B. balansae* ampliaram o conhecimento da biodiversidade de endófitos do Pantanal. Foram encontradas diversas substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, algumas foram produzidas em teores elevados conforme a variação do meio de cultivo, e os bioensaios nos sugerem que estas possuem potencial como antibióticos e citotóxicos.

Palavras-chave: antibacterianos, antibiofilme, anticâncer, antileishmania, extração acelerada por solvente, metabolômica, OSMAC, Pantanal.

## ABSTRACT

Fungi biosynthesize metabolites with high diversity and structural complexity that are potentially bioactive. The rocky outcrops occur in the region of the western edge of the Pantanal Sul-mato-grossense, Brazil, which are inhospitable places, their plant species may be adapted for these locals and the symbiosis with microorganisms can help their defense system. The present work aimed to bioprospect for bioactive metabolites from the endophytic fungi of *Bromelia balansae* Mez, collected in Pantanal RA. Sixty-one endophytic fungi were isolated and ten were molecularly identified, among them the genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Daldinia* and *Neodeighonia*. The isolates were grown in potato-dextrose agar medium (BDA) and in potato dextrose broth. The organic extracts obtained from these cultures were evaluated in vitro bioassays of antimicrobial, antibiofilm, antileishmania, and cytotoxic activity. Of these, 25 endophytes showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* with MIC (minimum inhibitory concentration)  $\leq 500$   $\mu\text{g/mL}$ , and 12 strains showed MIC  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$ . None of the microorganisms isolated was promising against *Pseudomonas aeruginosa*. In the *Leishmania infantum* assay, four strains had an infection rate lower than 15% compared to the control. In the cytotoxicity evaluation against leukemic lines, Kasumi and KG-1, five isolates inhibited more than 90% of cell growth at the concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . The isolate 5MP2F4, identified as *Penicillium* sp., showed MIC of 32  $\mu\text{g/mL}$  against *S. aureus*, and therefore, it was selected for a study using the OSMAC strategy, antibacterial and antibiofilm screening, with application of metabolomics, statistical analysis, and molecular networking to determine potential bioactive metabolites and understanding of the chemical profile of the fungus. In this experiment, the obtained extracts showed different chemical profiles and antibacterial activity. Several metabolites were annotated, among them different braziliamides, verrucologen, fumitremorgin, penicillic acid, viridicatum toxin A, and spirohexalin. An optimization study of extraction from fungal mycelia from the isolate 5MP2F4 by accelerated solvent extraction (ASE) was also performed, and viridicatum toxin A (VRA) was purified by this methodology. VRA was evaluated for the activities anti-leishmanial, antibiofilm, and cytotoxic against leukemic cell lines, and it showed to be active in all experiments. Fungal isolates of *B. balansae* have expanded knowledge of the endophyte biodiversity of the Pantanal. Several substances belonging to different chemical classes were found, some were produced in high levels according to the variation in the culture medium, and the bioassays suggest that they have potential as antibiotics and cytotoxics.

Keywords: antibacterial, antibiofilm, anticancer, antileishmania, accelerated solvent extraction, metabolomics, OSMAC, Pantanal.

## Sumário

1. Introdução e justificativa .....	1
2. Capítulo 1 - Revisão bibliográfica .....	5
2.1. Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos .....	6
3. Capítulo 2 - Objetivos .....	16
3.1. Objetivo geral .....	16
3.2. Objetivos específicos .....	16
4. Capítulo 3 - Isolamento dos fungos endofíticos de <i>B. balansae</i> e triagens biológicas .....	18
4.1 Introdução .....	18
4.1.1. Fungos endofíticos do Pantanal .....	18
4.1.2. <i>Bromelia balansae</i> Mez presente nos afloramentos rochosos do Pantanal .....	20
4.1.3. A resistência bacteriana e a busca por novos antibacterianos .....	24
4.1.4. Leishmaniose .....	27
4.1.5. Câncer .....	28
4.2. Objetivos do Capítulo 3 .....	30
4.3. Procedimento Experimental .....	31
4.3.1. Coleta e identificação do material vegetal .....	31
4.3.2. Preparo dos meios de cultivo de batata dextrose .....	32
4.3.2.1 Meio de cultivo caldo de batata dextrose (BD) .....	32
4.3.2.2 Meio de cultivo caldo de batata dextrose com ágar (BDA) .....	32
4.3.2.3 Meio de cultivo caldo de batata dextrose com ágar (BDA) com antibióticos para o isolamento dos fungos endofíticos .....	33
4.3.3. Isolamento dos microrganismos endofíticos .....	33
4.3.4. Preseruações dos microrganismos isolados .....	37
4.3.5. Cultivo e obtenção dos extratos brutos (EB) .....	37

4.3.5.1. Cultivo dos fungos e preparo dos EB de BDA.....	37
4.3.5.2. Cultivo dos fungos e preparo dos extratos brutosde sobrenadante (EBsob) e micélio (EBmic) do cultivo em de BD .....	38
4.3.6. Ensaio biológicos .....	38
4.3.6.1. Atividade antibiótica ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).....	38
4.3.6.1.1. Preparo do inóculo.....	38
4.3.6.1.2. Preparo das amostras.....	39
4.3.6.1.3. Preparo do reagente colorimétrico.....	39
4.3.6.1.4. Avaliação da atividade antibacteriana.....	40
4.3.6.2. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme .....	40
4.3.6.3. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antileishmania frente a <i>L. infantum</i> 41	
4.3.6.4. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	42
4.3.7. Identificação molecular de cepas selecionadas.....	43
4.3.8. Análises químicas de extratos por CLAE-DAD-EM .....	43
4.3.8.1. Preparo de amostras .....	43
4.3.8.2 Sistema de CLAE-DAD-EM .....	44
4.3.9. Análises por redes moleculares e anotação utilizando a plataforma GNPS .....	44
4.4. Resultados e discussão .....	45
4.4.1. Coleta e isolamento .....	45
4.4.2. Identificação dos fungos endofíticos por sequenciamento genético	48
4.4.3. Obtenção dos extratos orgânicos do cultivo em BDA, avaliações antibacterianas e antibiofilme .....	50
4.4.4 Obtenção dos extratos orgânicos de cultivo em meio líquido e avaliações antibacteriana e antibiofilme .....	55
4.4.5. Atividade <i>in vitro</i> antileishmania dos EB de fungos endofíticos frente a <i>L. infantum</i> .....	58

4.4.6. Avaliação da citotoxicidade frente a células leucemia .....	60
4.4.7 Análise do perfil químico do isolado 4IP2F1 <i>Aspergillus</i> sp.....	62
5. Capítulo 4 - Estratégias metabolômicas para melhorar as informações químicas de estudos OSMAC de fungos endofíticos .....	71
6. Capítulo 5 - Viridicatum toxina A, uma tetraciclina rara e bioativa, é eficientemente obtida de <i>Penicillium</i> sp através de extração acelerada por solvente (EAS) .....	120
7. Capítulo 6 - Conclusões .....	159
8. Referências Bibliográficas .....	162
9. Anexos .....	176
9.1 Fungos endofíticos isolados de <i>Bromelia balansae</i> .....	177
9.2. Licença de reprodução do capítulo 4 .....	189

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas

<i>ad hoc</i>	Destinado a essa finalidade
AcOEt	Acetato de etila
AIA	Ácido indol-3-acético
ASE	Extração acelerada por solvente (do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i> )
BD	Batata dextrose
BDA	Batata dextrose ágar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CIM	Concentração Inibitória mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo diodos e espectrometria de massas
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Extrato Bruto
EB BDA	Extrato bruto BDA
EBmic	Extrato Bruto de micélio
EBsob	Extrato Bruto de sobrenadante
EM/EM	Espectro de Massas <i>tandem</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IACG	<i>International Activities Coordination Group</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>

KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LC/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MO	Microrganismo
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NA	Não ativo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIST	<i>National Institute of Science and Technology</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OSMAC	<i>One Strain – Many Compounds</i>
PLL	Partição Líquido-Líquido
PN	Produtos naturais
SFB	Soro Fetal Bovino
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TR	Tempo de retenção
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatograph
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Espectro no Ultravioleta

## 1. Introdução e justificativa

A sociedade desenvolvida como vemos atualmente possui grandes desafios a serem resolvidos como, por exemplo, aqueles relacionados ao aparecimento de novas doenças que afetam a vida terrestre, sejam essas doenças humana, animal ou vegetal (agricultura) e, em paralelo, existe a constante demanda pelo aumento da produção global de alimentos (ROHR et al., 2019). Além disso, existe uma preocupação com o desenvolvimento sustentável do futuro do planeta, pensando nisso, a ONU estabeleceu uma agenda global que conta com metas e objetivos a serem alcançados até 2030, e para conseguir atingir essas metas foi estruturado um plano de ação contendo 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (**Figura 1**) (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, [s.d.]).

**Figura 1** - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) a serem atingidos até 2030 (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, [s.d.]).



Fonte: (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, [s.d.]).

A pesquisa de produtos naturais (PN) pode auxiliar a alcançar os ODS de várias maneiras, porque ela é um dos pilares para o desenvolvimento da ciência, tecnologia e inovação de um país para diferentes áreas. Os PN são substâncias produzidas por organismos vivos (SOROKINA; STEINBECK, 2020). Esses metabólitos provenientes de plantas, animais e microrganismos são as principais

fontes de busca por substâncias para a solução de patologias que a sociedade enfrenta. Notadamente, aproximadamente metade dos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), no período entre janeiro de 1981 a setembro de 2019, são PN e seus derivados, produtos sintéticos idênticos ou inspirados em PN. Esses levantamentos demonstram a significativa contribuição desta classe de substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos (ATANASOV et al., 2021; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Dentre as fontes de substâncias naturais tem-se os fungos, diversas espécies deles são encontradas no solo, ar, matéria orgânica, ambientes aquáticos e em associação simbiótica com outros organismos, como animais e plantas (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

O estudo sobre a capacidade biotecnológica de microrganismos como, por exemplo, a prospecção de fungos, pode ajudar a alcançar diretamente alguns ODS, dentre eles merecem o destaque: ODS 2 - Eliminar a fome e promover a segurança alimentar, através do uso de microrganismos na agricultura sustentável, como promotores de crescimento vegetal e biofertilizantes melhorando o desempenho do plantio, otimizando a silvicultura e combatendo pragas que afetam a produtividade (CHITNIS et al., 2020). Essas aplicações podem impactar diretamente os ODS 8 - Trabalho decente e crescimento econômico, e o ODS 9 - Indústria, Inovação e Infraestrutura. O uso de fungos também pode levar ao desenvolvimento de fármacos e bioprodutos, tais como pigmentos, biocombustíveis e cosméticos naturais, além de ser um trabalho de preservação e conhecimento da vida terrestre e aquática (HYDE et al., 2019), englobando os ODS 12 - Consumos e Produção Responsáveis, e o ODS 15 - Proteger, restaurar e promover o uso sustentável da terra.

Tendo em vista que as espécies vegetais do Pantanal foram escassamente estudadas em relação aos seus microrganismos simbiotes, selecionamos para o desenvolvimento deste trabalho *Bromelia balansae*, uma espécie amplamente encontrada em afloramentos rochosos que ocorrem na borda oeste do Pantanal em Corumbá-MS, conhecidas como cangas, devido ao seu alto teor de ferro (TAKAHASI; MEIRELLES, 2014). Esses locais são preservados e possuem pouca disponibilidade de nutrientes e alta incidência solar.

Aqui buscaremos compreender se os fungos endofíticos que coexistem com *B. balansae* que ocorre em cangas do Pantanal, possuem o potencial de produção de produtos naturais estruturalmente diversos e possivelmente bioativos. Associando o uso de estratégias metabolômicas para auxiliar nas informações obtidas dos ensaios de OSMAC (*One Strain Many Compounds*), o que é uma forma de minimizar o uso de reagentes e tempo. Além de contribuir com a sociedade para alcançar os ODS 9 e 15.

Apesar da metabolômica ser amplamente usada para o estudo em sistemas biológicos, como urina, fezes e sangue na busca por biomarcadores para doenças, ela ainda é escassamente aplicada para estudos sobre a compreensão da capacidade química de microrganismos, principalmente fungos endofíticos. Entretanto, todos os estudos que serão mostrados aqui revelam que ela é uma técnica bastante promissora para essa visão holística de variações produzidas por microrganismos utilizando as mais diversas estratégias, incluindo OSMAC.

Assim, a presente tese foi organizada na forma de cinco capítulos e engloba os seguintes temas:

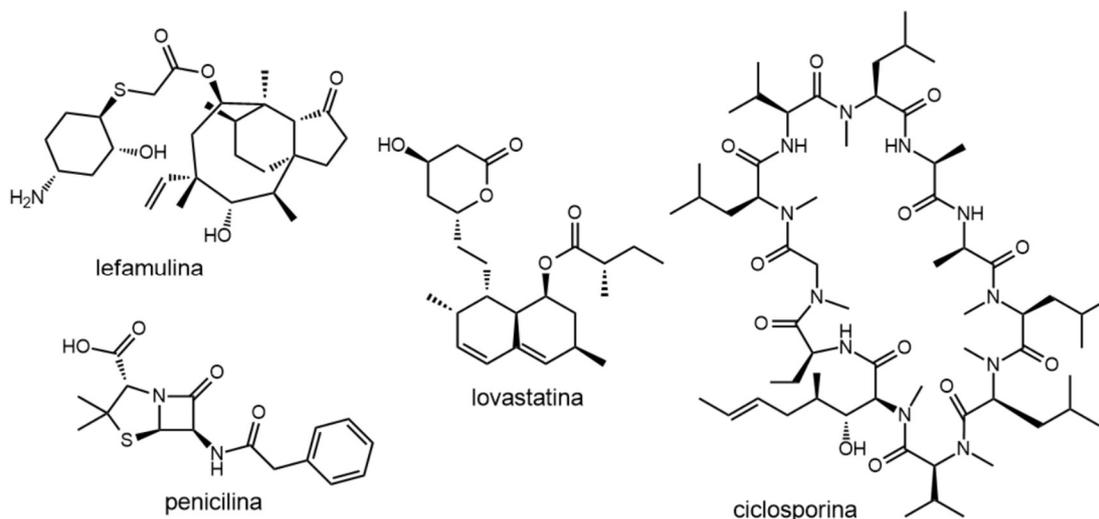
- Capítulo 1: Revisão bibliográfica sobre o estudo de produtos naturais provenientes de fungos, em especial fungos endofíticos.
- Capítulo 2: Objetivos da tese.
- Capítulo 3: Isolamento dos fungos endofíticos de *Bromelia balansae* Mez, a produção de extratos orgânicos dos isolados e os ensaios de triagem biológica com esses extratos.
- Capítulo 4: Estudo químico realizado com a cepa isolada de *Penicillium* sp. com aplicação de estratégias metabolômicas para melhorar as informações químicas de estudos OSMAC de fungos endofíticos.
- Capítulo 5: Isolamento de viridicatum toxina A utilizando extração acelerada por solvente e ampliação de suas avaliações biológicas.
- Capítulo 6: Conclusões.

# *Capítulo 1*

## 2. Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

Os fungos são uma fonte promissora para a obtenção de novas biomoléculas com ação frente a doenças humanas e animais, tais como, infecções bacterianas e câncer (DESHMUKH et al., 2022; GAKUUBI et al., 2021; GUPTA et al., 2019). Alguns exemplos de estruturas químicas de substâncias utilizadas na terapêutica de origem fúngica são ilustrados na **Figura 2**. Dentre eles, destacam-se a penicilina (primeiro antibiótico obtido a partir de fungos em 1928 por Fleming), a lovastatina (utilizada no tratamento de hipercolesterolemia produzida em cepas de *Aspergillus terreus*) (MULDER et al., 2015), e a ciclosporina (fármaco imunomodulador utilizado clinicamente na prevenção da rejeição em transplante de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes e, isolado inicialmente de uma cepa de *Tolypocladium inflatum*) (SVARSTAD; BUGGE; DHILLION, 2000). Outro exemplo recente é a lefamulina, um antibiótico semissintético derivado do fungo *Pleurotus mutilus*, da classe das pleuromutilinas, que foi aprovado em 2019 pelo FDA. A lefamulina atua, contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (MERCURO; VEVE, 2020). Assim, todos esses apontamentos ressaltam que o arsenal biossintético dos fungos é valioso para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos.

**Figura 2** - Exemplos de substâncias isoladas ou derivadas de fungos que são utilizadas na terapêutica.



## 2.1. Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos

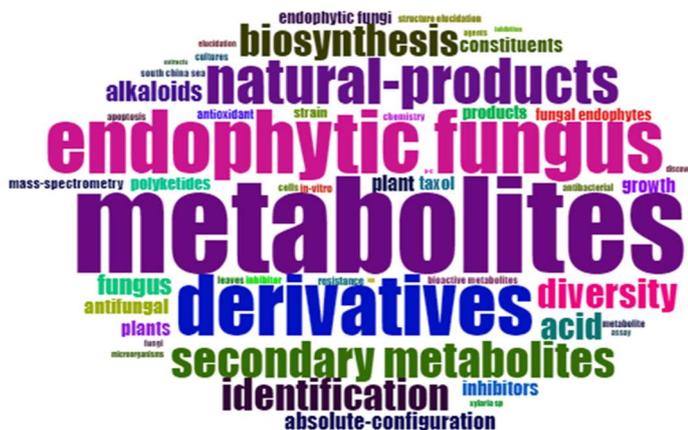
Os fungos estão abundantemente presentes na natureza e diversos estudos tentam traçar e propor um racional de ecologia química sobre a associação desses microrganismos com os seus hospedeiros (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Dentre os fungos que possuem associação positiva com plantas, temos rizosféricos, micorrízicos, os epifíticos e os endofíticos (CHAGAS et al., 2018).

Os fungos endofíticos, termo descrito inicialmente por Bary em 1866, são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar sintomas aparentes de doenças (BOGAS et al., 2022). Na literatura ainda não é clara a diferença entre microrganismos patogênicos e endofíticos. Todavia, a maioria dos microrganismos patogênicos produz substâncias prejudiciais causando danos à planta hospedeira. Enquanto os fungos endofíticos são caracterizados por não causarem qualquer dano visível em seu hospedeiro e geralmente estão associados com a modulação das vias e com a produção de metabólitos que podem atuar na defesa química contra predadores e patógenos, no metabolismo da planta ou no aumento da tolerância a estresses abióticos, bem como na produção de fito-hormônios e outros (FADIJI; BABALOLA, 2020; SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019). Relatos recentes da literatura descrevem que estes podem também coproduzir, induzir e/ou modificar diversos metabólitos, dentro ou fora das plantas hospedeiras (SINGH et al., 2021).

Visando compreender o estado da arte do estudo sobre PN de fungos endofíticos, realizamos uma revisão da literatura com enfoque nas produções científicas sobre fungos endofíticos e técnicas analíticas aplicadas nas análises e realizamos análises bibliométricas com a ferramenta do pacote *Bibliometrix R*, avaliando a literatura relevante sobre este tema (ARIA; CUCCURULLO, 2017). Para tal finalidade, realizamos buscas na base de dados do *Web of Science* utilizando as seguintes palavras chaves: “*endophytic fungus*” ou “*endophytic fungi*” e “hplc” ou “nmr” ou “MS/MS” ou “MS” ou “LC/MS” combinando os resultados obtidos e removendo as duplicatas, chegamos ao número de 1.989 documentos publicados com estes termos no período de 1990 a 2023. Estas publicações incluem artigos em revistas científicas, patentes, trabalhos em conferências, dentre outros.

A nuvem de palavras identifica os termos com maior incidência nos títulos e das palavras chaves dos trabalhos selecionados na revisão, destacando-os pelo tamanho e cor da fonte. Como pode ser observado, na **Figura 3**, pelas palavras com maior destaque “*metabolites*”, “*endophytic fungus*”, “*derivatives*” e “*natural-products*” as publicações selecionadas em nossa busca estão de acordo com o esperado, cuja principal discussão temática dos trabalhos é o estudo de metabólitos de fungos endofíticos.

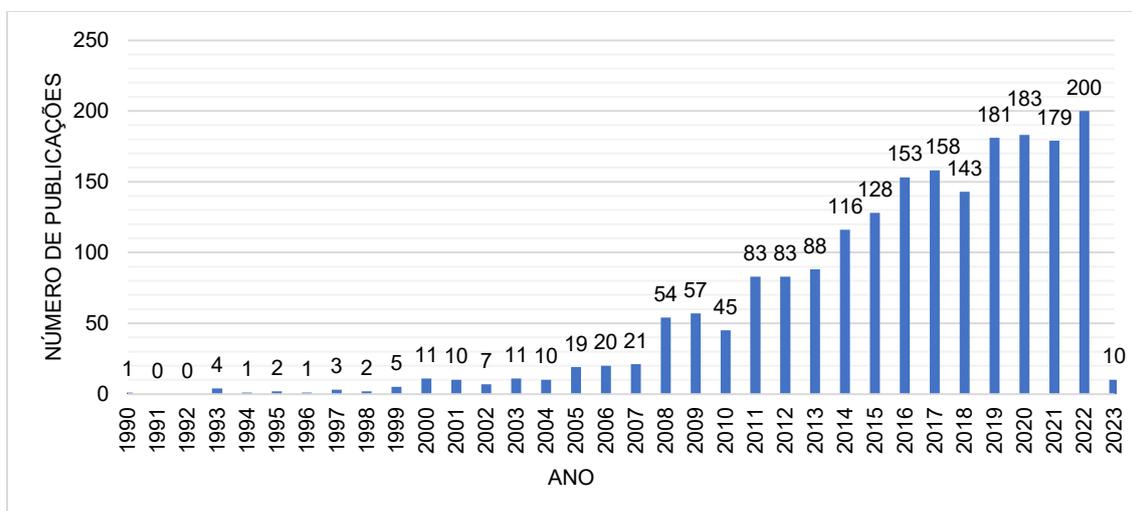
**Figura 3** - Nuvem de palavras com os termos com maior incidência, dos títulos e das palavras-chave, das publicações provenientes da busca com os termos: “*endophytic fungus*” ou “*endophytic fungi*” e “*hplc*” ou “*nmr*” ou “*MS/MS*” ou “*MS*” ou “*LC/MS*” no período de 1990 a 2023, da base de dados do *Web of Science*.



Fonte: Elaborado pela autora extraído do pacote *Bibliometrix R*.

Com a evolução das técnicas analíticas e de biologia molecular, o número de publicações nesta área vem crescendo, principalmente na última década, como pode ser observado na **Figura 4**, que ilustra o número de publicações científicas sobre o estudo de PN provenientes de fungos endofíticos por ano. Porém, esse número ainda é muito baixo, considerando o número de espécies de plantas conhecidas mundialmente, que atualmente é de aproximadamente 400.000 espécies (LUGHADHA et al., 2016). Estima-se que apenas 0,75–1,5 % das espécies vegetais que são conhecidas já tiveram seus endófitos estudados, sendo assim, a oportunidade de encontrar novas espécies e novos metabólitos bioativos provenientes de fungos endofíticos é promissora (SINGH et al., 2021).

**Figura 4** - Número de publicações científicas sobre produtos naturais (PN) de fungos endofíticos por ano. Dados provenientes da busca com os termos: “endophytic fungus” ou “endophytic fungi” e “hplc” ou “nmr” ou “MS/MS” ou “MS” ou “LC/MS” no período de 1990 a 2023, da base de dados do *Web of Science*.



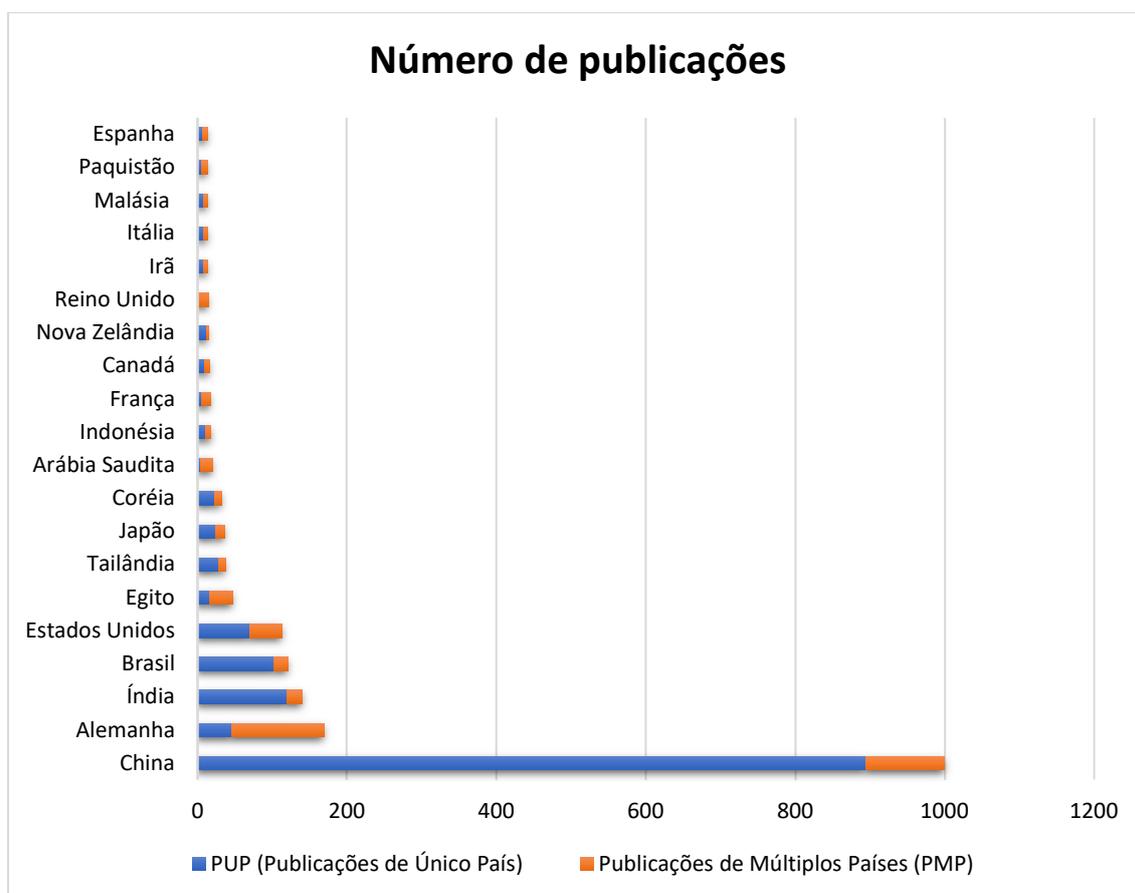
Fonte: Elaborado pela autora extraído do pacote *Bibliometrix R*.

Ao analisarmos o número de publicações por “País do Autor Correspondente”, dado em que cada artigo é associado a um único país com base na afiliação do autor correspondente (barra azul da **Figura 5**, que corresponde a Publicações de Único País - PUP), observamos que a China é responsável por 62 % das publicações de PUP, enquanto o Brasil ocupa a terceira posição sendo responsável por 7% das publicações de PUP. Nesta análise podemos calcular também a proporção de artigos em que há pelo menos um autor com afiliação em um país diferente daquele do autor correspondente, este índice é chamado de Publicações de Múltiplos Países - PMP (**Figura 5**, barra laranja), dentre os países que tiveram as maiores taxas de colaboração estão Alemanha, China, Estados Unidos, Egito, Índia e o Brasil.

Visando compreender essa inter-relação entre as publicações e os países, realizamos também a análise sobre a produção científica dos países, no qual cada artigo é atribuído aos países de todos os seus co-autores e, portanto, serão contabilizados quantas vezes houver autores de diferentes nacionalidades. Na **Figura 6** é possível observar o fluxo da distribuição geográfica mundial das colaborações entre os países (linhas laranjas) e o número de publicações conforme a coloração (variando de azul intenso para

países que possuem alta taxa de publicação, e nas tonalidades mais claras os que possuem menor número de publicações). A Alemanha, por exemplo, é o país que mais possui PMP, sendo 124 publicações com 44 países, o segundo país é a China que colaborou em um total de 105 trabalhos com 39 países. O Brasil colaborou com 11 países em um total de 21 publicações.

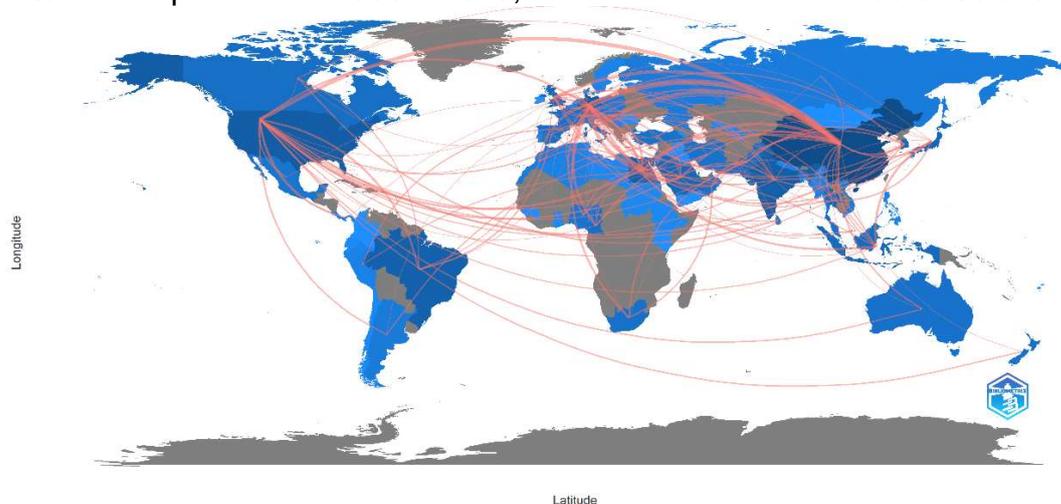
**Figura 5** - Número de publicações por país de acordo com o autor correspondente da publicação. Dados provenientes da busca com os termos: “endophytic fungus” or “endophytic fungi” and “hplc” ou “nmr” ou “MS/MS” ou “MS” ou “LC/MS” no período de 1990 a 2023, da base de dados do *Web of Science*.



Fonte: Elaborado pela autora extraído do pacote *Bibliometrix R*.

As maiores taxas de frequência em que ocorreram as colaborações entre países pode ser observada na **Tabela 1**. A China e a Alemanha colaboraram entre si em um total de 97 publicações, o que demonstra grande articulação entre esses países. O Brasil teve maior frequência de colaboração com os Estados Unidos, totalizando 10 publicações.

**Figura 6** - Fluxo da distribuição geográfica mundial de colaboração nas publicações com dados provenientes da busca com os termos: “endophytic fungus” or “endophytic fungi” and “hplc” ou “nmr” ou “MS/MS” ou “MS” ou “LC/MS” no período de 1990 a 2023, da base de dados do *Web of Science*.



Fonte: Elaborado pela autora extraído do pacote *Bibliometrix R*.

**Tabela 1** - Frequência de colaborações entre países

<b>País de origem</b>	<b>País da colaboração</b>	<b>Frequência</b>
China	Alemanha	97
Alemanha	Hungria	44
Alemanha	Egito	40
China	Hungria	39
China	Estados Unidos	38
Egito	Arábia Saudita	33
China	Egito	26
China	Reino Unido	25
Alemanha	Camarões	21
Paquistão	Omã	16
Egito	Reino Unido	15
Estados Unidos	Egito	15
Alemanha	Itália	14
Egito	Hungria	13
Japão	Indonésia	13
Alemanha	Indonésia	12
Alemanha	Paquistão	12
Alemanha	Estados Unidos	12
China	Arábia Saudita	11
Alemanha	Omã	11
Alemanha	África do Sul	11
Brasil	Estados Unidos	10

Os dados encontrados na nossa revisão estão de acordo com o relatado por Rustamova e colaboradores (2020), no qual foram selecionados 150 artigos publicados entre janeiro de 2018 e junho de 2019 que estudaram PN produzidos por fungos endofíticos, sendo discutidos os aspectos de 221 novos metabólitos secundários isolados destes fungos e suas propriedades biológicas. Neste trabalho, a China foi destacada como responsável por gerar 79% das publicações e o Brasil apenas 3% nesta área. Dentre os gêneros fúngicos de maior ocorrência neste levantamento estão *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Talaromices*, *Xilaria* e *Diaporthe* (RUSTAMOVA et al., 2020).

O perfil genético da comunidade de fungos endofíticos sofre influência das condições ambientais e das áreas geográficas de ocorrência (TAN; ZOU, 2001). O cenário nacional sobre as publicações de fungos endofíticos foi recentemente descrito por Ribeiro e colaboradores (2021) a partir de levantamentos de publicações no banco de dados *Chemical Abstracts*, descrevendo a diversidade química de metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos brasileiros relatados na literatura até junho de 2019. Foram compiladas 303 substâncias provenientes de 60 cepas fúngicas. Dentre as bioatividades descritas, aquelas de maior ocorrência foram antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e citotóxica. Dentre as classes de substâncias químicas descritas, as mais relevantes foram terpenos, fenólicos e alcaloides (RIBEIRO et al., 2021).

Savi e colaboradores (2019) descreveram uma listagem de fungos endofíticos estudados no Brasil no período de 2012 a 2017, nos trabalhos avaliados foram estudados os endófitos de 54 espécies de plantas, sendo encontrados 300 gêneros de endófitos, cujos dados estão descritos em 67 publicações (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019).

O Brasil é um país mega-biodiverso (BERLINCK et al., 2017) e detém boa parte da biodiversidade mundial de plantas, sendo considerado uma fonte inestimável de matérias-primas para as mais diversas finalidades (BEZERRA; DA SILVA; DE SOUZA-MOTTA, 2019). Atualmente, segundo o projeto Flora e Funga do Brasil (2023), possuímos em torno de 50.000 espécies (nativas, naturalizadas e cultivadas). Levando em consideração que alguns microrganismos endofíticos são geralmente descritos como hospedeiro-específicos e que normalmente cada espécie vegetal tem uma variabilidade de

endófitos a ela relacionados (STROBEL; DAISY, 2003), o número de trabalhos na literatura é ainda muito pequeno e o Brasil é uma grande fonte para a descoberta de novas espécies ainda não exploradas.

Existem diversas vantagens da prospecção química de metabólitos fúngicos, em relação a outras fontes como, por exemplo, plantas e insetos, pois os fungos podem ser cultivados em larga escala (em biorreatores), o seu crescimento pode ser realizado em meios de cultura de baixo custo, além de poderem produzir grandes quantidades de metabólitos sem necessidade de grandes áreas de cultivo, o que pode ser economicamente viável e mais sustentável (GUPTA et al., 2019).

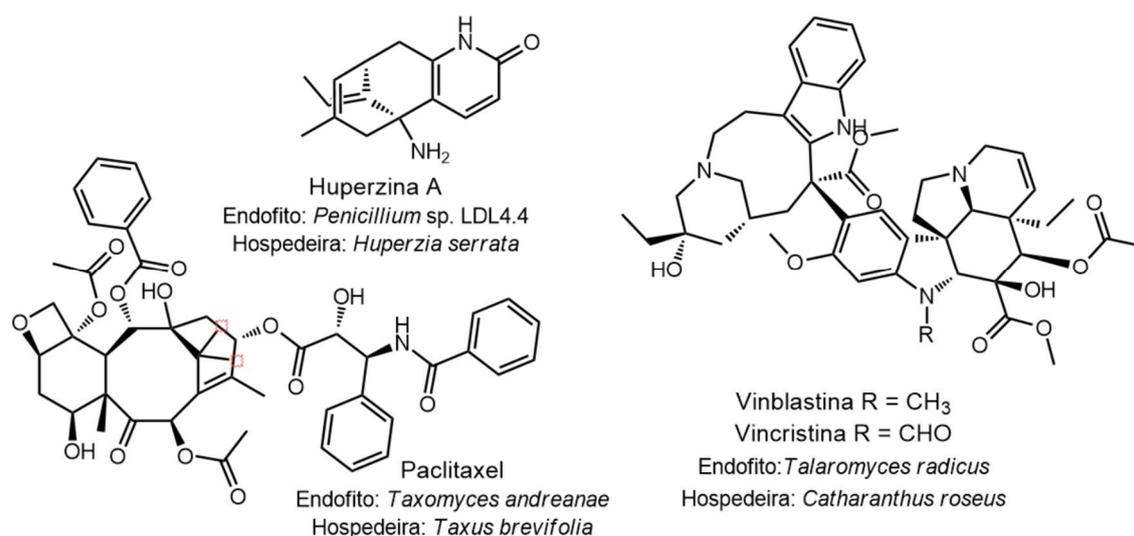
O isolamento dos endófitos é costumeiramente realizado utilizando uma desinfecção superficial do tecido vegetal e plaqueamento do mesmo em meio de crescimento adequado para fungos, normalmente na presença de agentes antibacterianos para prevenir a proliferação de bactérias endofíticas. Algumas características devem ser levadas em consideração na hora do isolamento, dentre elas: local da coleta, coleta de várias partes da planta ou partes de diversas idades, época da coleta, meio selecionado para o isolamento inicial, processo de assepsia da superfície dos tecidos vegetais, entre outras (GUPTA et al., 2019).

Os fungos endofíticos são produtores de diversas classes de compostos bioativos como, alcaloides, cumarinas, flavonoides, glicosídeos, lignanas, fenilpropanoides, quinonas, saponinas, terpenoides, policetideos, xantonas e compostos fenólicos (SINGH et al., 2021). Endófitos foram descritos na literatura com a capacidade de produzir metabólitos importantes que eram considerados produzidos apenas pelas plantas hospedeiras. Uma das descobertas iniciais foi a produção de paclitaxel (medicamento usado no tratamento do câncer) (**Figura 7**) a partir do endófito *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle & W.M. Hess, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae). Outras espécies de fungos endofíticos posteriormente foram relatadas na literatura como produtoras de paclitaxel, e algumas foram isoladas de espécies de plantas taxonomicamente diversas (EL-SAYED et al., 2020).

Diversos outros metabólitos de plantas, importantes para medicina, foram também relatados sendo produzidos por fungos endofíticos, alguns exemplos

estão ilustrados na **Figura 7** juntamente com a descrição da sua planta hospedeira. A huperzina A, por exemplo, é um alcaloide sesquiterpênico, inibidor de acetilcolinesterase e usado no tratamento da doença de Alzheimer (THI MINH LE et al., 2019). A vincristina e vinblastina são alcaloides indólicos e usados na terapêutica como antineoplásicos (THI MINH LE et al., 2019).

**Figura 7** - Exemplos de metabólitos produzidos por fungos endofíticos que são produzidos também por suas espécies hospedeiras.



Encontrar uma substância que nominalmente foi isolada de uma planta sendo produzida por um fungo é importante, uma vez que pode ajudar a compreender a rota de biossíntese desta substância, e ajudar a desenvolver o suprimento de substâncias clinicamente importantes e de alto valor, o que poderá facilitar o acesso da população (DALEY; CORDELL, 2021). Assim como pode levar ao isolamento de metabólitos semelhantes, seja um isômero ou derivado estrutural, que possuam bioatividades e propriedades melhores em comparação com aqueles isolados de suas respectivas hospedeiras.

Os fungos endofíticos também são produtores de uma grande diversidade de substâncias que podem ser inéditas, e o estudo deles é um enorme campo de pesquisa de PN que vem aumentando nos últimos anos. Como resultado, há um número substancial de trabalhos de revisão que compilaram os PN produzidos por fungos endofíticos, dentre eles temos, alcaloides (DALEY; CORDELL, 2021), xantonas (KHATTAB; FARAG, 2022) e terpenos (AMIRZAKARIYA; SHAKERI, 2022). Temos também diversas publicações com

o compilado de PN de fungos endofíticos com bioatividades como, antiviral (DOS SANTOS LACERDA; POLONIO; GOLIAS, 2022), antidiabética (AGRAWAL; SAMANTA; DESHMUKH, 2021), biofungicidas (KUMAR; KAUSHIK, 2012), citotóxica (UZMA et al., 2018) e antibacteriana (RADIĆ; ŠTRUKELJ, 2012; DESHMUKH et al., 2022). Todos esses trabalhos reforçam que os fungos endofíticos produzem um amplo arsenal de compostos bioativos, e que são uma importante e valiosa fonte de bioprospecção de substâncias com potencial farmacológico.

## *Capítulo 2*

### 3. Capítulo 2 - Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é realizar a prospecção de produtos naturais bioativos a partir de fungos endofíticos de *Bromelia balansae* Mez que ocorrem no Pantanal.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Isolar os fungos endofíticos associados às folhas de *B. balansae* que ocorrem nos afloramentos rochosos de Corumbá-MS na borda oeste do Pantanal;
- Fazer a identificação molecular das cepas isoladas;
- Avaliar a atividade antibacteriana, antibiofilme, citotóxica e antileishmania dos extratos brutos obtidos e selecionar as cepas promissoras;
- Avaliar os perfis químicos dos extratos das cepas promissoras por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM);
- Gerar redes moleculares e anotar os compostos presentes nos extratos das cepas selecionadas;
- Cultivar o isolado 5MP2F4 (*Penicillium* sp.) utilizando a estratégia *One Strain-Many Compounds* (OSMAC) e aplicar ferramentas metabolômicas e análises estatísticas a partir dos cultivos por OSMAC;
- Avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme dos extratos do isolado 5MP2F4 (*Penicillium* sp.) provenientes dos cultivos de OSMAC;
- Padronizar a extração dos micélios de uma cepa promissora selecionada 5MP2F4 (*Penicillium* sp.) por extração acelerada por solvente (EAS);
- Isolar e caracterizar os compostos selecionados.

## *Capítulo 3*

## 4. Capítulo 3 - Isolamento dos fungos endofíticos de *B. balansae* e triagens biológicas

### 4.1 Introdução

#### 4.1.1. Fungos endofíticos do Pantanal

O Pantanal é a maior planície alagável do mundo e está localizado na América do Sul, sendo que 78 % de sua extensão territorial está localizada no Brasil nos estados de Mato Grosso (35 %) e Mato Grosso do Sul (65 %). A região apresenta estações secas e chuvosas bem definidas e uma grande diversidade de espécies vegetais, que sofre influência também da inundação sazonal (TOMAS et al., 2019). Entretanto, estudos relacionados a fungos endofíticos provenientes de espécies do Pantanal ainda são escassos na literatura (GUBIANI et al., 2019; NORILER et al., 2018, 2019; SAVI et al., 2018), principalmente aqueles que visam o isolamento e caracterização de seus metabólitos secundários.

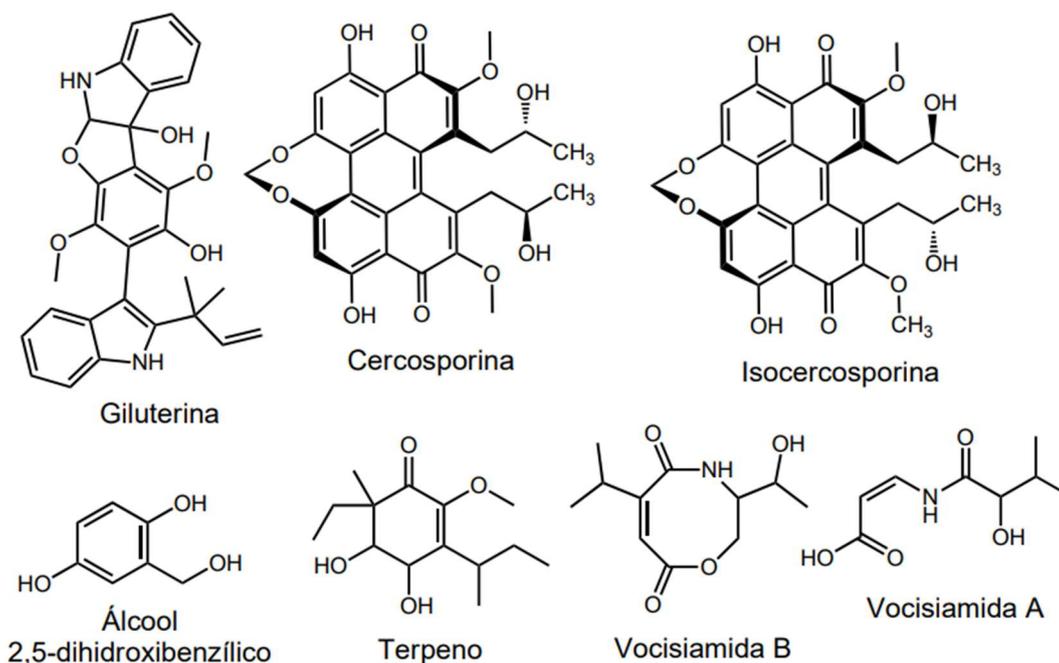
Os endófitos de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), coletados na região do Pantanal Sul-mato-grossense em Corumbá, foram os mais estudados até o momento e vem sendo descritos como uma fonte de metabólitos secundários com propriedades antifúngicas e antibacterianas (NORILER et al., 2018). O fungo endofítico *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. de *V. divergens* foi descrito como uma nova espécie e, a partir de seus extratos foram isolados os metabólitos: cercosporina, isocercosporina e um novo terpeno, o 3-(sec-butil)-6-etil-4,5-di-hidroxi-2-metoxi-6-metilciclo-hex-2-enona (**Figura 8**). A cercosporina e isocercosporina apresentaram citotoxicidade elevada frente a diferentes linhagens celulares com IC<sub>50</sub> de 2,82 µM para linhagem celular de câncer de pulmão (A549) e 0,42 µM para linhagem celular de câncer humano de próstata (PC3) para cercosporina, e IC<sub>50</sub> de 19,21 µM (A549) e 2,10 µM (PC3) para isocercosporina. Essas substâncias também apresentaram uma inibição moderada contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e atividade antifúngica contra o fitopatógeno cítrico *Phyllosticta citricarpa* (SAVI et al., 2018).

Vocisiamidas A e B, duas novas estruturas de carboxamidas, foram isoladas do endófito *Diaporthe vochysiae*, um novo endófito descrito de *V.*

*divergens*. Além destas, também foi isolado o metabólito conhecido álcool 2,5-dihidroxibenzílico (**Figura 8**). A vocisiamida B apresentou MIC de 80 µg/mL frente a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC), mas as atividades citotóxicas das demais substâncias foram baixas (NORILER et al., 2019).

*Aspergillus terreus* P63 foi isolado de raízes do capim *Axonopus leptostachyus*, coletado em Poconé, região do Pantanal de Mato Grosso. Esta cepa produziu um novo alcaloide indólico prenilado giluterrina (**Figura 8**) que apresentou potencial citotóxico frente a linhagens celulares de câncer de rim (786-0) com IC<sub>50</sub> de 23 µM e de próstata (PC-3) com IC<sub>50</sub> de 49 µM (GUBIANI et al., 2019).

**Figura 8** - Substâncias isoladas de fungos endofíticos provenientes do Pantanal.



Desta maneira, destacamos aqui o imenso e ainda inexplorado reservatório de diversidade química a partir de fungos endofíticos do Pantanal. Além de haver poucos estudos químicos e biológicos a partir deles, também ressaltamos que devido as características peculiares desse ecossistema com períodos de cheia e de seca, esses podem ser fatores de promoção da

diversidade microbiana com importância para a adaptação das espécies nesse bioma.

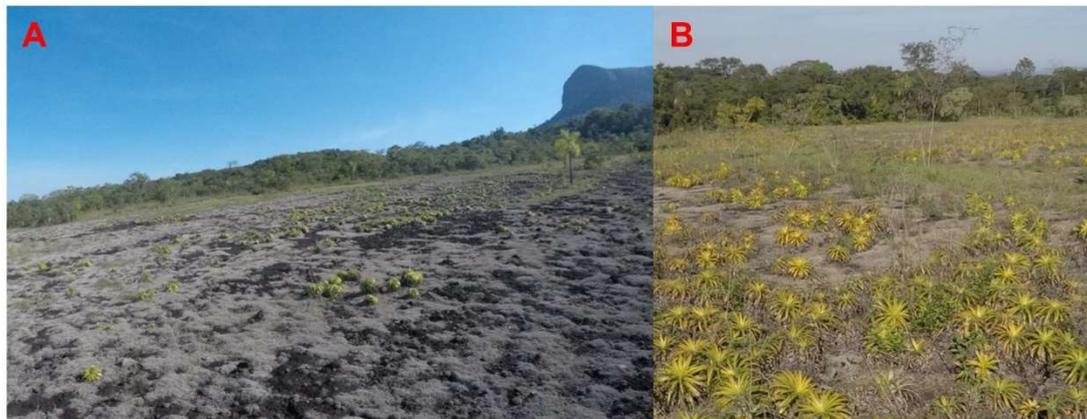
#### 4.1.2. *Bromelia balansae* Mez presente nos afloramentos rochosos do Pantanal

*Bromelia balansae* é uma espécie vegetal pertencente à família Bromeliaceae. Esta família é composta por 58 gêneros e cerca de 3.140 espécies que se encontram divididas em oito subfamílias (Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae) e são caracterizadas principalmente pela morfologia das flores, frutos, sementes e por dados moleculares (GIVNISH et al., 2011).

As bromélias são predominantemente neotropicais e, apesar do número elevado de espécies, poucas foram estudadas química e farmacologicamente até o momento (MANETTI; DEIAPORTE; LAVERDE, 2009). Exceto o *Ananas comosus* (popularmente conhecido como abacaxi) que é extensivamente utilizado como alimento e aplicado na medicina popular (DEBNATH; SINGH; MANNA, 2021), e diversos estudos realizados descrevem suas propriedades biológicas, como anti-inflamatória, digestivas, antioxidante, dentre outros benefícios para a saúde humana (MOHD ALI et al., 2020). Outra espécie que é usualmente empregada na medicina tradicional brasileira é a *Bromelia antiacantha*, popularmente conhecida como caraguatá, na qual seus frutos são usados na medicina popular para o tratamento de infecções respiratórias. Dentre as classes de compostos já descritos em Bromeliaceae, encontram-se triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, entre outros (MANETTI; DEIAPORTE; LAVERDE, 2009).

Algumas espécies de Bromeliaceae foram descritas em afloramentos rochosos ferruginosos (bancadas lateríticas ou cangas) em Corumbá e Ladário – Mato Grosso do Sul (MS) (VERSIEUX et al., 2018; DE LIMA et al., 2019). Esses locais são carapaças ferruginosas (**Figura 9**) que circundam as morrarias do Urucum e Rabicho, localizadas no bioma Pantanal e apesar de sua importância como reservatório de diversas espécies, o conhecimento sobre a diversidade fúngica nesse bioma é muito pouco explorado.

**Figura 9** – Vista geral dos afloramentos rochosos de Corumbá - MS. **A)** Canga com vista geral de ilhas de solo contendo *Selaginella sellowii* (primeiro plano) e de *Deuterocohnia meziana* (ao fundo) **B)** Ilhas de solo de *D. meziana*.



Essas cangas apresentam um ambiente hostil devido aos altos níveis de radiação solar, grande amplitude térmica, solos rasos e impermeáveis, pouca disponibilidade de água e nutrientes. Até o momento, esse ecossistema é pouco explorado do ponto de vista químico e biológico. As espécies que ocorrem nestes locais apresentam resistência a desidratação, tolerância a altas temperaturas e características anatômicas, morfológicas e fisiológicas que contribuem para a adaptação a eles (TAKAHASI; MEIRELLES, 2014). Logo, as plantas que ocorrem nessa área, por estarem sujeitas a uma infinidade de fatores abióticos, competição por recursos limitados e altos níveis de pressão de seleção podem, ao longo dos anos, ter se associado a novos endófitos únicos e não caracterizados até o momento (GAKUUBI et al., 2021). Além desses fatores, a probabilidade de encontrar novos microrganismos que produzam substâncias desconhecidas é maior em lugares menos explorados (STROBEL, 2018).

*Bromelia balansae* Mez. (Bromelioideae, **Figura 10**) é uma bromélia terrestre com ampla distribuição geográfica no Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai. No Brasil, é encontrada em campos abertos (Cerrado, Pampas e Pantanal) e em florestas (Amazônia e Mata Atlântica) (LEAL et al., 2018). *Bromelia balansae* é conhecida como caraguatá ou gravateiro, sendo uma espécie com vários usos e funções junto aos povos tradicionais e ecossistemas, dentre eles, a extração de fibras, a alimentação humana e animal, como também ampla utilização na medicina popular para o tratamento de ferimentos e

inflamações das vias respiratórias (POTT; POTT, 1994; POTT; POTT; SOBRINHO, 2004).

**Figura 10** – Vista de ilhas de solo com *Bromelia balansae* em afloramentos rochosos de Corumbá-MS. **A)** Ilha de solo com *B. balansae* e diversos arbustos. **B)** Destaque para *B. balansae* fixada na roxa no afloramento rochoso.



Estudos fitoquímicos com *B. balansae* foram realizados por Coelho e colaboradores em 2010. Neste trabalho os autores fizeram a avaliação antibacteriana, de extratos polares, frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliações da atividade antioxidante. Os extratos foram obtidos com clorofórmio e metanol por maceração a temperatura ambiente, a partir das raízes, folhas e frutos. Dentre os compostos isolados de *B. balansae* estão os flavonoides glicosilados como 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-kaempferol, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil-kaempferol, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil-quercetina e 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-kaempferol. O extrato metanólico dos frutos apresentou valor de MIC de 128  $\mu$ g/mL frente a *M. tuberculosis* e baixa atividade antioxidante (COELHO et al., 2010).

O extrato etanólico dos frutos de *B. balansae* foi avaliado para determinação de seu potencial anti-inflamatório e toxicidade. Para a avaliação da toxicidade, foi utilizada uma dose única de extrato, via oral, na concentração de 2.000 mg/kg, e nenhum animal morreu, demonstrando que a DL<sub>50</sub> deste extrato é superior a dose utilizada. A dose de 300 mg/kg reduziu significativamente os parâmetros inflamatórios avaliados, dentre eles, a

formação de edema de pata, hipersensibilidade mecânica induzida por carragenina e a sensibilidade ao frio, bem como a migração de leucócitos no modelo de pleurisia em camundongos *Swiss*. Além disso, o fracionamento do extrato levou ao isolamento de seis flavonoides, sendo eles 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-quercetina, 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-kaempferol, 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glicopiranosil-kaempferol, 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glicopiranosil-quercetina, 7-O-1- $\alpha$ -ramnosil-6-hidroxiluteolina e 3,7-di-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-kaempferol (DA SILVA BALIN et al., 2018).

Na presente revisão bibliográfica não foram encontrados relatos sobre estudos de microrganismos endofíticos associados a *B. balansae*. No entanto, a partir da família Bromeliaceae, há alguns estudos sobre os microrganismos endófitos, dentre eles com as espécies *Vriesea friburgensis* Mez, *Aechmea nudicaulis* Griseb, *Bromelia antiacantha* Bertoloni e *Tillandsia catimbauensis* Leme, W.Till & J.A.Siqueira. Santos e colaboradores (2018), descreveram a obtenção de fungos endofíticos de sementes de *V. friburgensis*. Os gêneros encontrados foram *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Talaromyces*. Dentre os 20 isolados obtidos, 90% apresentaram potencial de produção do hormônio de crescimento vegetal, ácido indol-3-acético (AIA) *in vitro*, variando entre 17,5 e 33,4  $\mu$ g/mL de AIA (SANTOS et al., 2018).

Bezerra (2020) descreveu a obtenção de uma diversidade de fungos endofíticos cultiváveis associados *Aechmea nudicaulis* Griseb e *Bromelia antiacantha* Bertoloni no ecossistema da restinga de Jurubatiba, estado do Rio de Janeiro. Os endófitos obtidos foram caracterizados morfológicamente e a identificação foi até nível de gênero baseada em chaves dicotômicas distintas para cada grupo taxonômico, sendo obtidos 164 isolados divididos em oito gêneros que foram: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Trichoderma* sp (BEZERRA et al., 2020).

Silva et al. (2018) descreveram pela primeira vez a produção da enzima L-asparaginase proveniente de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, isolados de *Tillandsia catimbauensis* Leme, W.Till & J.A.Siqueira, uma bromélia endêmica da floresta tropical seca brasileira (Caatinga). A partir desses estudos foram obtidos 184 isolados de fungos endofíticos, dos quais 52

endófitos foram identificados como *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp., e destes apenas 10 isolados exibiram atividade enzimática que variaram entre 0,50–2,30 U/g (SILVA et al., 2018).

#### 4.1.3. A resistência bacteriana e a busca por novos antibacterianos

O uso excessivo de antibacterianos em humanos e na pecuária, também devido a prescrição inapropriada (quando o benefício terapêutico é questionável) são umas das causas que levaram a disseminação e o aumento de bactérias causadoras de infecções, porém a inovação na descoberta de novos antibacterianos não conseguiu acompanhar este avanço e surgiram diversos isolados de bactérias resistentes aos antibióticos comercialmente disponíveis, que são também denominadas de bactérias multirresistentes (VENTOLA, 2015). Por definição a resistência bacteriana é a capacidade de um microrganismo crescer na presença de uma substância que normalmente o eliminaria ou limitaria o seu crescimento. Esses dados são alarmantes para a possibilidade iminente de uma crise global de doenças infecciosas (UNEP, 2023).

Dentre os caminhos para o surgimento de uma bactéria resistente existem aqueles por mutação genética aleatória ou por transferência horizontal de genes, o que é caracterizado quando a bactéria adquire genes de resistência de outra fonte, podendo ocorrer através de outra bactéria ou vírus bacteriano, ou até mesmo do ambiente em que ela se encontra (ASBMBTODAY, 2021). O uso indiscriminado de antibacterianos, seja para fins de saúde humana ou agricultura, avicultura e pecuária, são os maiores causadores da atual crise global de resistência antibacteriana (DOMÍNGUEZ; CHACÓN; WALLACE, 2021), o que sobrecarrega os sistemas de saúde e pode afetar diversos outros setores, incluindo o agrícola e a pecuária (INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2019).

As maiores taxas de mortalidade ocorrem em infecções bacterianas causadas por microrganismos multirresistentes. Estima-se que em 2050, cerca de 10 milhões de pessoas morram por ano devido a infecções multirresistentes a medicamentos (WORLD BANK, 2017; UNEP, 2023).

No Brasil, o número de bactérias resistentes a antibacterianos triplicou durante a pandemia do Covid-19. Em 2019, um pouco mais de 1.000 isolados clínicos de bactérias resistentes foram enviados por laboratórios de saúde pública de diversos estados do país para análises nos laboratórios da Fiocruz, enquanto entre o período de janeiro a outubro de 2021 esse número subiu para mais de 3.700 amostras (IOC/FIOCRUZ, 2021).

Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de agentes patogênicos prioritários, resistentes a antibacterianos, para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos (**Tabela 2**) (ORGANIZATION, 2017). Além desta lista, outros centros de pesquisa, como o dos EUA para controle e prevenção de doenças (CDC – do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) e da Índia, divulgaram listas de patógenos (fungos e bactérias) que são ameaças à saúde. Em paralelo a estas listas dos agentes patogênicos, a OMS também produziu nos anos 2018, 2019 e 2021 relatórios sobre agentes antibacterianos em desenvolvimento clínico e pré-clínico. Esses relatórios visam motivar políticas públicas, financiamento de pesquisas e orientar a descoberta e o desenvolvimento de novos tratamentos antibacterianos (BUTLER et al., 2022).

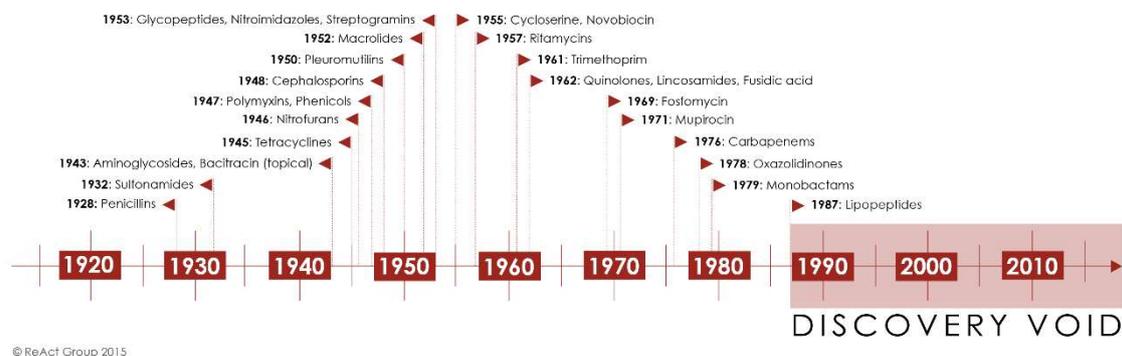
O grupo *ad hoc* da coordenação interagências (IACG) para resistência antibacteriana, criado em 2016, reuniu diversas organizações internacionais e produziu um relatório em abril de 2019, o qual foi enviado ao Secretário Geral da ONU, com o título “Não há tempo a perder: Acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos” (INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2019). Neste relatório constam recomendações do grupo que visam conter a resistência bacteriana, evitar milhões de mortes e manter os ganhos econômicos e de desenvolvimento.

**Tabela 2** - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a Pesquisa e Desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos

<b>Prioridade 1: CRÍTICA</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenem;
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenem;
	Enterobacteriaceae resistente à carbapenem e a cefalosporina
<b>Prioridade 2: ALTA</b>	<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina;
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina;
	<i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina;
	<i>Campylobacter</i> spp. resistentes às fluoroquinolonas;
	<i>Salmonella</i> resistente às fluoroquinolonas;
<b>Prioridade 3: MÉDIA</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à cefalosporina e às fluoroquinolonas.
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sem sensibilidade à penicilina;
	<i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina;
	<i>Shigella</i> spp. resistentes às fluoroquinolonas.

A descoberta de novos antibacterianos teve o seu auge nos anos 50 e a última classe de antibacterianos comercial foi lançada em 1987 (**Figura 11**). Nos últimos 20 anos menos de 50 fármacos antibacterianos foram aprovados. Dentre os fatores que podem estar relacionados a essa falta de inovação, estão a dificuldade científica e a falta de incentivo financeiro, pois infecções bacterianas costumemente não requerem um tratamento contínuo e os altos índices de resistência bacteriana, levam a um menor retorno do investimento financeiro para as indústrias farmacêuticas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

**Figura 11** - Linha do tempo de descoberta de antibacterianos em uso clínico.



© ReAct Group 2015

Fonte: <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/09/ab-discovery-timeline.png>

Os PN provenientes de plantas e microrganismos são as principais fontes de busca por substâncias para a solução das patologias que a sociedade enfrenta. Notadamente, aproximadamente metade dos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), no período entre janeiro de 1981 a setembro de 2019, são PN e seus derivados, produtos sintéticos idênticos ou inspirados em PN, logo eles são uma fonte promissora na descoberta de antibióticos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Por isso, institutos de pesquisa de todo o mundo se mantêm como fonte importante de conhecimento e inovação nessa área, ressaltando a importância de políticas estratégicas e investimentos.

#### 4.1.4. Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos (BASTOS et al., 2016). Os fenótipos da doença incluem a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco cutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), podendo ser fatal se não tratada adequadamente.

Segundo o relatório de 2021 da OMS, a leishmaniose é endêmica em 99 países, sendo que 89% dos casos globais de LV ocorreram em apenas 8 países, e 88 % da incidência global de casos de LC ocorreram em 9 países, sendo que o Brasil está incluído nas duas listas (WHO, 2023).

A leishmaniose é denominada uma doença negligenciada e afeta principalmente populações mais vulneráveis, como as que vivem em condições precárias de habitação e higiene (CAMARGO; LANGONI, 2006). O impacto social da leishmaniose é significativo, principalmente em países onde a doença é endêmica. Diferentes agentes etiológicos causam as leishmanioses como, por exemplo, *Leishmania major*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. Este último é o agente etiológico de destaque para a leishmaniose visceral, apresentando taxa de mortalidade superior a 90% quando não tratada e ocorre, principalmente, na Índia, Nepal, Bangladesh e Brasil (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; ANVERSA et al., 2018). Dentre os fármacos disponíveis clinicamente temos, os antimoniais pentavalentes, miltefosina, pentamidina, paromomicina e anfotericina B. O tratamento terapêutico existente

hoje apresenta diversas desvantagens que incluem o longo período de tratamento, elevada toxicidade, diversos efeitos colaterais e alto custo, o que reflete na baixa adesão aos tratamentos pelos pacientes (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; BASTOS et al., 2016).

O desenvolvimento de novos fármacos com menor toxicidade e maior eficácia é necessário, pois o número de fármacos disponíveis para o tratamento ainda é pequeno e apresenta diversos efeitos colaterais (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Sendo assim, o estudo de PN provenientes de fungos endofíticos pode ser uma abordagem valiosa para encontrar novos candidatos ao desenvolvimento de fármacos contra leishmania, como recentemente descritos em alguns trabalhos utilizando extratos de endófitos com potenciais compostos antileishmania (ALVES et al., 2018; HZOUNDA FOKOU et al., 2021; TOGHUEO, 2019).

#### 4.1.5. Câncer

O câncer é a segunda maior causa de mortalidade no mundo, especialmente entre os países em desenvolvimento. Em 2020 foram contabilizados 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes no mundo, sendo que a previsão em 2030 é de 21,7 milhões de casos e 13 milhões de mortes (SUNG et al., 2021). Entre os tipos de câncer com maiores incidências encontram-se o de mama, próstata, pele, pulmão, fígado, colorretal e gástrico, enquanto entre os mais letais encontram-se os cânceres hematológicos como leucemias e linfomas. No Brasil, desde o ano 2000, as neoplasias são a segunda causa de morte, atrás apenas das doenças do sistema circulatório e superando as mortes por causas externas (FERLAY et al., 2019).

As neoplasias causam um grande impacto econômico e social, o que fez com que a busca por novos medicamentos anticâncer recebesse cada vez mais atenção das indústrias farmacêuticas. Isso possibilitou um avanço no entendimento da biologia molecular das células, suas vias de sinalização e dos processos de divisão celular nos últimos anos, bem como a aplicação de tecnologias analíticas para a busca e determinação desses compostos,

principalmente a partir de novas fontes, incluindo microrganismos endófitos (ATANASOV et al., 2021; DEEPIKA; MURALI; SATYAMOORTHY, 2016; HYDE et al., 2019).

Estudos recentes prestaram atenção considerável aos potenciais componentes anticancerígenos em plantas medicinais e seus endófitos e centenas de metabólitos já foram descritos com potencial atividade citotóxica (HRIDOY et al., 2022; LI et al., 2018; MARESCA et al., 2022). Dentre as classes de substâncias citotóxicas para linhagens de células cancerígenas de fungos endofíticos tem-se: alcaloides, cumarinas, depsipeptídeos, lactonas, lignanas, peptídeos, policetídeos, quinonas, terpenos, xantonas (HRIDOY et al., 2022).

Os cânceres são originados por acúmulo de mutações, ocasionando proliferação, diferenciação, movimentação celular e sobrevivência das células de forma anormal. Isto se deve a mutações que afetam genes que controlam estes processos biológicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Nos últimos anos discute-se muito sobre a origem dos cânceres, vários apresentam diferentes tipos celulares dentro da massa tumoral, com diferentes características na proliferação e diferenciação, devido ao acúmulo de mutações e outros fatores. Dentro deste conjunto de tipos celulares, foi descrito que alguns cânceres possuem uma pequena população celular com capacidade indefinida de proliferação e com características de uma célula-tronco (ex. estado indiferenciado com capacidade de diferenciação, autorenovação indefinida e baixa taxa de proliferação) (MASTELARO DE REZENDE; FERREIRA; PAREDES-GAMERO, 2020; SENFT; JEREMIAS, 2019). Esta pequena população dentro dos cânceres é chamada de células-tronco cancerígenas. Este novo ponto de vista está mudando os conceitos sobre aplicações terapêuticas convencionais sobre o tratamento deste tipo de doença, uma vez que, a maior parte dos tratamentos atuais visa a diminuição de células com alta taxa proliferativa poupando as células com baixa taxa de proliferação ou células quiescentes (PAREDES-GAMERO et al., 2013). Assim, novos produtos que afetem processos, não só de morte celular, mas também a proliferação e diferenciação, em especial a população de células-tronco estão em destaque em várias pesquisas.

Os agentes antineoplásicos utilizados para o tratamento de cânceres podem atuar em diferentes aspectos da biologia das células cancerígenas, sempre priorizando que sejam mais ativos nestas células do que em células normais. Assim, estes agentes podem atuar, por exemplo, em receptores tirosina quinase, como o dasatinib (MONTERO et al., 2011), diminuir ou parar a divisão celular como o daunorubicina (JAYARAMAN; JAMIL, 2014), inibir a síntese de DNA como o metotrexato (VISENTIN; ZHAO; GOLDMAN, 2012) e promover a diferenciação e morte como o tretinoin e ATRA (ácido all-transretinóico) (YANG et al., 2015). Os compostos que induzem morte celular por apoptose ou até necrose (para cânceres mais agressivos), parada do ciclo celular, diferenciação e resistência a fármacos (inibidores de bombas de efluxo) são primordiais na luta contra os cânceres (DERYUGINA; QUIGLEY, 2015; MASTELARO DE REZENDE; FERREIRA; PAREDES-GAMERO, 2020). Contudo, os tratamentos, ainda altamente dispendiosos, não conseguem diminuir a taxa de mortalidade por causa do número limitado de agentes antitumorais, que variam quanto a sua toxicidade e eficácia. Nesse contexto os microrganismos endofíticos têm ganhado cada vez mais destaque como uma fonte substancial de moléculas eficazes no tratamento e prevenção da carcinogênese (HYDE et al., 2019).

#### 4.2. Objetivos do Capítulo 3

Os objetivos do Capítulo 3 são:

- Coletar folhas de *Bromelia balansae* que ocorrem nos afloramentos rochosos do Pantanal e isolar fungos endofíticos simbiotes;
- Preservar os fungos endofíticos isolados;
- Identificar molecularmente cepas isoladas;
- Cultivar os fungos endofíticos em pequena escala para a produção de extrato brutos (EB);
- Avaliar o potencial antibacteriano, antibiofilme, citotóxico e antileishmania dos metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos;

- Avaliar os perfis químicos dos extratos de alguns isolados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM);

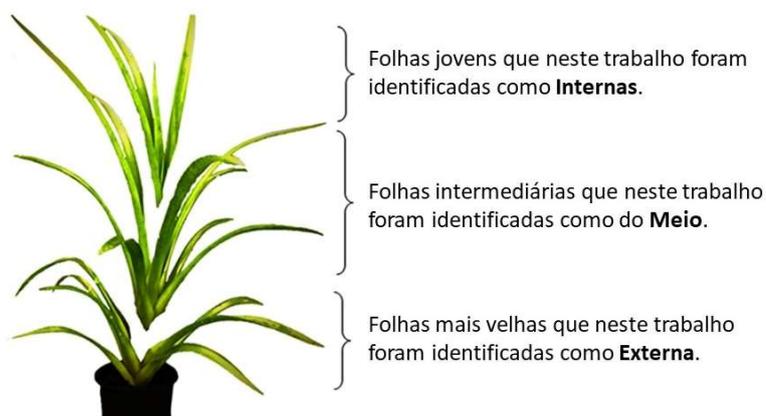
### 4.3. Procedimento Experimental

#### 4.3.1. Coleta e identificação do material vegetal

Foram coletadas folhas de *Bromelia balansae* Mez nos afloramentos rochosos de Corumbá-MS, na bancada laterítica da Fazenda São João (19°10'43" S, 57°32'19" O, 180 metros de elevação), em abril de 2019, no período da manhã e na bancada laterítica da Fazenda Figueira (19°17'56" S, 57°37'00" O, 156 metros de elevação), no em maio de 2019, no período da manhã. Exsicata voucher Damasceno-Júnior *et al.* 3089 (COR), herbário COR da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Estes estudos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob númeroAE8625B.

Foram coletadas 3 folhas saudáveis de cada indivíduo, sendo uma folha externa, uma folha do meio e uma folha interna da planta (**Figura 12**). Em cada localidade foram coletadas folhas de 3 indivíduos, todos estavam nas bordas dos afloramentos rochosos. No momento de todas as coletas flores e frutos estavam ausentes.

**Figura 12** - Representação da amostragem de folhas de *B. balansae*.



Fonte: Adaptado de KLEINGESINDS *et al.* (2018).

As folhas foram selecionadas e inspecionadas quanto ao aspecto saudável das plantas hospedeiras, sendo considerados hidratação, ausência de lesões aparentes e coloração homogênea. Após a coleta, as folhas foram conservadas e identificadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Campus do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marivaine da Silva Brasil para os procedimentos de isolamento dos fungos endofíticos.

#### 4.3.2. Preparo dos meios de cultivo de batata dextrose

##### 4.3.2.1 Meio de cultivo caldo de batata dextrose (BD)

Para o preparo do BD, foram utilizadas batatas inglesas, picotadas e previamente descascadas e lavadas, na proporção 200 g de batata em um litro de água destilada, este foi levado à fervura em forno micro-ondas até a formação de uma borra de espuma e aferição de que a batata estava cozida. Esse caldo foi filtrado em coador de tecido e o volume foi aferido. Foi então adicionado dextrose na proporção de 20 g/L, em seguida foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos, para esterilização.

##### 4.3.2.2 Meio de cultivo caldo de batata dextrose com ágar (BDA)

Para o preparo do meio de cultivo BDA, o processo é o mesmo descrito para o BD, porém antes de autoclavar é adicionado ágar na proporção de 15 g/L, em seguida o meio de cultivo é autoclavado a 121 °C, por 15 minutos, para esterilização.

#### 4.3.2.3 Meio de cultivo caldo de batata dextrose com ágar (BDA) com antibióticos para o isolamento dos fungos endofíticos

O meio de cultivo usado no isolamento é o BDA suplementado com tetraciclina e cloranfenicol. Para o seu preparo em condições assépticas foram adicionados 15 mL da solução de tetraciclina (obtendo-se assim a concentração final de 50 mg/mL) e 30 mL da solução de cloranfenicol (obtendo-se assim a concentração final de 100 mg/mL) em 600 mL de BDA ainda morno após a esterilização em autoclave, esta solução foi homogeneizada em condições assépticas e adicionada em placas de petri.

Para o preparo da solução estoque de tetraciclina 2.000 mg/L, foi utilizado um frasco com tampa de rosca contendo 250 mL água destilada estéril, em condições assépticas, foi adicionado a este o conteúdo de um comprimido de cloridrato de tetraciclina (Prati-Donaduzzi) de 500 mg. Para o preparo da solução estoque de cloranfenicol o mesmo procedimento foi realizado.

#### 4.3.3. Isolamento dos microrganismos endofíticos

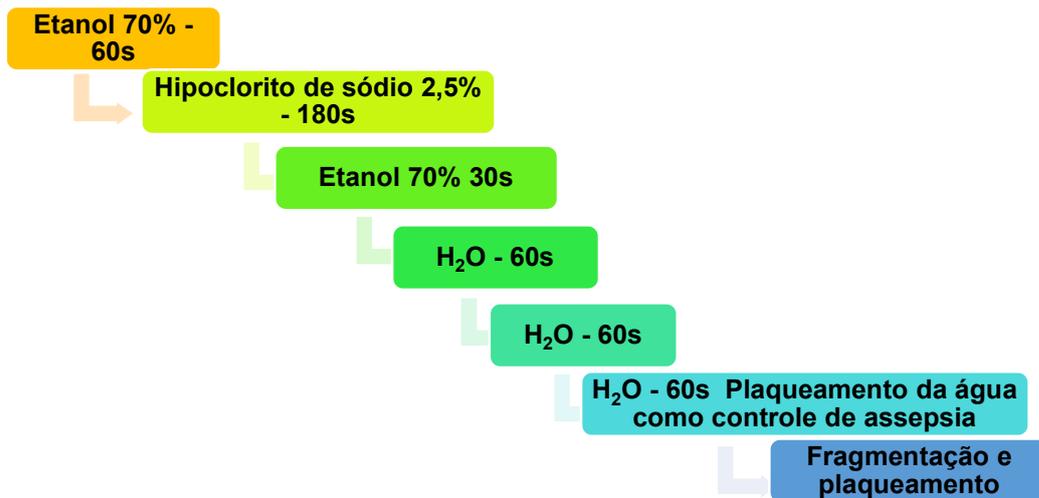
O material vegetal coletado foi processado no mesmo dia da coleta. Para garantir a eliminação de microrganismos epifíticos, inicialmente foram seccionados pedaços de 10 cm das folhas e estes foram lavados com detergente neutro em água corrente. Em seguida, em condições assépticas em capela de fluxo laminar, os fragmentos foram desinfetados superficialmente, sendo empregada uma adaptação da metodologia descrita para o isolamento de fungos endofíticos da bromélia *Tillandsia catimbauensis* (SILVA et al., 2018). Na **Figura 13** é apresentado o esquema do processo de desinfecção, com as seguintes etapas:

- (1) Submersão em álcool 70% por 60 segundos;
- (2) Submersão em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 180 segundos;
- (3) Submersão em álcool 70% por 30 segundos;

(4) Uma sequência de três enxagues, por submersão, de 60 segundos em água destilada estéril, cada lavagem foi realizada em um frasco bécher diferente.

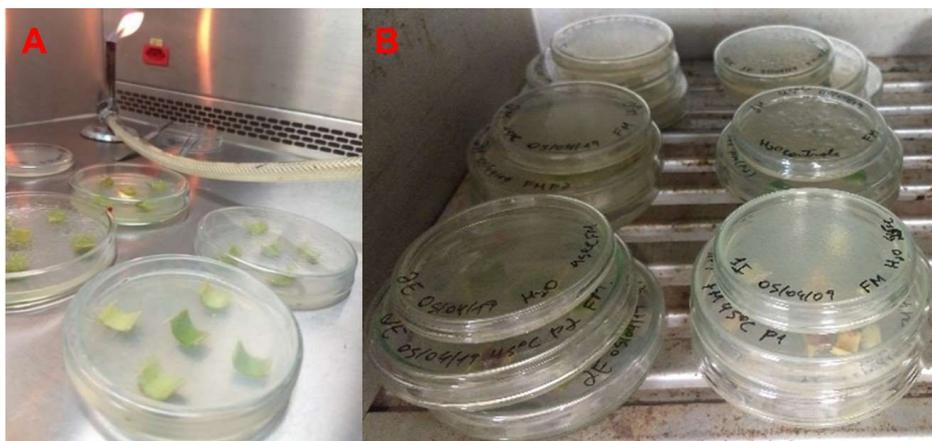
O tecido vegetal foi transferido em todas as etapas realizadas com o auxílio de pinça estéril que foi constantemente flambada para assepsia.

**Figura 13** - Esquema da sequência de desinfecção da superfície das folhas para isolamento de fungos endofíticos de *B. balansae*.



Ao final da última lavagem o material vegetal foi colocado em placa de Petri de vidro estéril e fragmentado com auxílio de pinças e bisturi cirúrgico estéril para a obtenção de fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>. Os fragmentos foram então transferidos para a superfície do meio de cultivo BDA suplementado com antibióticos em placa de Petri. Em cada placa foram colocados 5 fragmentos. Para verificar a eficácia da desinfecção da superfície dos fragmentos vegetais, alíquotas de 1 mL da última lavagem com água foram transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura e incubadas nas mesmas condições, conforme pode ser observado na **Figura 14**.

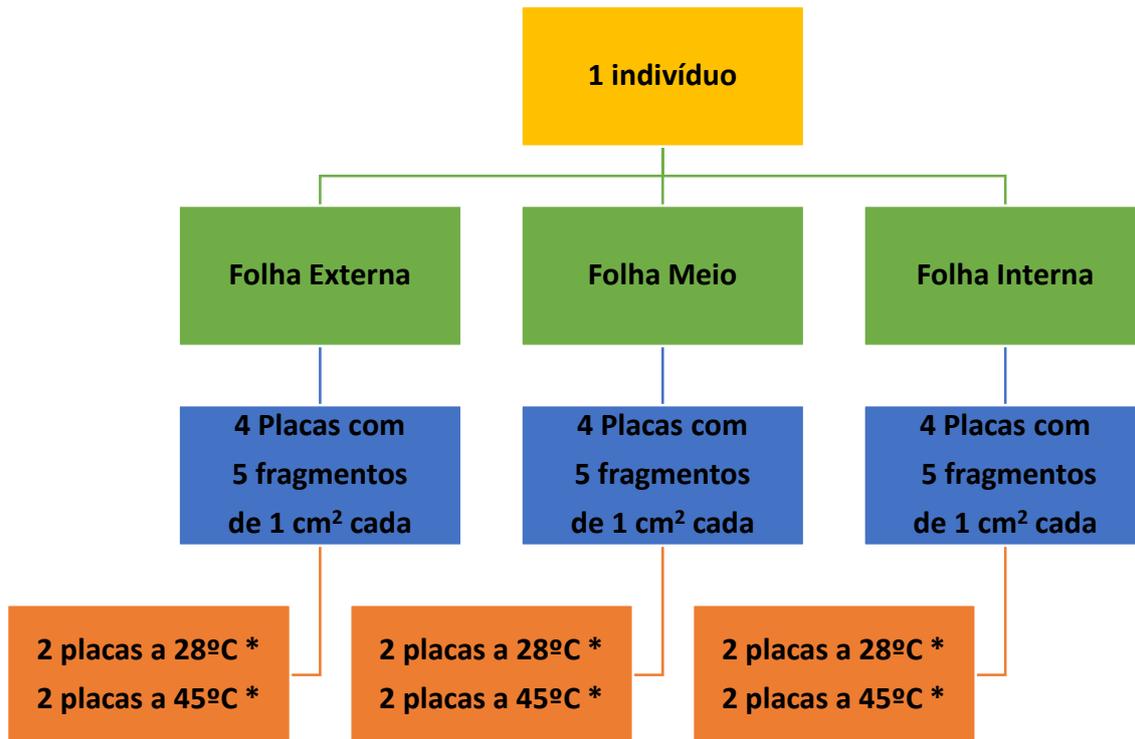
**Figura 14** - Fragmentos de folhas de *B. balansae* em placas (A e B) contendo BDA e incubados em estufa.



Para cada folha foi realizada uma sequência de desinfecção com o intuito de se evitar problemas de contaminação.

Foram coletados 3 indivíduos por local, sendo uma folha externa, uma interna e uma do meio, totalizando 9 folhas por localidade. Foram produzidas 4 placas contendo fragmentos vegetais para cada folha, gerando um total de 36 placas com fragmentos por local. A incubação das placas foi realizada da seguinte forma: 2 placas com fragmentos a 28 °C e 2 placas com fragmentos a 45 °C e 1 placa controle de água, para cada folha. O total de fragmentos por coleta foi de 180. Um fluxograma desta etapa pode ser observado na **Figura 15**.

**Figura 15** - Desenho experimental do plaqueamento dos fragmentos vegetais para o isolamento fúngico.



\* 1 placa de controle de água, da última lavagem foi feita em cada temperatura para cada folha.

Para obtenção de colônias puras, as placas foram analisadas diariamente quanto ao crescimento fúngico e qualquer colônia desenvolvida foi transferida para o centro de uma nova placa contendo apenas meio de cultura BDA sem antibióticos. Essa nova placa foi incubada a 28 °C ou a 45 °C conforme a placa de origem.

Cada cepa isolada recebeu um nome conforme **1EP1FX**, sendo o primeiro número referente ao indivíduo (ex. 1); a primeira letra referente a característica da folha (E = externa, I = interna, ou M= meio); P1 ou P2 com referência a placa no qual foi isolado; e FX onde F é referência a fungo e X é um número de ordem de isolamento da mesma placa.

As cepas fúngicas isoladas foram purificadas pela técnica de esgotamento em placa na tentativa de se obter colônias puras. Os fragmentos vegetais foram

incubados por até 7 dias a 28 °C e por até 14 dias a 45 °C, conforme o surgimento dos microrganismos e da possibilidade do seu isolamento.

#### 4.3.4. Manutenção dos microrganismos isolados

Após a obtenção de colônias puras em placas de Petri, com no mínimo dois repiques em meio BDA para que não sofresse influência do antibiótico da placa inicial, os fungos foram cultivados em tubos contendo meio BDA inclinado. Após atingirem alta confluência, foram cobertos com óleo mineral previamente esterilizado (SMITH; ONIONS, 1983).

Outra forma de preservação foi feita utilizando frascos de penicilina com água destilada estéril. A estes foram adicionados pequenos fragmentos do crescimento de 7 dias em placa de BDA, os frascos foram então selados e estão armazenados sob refrigeração a 8 °C.

#### 4.3.5. Cultivo e obtenção dos extratos brutos (EB)

##### 4.3.5.1. Cultivo dos fungos e preparo dos EB de BDA

As cepas foram reativadas em placas de Petri contendo BDA. Após o primeiro crescimento, pós reativação, os fungos foram repicados para novas placas, para garantir que não ocorresse contaminação do extrato com óleo mineral. As placas novas foram então incubadas por 7 dias a 28 °C.

Para a obtenção do extrato bruto (EB), toda massa micelial de crescimento (ágar + microrganismo (MO)) foi fragmentada com o auxílio de espátula, adicionado em um bécher, a estes foram adicionados 40 mL de acetato de etila contendo 1% de ácido fórmico e em seguida este foi mantido em banho de ultrassom por 10 min. Em seguida o solvente orgânico foi filtrado e a massa micelial foi submetida a uma nova extração. Posteriormente, todo o solvente de extração filtrado foi reunido, concentrado e seco para a obtenção do EB de BDA.

#### 4.3.5.2. Cultivo dos fungos e preparo dos extratos brutos de sobrenadante (EBsob) e micélio (EBmic) do cultivo em de BD

As cepas foram reativadas em placas de petri contendo BDA. Após o primeiro crescimento pós reativação, os fungos foram repicados para novas placas para garantir que não ocorresse contaminação do extrato com óleo mineral.

Os cultivos em meio submerso foram realizados em condições estáticas, na ausência de luz, em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata dextrose), onde foram inoculados 3 fragmentos de micélio-ágar, de aproximadamente 0,5 cm e crescimento de 7 dias. Todo o processo de cultivo foi realizado em condições assépticas e para tal foi utilizada uma capela de fluxo laminar e todo o material foi previamente esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min).

O cultivo foi feito em 7 dias e ao final o micélio foi separado do sobrenadante por filtração. O sobrenadante foi imediatamente extraído com acetato de etila contendo 1% ácido fórmico; a fração aquosa foi descartada e a fração orgânica foi concentrada e seca para a obtenção do EB do sobrenadante.

Os micélios foram fragmentados com bisturi cirúrgico e extraídos com acetato de etila e metanol 1:1 (v/v) contendo 1% de ácido fórmico e extraídos por 10 min em banho de ultrassom. Em seguida o solvente orgânico foi filtrado e a massa micelial foi submetida a uma nova extração. Posteriormente, todo o solvente de extração filtrado foi reunido, concentrado e seco para a obtenção do EB do micélio.

#### 4.3.6. Ensaio biológicos

##### 4.3.6.1. Atividade antibiótica ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

###### 4.3.6.1.1. Preparo do inóculo

Foram utilizadas as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 80958 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182.

Estas foram cultivadas em tubos contendo caldo nutriente (peptona 10 g/L; extrato de levedura 1,5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L) por 48 h antes do experimento e a 37 °C em agitador.

No momento do experimento os cultivos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em solução salina esterilizada (0,9%). A partir deste material foram preparadas diluições para a padronização da concentração de inóculo com a escala de McFarland 0,5 utilizando água estéril. Após a padronização da proporção de diluição, foi preparada uma solução em caldo nutriente para ser utilizada como inóculo no experimento.

#### 4.3.6.1.2. Preparo das amostras

Os estoques dos EB foram preparados em caldo nutriente com 10% de DMSO. Inicialmente adicionava-se o DMSO, a fim de facilitar a solubilização do extrato e em seguida era adicionado o volume de caldo nutriente. Os estoques foram preparados na concentração de 2 mg/mL.

Como antibiótico padrão foi utilizada gentamicina, obtida comercialmente numa solução 40 mg/mL. Uma solução intermediária em caldo nutriente na concentração de 125 µg/mL foi preparada para o uso na diluição seriada do experimento.

#### 4.3.6.1.3. Preparo do reagente colorimétrico

Uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % p/v em água destilada foi preparada e mantida protegida da luminosidade para evitar possíveis degradações.

#### 4.3.6.1.4. Avaliação da atividade antibacteriana

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado por microdiluição em caldo, para uma triagem inicial para a seleção dos fungos isolados promissores (ELOFF, 1998).

Para isto, em uma placa de 96 poços, inicialmente foram adicionados 100 µL de caldo nutriente em todos os poços. Em seguida foram adicionados no primeiro poço de cada linha da placa, as soluções estoques das amostras e do padrão, seguida de diluição seriada em placa com caldo nutriente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de inóculo. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Foram realizados, em cada experimento, controles negativos (apenas meio de cultivo), positivos (gentamicina) e para o solvente, DMSO a 10 %, utilizado na diluição dos EB. A gentamicina foi adquirida comercialmente em solução estoque de 40 mg/mL. Uma solução intermediária na concentração 125 µg/mL foi feita em caldo nutriente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, a atividade antibiótica foi detectada pela adição de solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC). A CIM foi definida como a menor concentração de EB que inibiu visualmente o crescimento dos microrganismos, como indicado pela coloração TTC.

#### 4.3.6.2. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme

Os testes de atividade antibacteriana e antibiofilme foram realizados no laboratório de biofilmes e diversidade microbiana da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob a coordenação do Prof. Dr. Alexandre José Macedo.

Os ensaios foram realizados baseados na metodologia de TRENTIN *et al.* (2011) utilizando o ensaio de cristal violeta em microplaca de 96 poços. Inicialmente, em cada poço, foi pipetado 4 µL de cada extrato solubilizado em DMSO, utilizando soluções estoques de 1 e 10 mg/mL, obtendo-se ao final do

experimento a concentração final no poço de 20 e 200 µg/mL respectivamente. Em seguida, adicionou-se 76 µL de água estéril, 40 µL de caldo de infusão cérebro coração para *S. aureus* ou caldo triptona soja para *P. aeruginosa* e suspensão bacteriana de crescimento de 24h (80 µL), na concentração de  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL. Foi então realizada uma leitura da placa, em espectrofotômetro a 600 nm, que corresponde ao t=0 de incubação e as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C.

O controle de crescimento foi realizado com o veículo DMSO (4 µL). Para o controle de atividade foi utilizada vancomicina para *S. aureus* e gentamicina para *P. aeruginosa*, na concentração de 20 µg/mL.

Após o tempo de incubação, as células planctônicas foram removidas, colocadas em outra placa de 96 poços e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 600 nm, que corresponde ao t = 24h. A atividade antibacteriana foi determinada pela diferença do crescimento bacteriano inicial (t = 0) e final (t = 24 h).

Para a determinação da atividade antibiofilme, as células que ficaram aderidas à placa inicial de incubação do experimento foram lavadas três vezes usando 200 µL solução salina estéril (cloreto de sódio 0,9%). O biofilme aderente foi fixado a 60 °C durante 1 h e depois a biomassa do biofilme foi corada com cristal violeta (0,4% durante 15 min à temperatura ambiente). Finalmente, a placa foi lavada com água e o biofilme foi ressuspendido com etanol por 30 min e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

#### 4.3.6.3. Avaliação *in vitro* do potencial antileishmania frente a *L. infantum*

Os ensaios de avaliação da atividade antileishmania foram realizados no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Curitiba, Brazil, pelo pesquisador Dr. Júlio Menta de Almeida sob supervisão da profa. Lia Carolina Soares Medeiros.

Os ensaios foram baseados na metodologia de CEOLE *et al.* (2018). As células THP-1 foram cultivadas na presença de acetato de miristato de forbol (PMA) a 100 nM por 48 horas para a diferenciação em macrófagos. Enquanto as

formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foram mantidas em meio M199 suplementado com 10% SFB a 28 °C. As células THP-1 (ATCC TIB-202) foram mantidas a 37 °C em uma incubadora umidificada com uma atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB (soro fetal bovino).

As culturas de promastigotas, na fase estacionária de crescimento, foram adicionadas a culturas de macrófagos derivados de THP-1 em uma multiplicidade de infecção de 25:1. Após 24 horas, os parasitas não internalizados foram lavados e as culturas infectadas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> para obtenção dos amastigotas.

Os macrófagos derivados de células THP-1 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) infectados com amastigotas foram tratados por 24 horas com 150 µg/mL dos extratos brutos em quintuplicata. Os experimentos foram realizados por contagem automática no equipamento Operetta CLS High Content Analysis System.

Para análise no Operetta, as células após tratamento foram lavadas com PBS1x (solução salina de tampão fosfato concentrada uma vez), fixadas com metanol 100 % frio e, após lavagem com água ultrapura, foram coradas com Hoechst 33342 conforme metodologia adaptada por BORGES *et al.* (2023), CEOLE *et al.* (2018) e TIRADO *et al.* (2020).

#### 4.3.6.4. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pelo pesquisador Dr. Heron Fernandes Torquato sob a responsabilidade e supervisão do professor Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero.

O ensaio foi baseado na metodologia de DE CARVALHO *et al.* (2022), foram utilizadas as linhagens de células leucêmicas humanas (Kasumi e KG-1). As células KG-1 foram mantidas em meio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado com 20 % SFB, enquanto as células Kasumi foram mantidas em

meio RPMI suplementado com 10 % SFB. Todas as células foram cultivadas em meio contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e em uma incubadora umidificada contendo 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Neste experimento, 10<sup>5</sup> células/mL foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio suplementado. As células foram tratadas na presença ou ausência de compostos por 24 h usando a concentração 100 µg/mL dos extratos brutos. Após o tratamento, retirou-se o meio de cultura celular e adicionou-se 100 µL de meio com solução de resazurina a 10 % e após 4 h de incubação a fluorescência foi medida (excitação 530 nm, emissão 590 nm) em um leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). Cada experimento foi realizado em duplicata.

#### 4.3.7. Identificação molecular de cepas selecionadas

Algumas cepas fúngicas foram selecionadas fenotipicamente para a identificação em nível molecular pela empresa Senai Co., Ltd. (Rio de Janeiro, Brasil) através do sequenciamento da região ITS do rDNA, utilizando os primers ITS-1 (forward) e ITS-4 (reverse) (RAJA et al., 2017; SCHOCH et al., 2012).

Os cromatogramas das sequências obtidas foram analisados utilizando o software Geneious versão 7.1.3 (Biomatters), as regiões da sequência com baixa resolução foram cortadas e foi obtida as sequências consenso. Estas foram então submetidas a busca de sequências similares depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do NCBI, utilizando para isso a ferramenta BLAST N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foi utilizado também o banco de dados do UNITE que é voltado para o alinhamento de sequências da região do ITS (<https://unite.ut.ee/index.php>).

#### 4.3.8. Análises químicas de extratos por CLAE-DAD-EM

##### 4.3.8.1. Preparo de amostras

As amostras foram preparadas em metanol e água 7:3 (v/v) na concentração de 1 mg/mL e filtradas em filtro PTFE (politetrafluoretileno) de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro. O volume de cada amostra injetado no sistema cromatográfico foi de 2 µL.

#### 4.3.8.2 Sistema de CLAE-DAD-EM

As análises foram adquiridas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um UFLC-20AD Prominence Shimadzu acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massa (CLAE-DAD-EM) com fonte de ionização por eletrospray e analisadores quadrupolos e de tempo de voo sequenciais (MicrOTOF-Q III, Bruker Daltonics). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica Kinetex® C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) acoplada a uma pré-coluna de mesmo material. As análises foram realizadas com vazão de 0,3 mL/min e durante as análises a coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C. A fase móvel foi composta por acetonitrila (B) e água ultrapura (A), ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. O perfil de eluição gradiente foi o seguinte: 0-2 min (3% de B), 2-25 min (3-25% de B), 25-40 min (25-80% de B), e 40-43 min (80% de B, isocrático). Todas as amostras foram analisadas nos modos de ionização positivo e negativo. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: gás nebulizador (N<sub>2</sub>, 4 Bar) e gás de secagem (N<sub>2</sub>, 9 L/min), e a voltagem capilar foi de 2500 kV.

#### 4.3.9. Análises por redes moleculares e anotação utilizando a plataforma GNPS

Os dados obtidos nas análises de CLAE-DAD-EM/EM foram convertidos para o formato .mzXML utilizando o software MsConvert (ADUSUMILLI; MALLICK, 2017). Os arquivos convertidos foram carregados na plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>).

A criação das redes moleculares foi realizada considerando seis íons fragmento dos espectros de EM/EM, sendo consideradas as tolerâncias de massas para os íons precursores e fragmentos de 0,03 Da e 0,09 Da,

respectivamente. A rede molecular foi criada considerando também arestas com cosseno maior do que 0,6 e cinco íons combinados (WANG et al., 2016). Os resultados foram exportados e processados no software Cytoscape 3.9 e assim foram obtidos os mapas de rede molecular com representações de nodos e arestas.

A rede molecular original do fungo *Aspergillus* sp. 4IP2F1 pode ser encontrada em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=bc9f144036a746e192ffe72024c36739>.

A anotação das substâncias foi realizada com base nos dados espectrais de massas de alta acurácia, padrão de fragmentação e dados de UV em comparação dos dados descritos na literatura. A fórmula molecular de cada substância foi determinada considerando erros inferiores a 8 ppm e mSigma abaixo de 30. Também foram realizadas comparações espectrais utilizando a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

#### 4.4. Resultados e discussão

##### 4.4.1. Coleta e isolamento

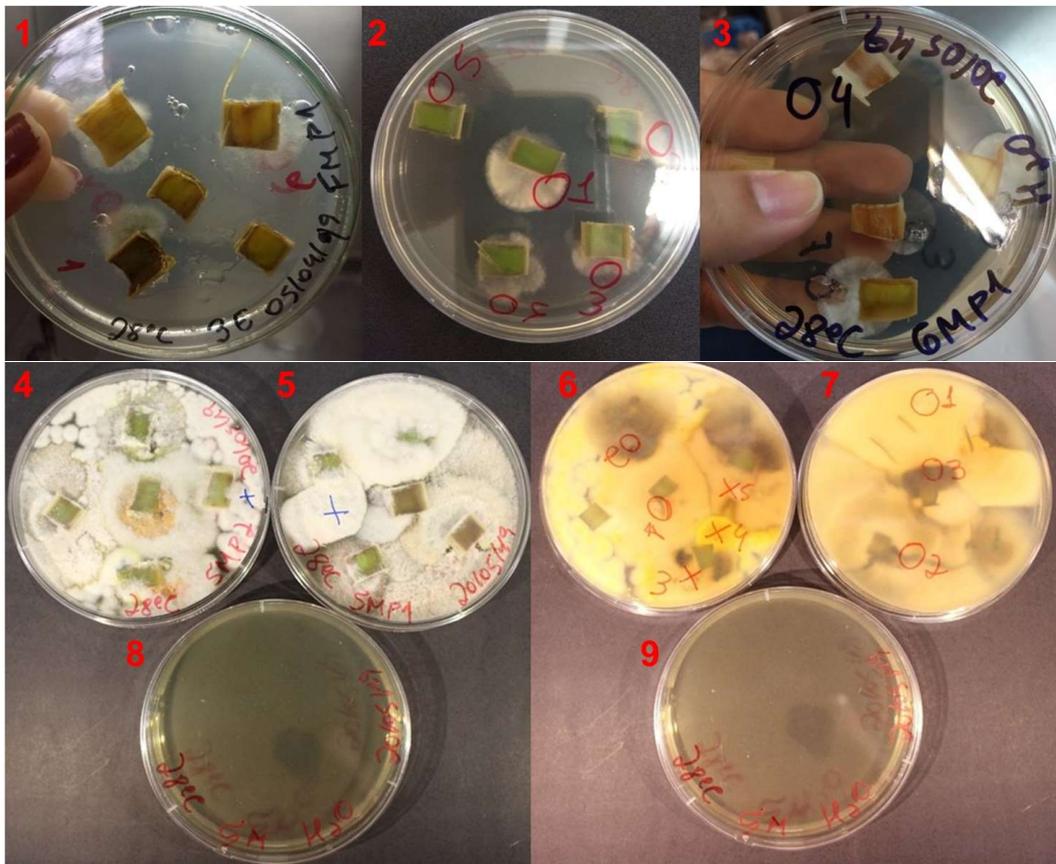
O isolamento de microrganismos realizado de forma racional visa um melhor conhecimento da biodiversidade microbiana. Embora não exista um consenso na literatura sobre a seleção de fontes vegetais para bioprospecção de fungos endofíticos, alguns critérios têm sido utilizados para a seleção de plantas promissoras (GAKUUBI et al., 2021). O escolhido neste trabalho, foi o critério de isolar fungos endofíticos de plantas de um nicho ecológico distinto, pois estas plantas podem ter desenvolvido estratégias de sobrevivência diferenciadas, o que podem ter permitido que elas hospedassem uma coleção de microrganismos endofíticos raros e cepas únicas.

O meio de cultivo escolhido para o isolamento, batata dextrose ágar, foi suplementado com tetraciclina e cloranfenicol para evitar o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas durante o processo do isolamento. As

placas que continham a água da lavagem, após a desinfecção, não apresentaram crescimento de nenhum tipo de microrganismo, portanto o processo de desinfecção foi eficiente e assim, pode-se assumir que apenas fungos endofíticos foram isolados.

Após 36 horas de inoculação do material vegetal foi possível iniciar o isolamento. Ocorreu colonização na maioria dos fragmentos, como pode ser observado na **Figura 16**. As primeiras cepas que apareceram cresceram rapidamente, atingindo toda a extensão da placa. Em alguns estudos os autores transferem os fragmentos ainda não colonizados para novas placas após o aparecimento de uma colônia de endófito, para evitar a contaminação dos outros fragmentos com o endófito que já está em crescimento. Entretanto, neste trabalho foram mantidos todos os fragmentos na mesma placa, o que não prejudicou a colonização por endófitos de cada fragmento (**Figura 16**).

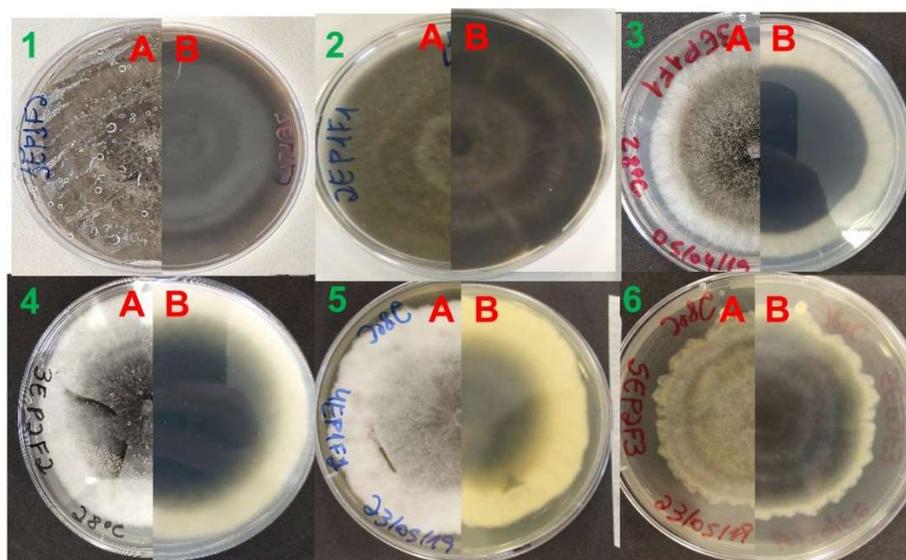
**Figura 16** - Isolamento de fungos endofíticos de folhas de *B. balansae*. Placas 1, 2 e 3, com 3 dias de plaqueamento. Placas 4 e 5 (frente) e 6 e 7 (verso) com 7 dias de plaqueamento. Placas 8 e 9 controles de água. Todas as placas continham meio BDA e foram incubadas a 28 °C.



No total, 33 colônias foram isoladas na primeira coleta e 65 na segunda, destas 61 cepas de endófitos apresentaram crescimento estável, foram estabelecidas e estocadas no laboratório, no anexo 9.1 encontram-se as imagens do cultivo dos isolados em BDA, assim podemos realizar a análise visual das colônias e observar diversos morfotipos para os isolados.

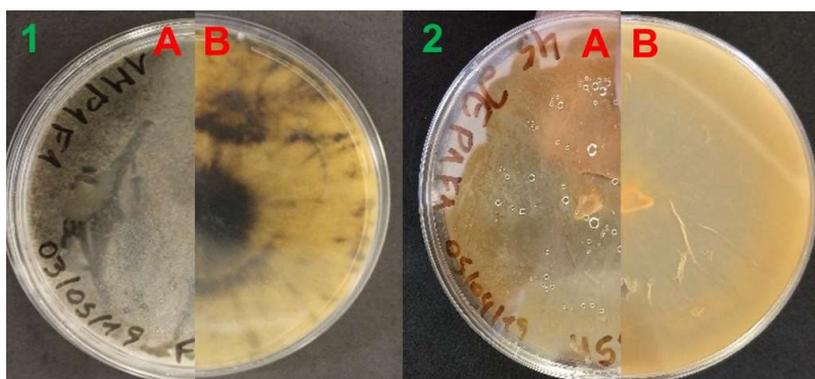
Considerando que há relatos na literatura que a idade da folha da hospedeira pode influenciar na colonização, coletamos folhas externas, do meio e internas para o isolamento (HILARINO et al., 2011). De forma geral, a partir das folhas externas foram isolados majoritariamente endófitos septados escuros (Figura 17), o que pode ser característico da produção de melanina por estes microrganismos. Considerando que os afloramentos rochosos são locais de alta incidência solar, sugere-se que estes microrganismos estão em simbiose com a hospedeira auxiliando na proteção contra a radiação solar (CORDERO; CASADEVALL, 2017). De fato, existem relatos na literatura de que fungos endofíticos septados escuros estão associados à resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo seca e contaminação por metais pesados e, dentre os mecanismos que podem estar associados a tal proteção, um dos fatores pode ser o teor de melanina (SANTOS et al., 2021).

**Figura 17** – Fungos endófitos septados escuros isolados majoritariamente das folhas externas. Fotos das placas: frente (A) e verso (B). Endófitos: 1EP1F2(1); 2EP1F1 (2); 3EP1F1 (3); 3EP2F2 (4); 4EP1F2 (5); 5EP2F3 (6);



Além do isolamento de fungos mesófilos, a presença de endófitos termofílicos foi prospectada neste trabalho. Microrganismos termofílicos são aqueles capazes de crescer em elevadas temperaturas, mínima de 40 °C e máxima de 70 °C, os quais vem sendo descritos na literatura como fonte de enzimas termoestáveis, porém pouco se conhece sobre os seus metabólitos secundários (GUO et al., 2011; ORFALI; PERVEEN, 2019). Tendo em vista o local da coleta, placas contendo fragmentos vegetais foram incubadas a 45 °C por até 30 dias, visando a bioprospecção de fungos endofíticos termofílicos. Apenas dois fungos (**Figura 18**) foram obtidos a partir deste isolamento, porém não foi possível estabelecer as culturas, uma vez que não obtivemos êxito no crescimento após o segundo repique. Um dos grandes desafios desse campo ainda é o estabelecimento de cultura laboratorial de cepas isoladas.

**Figura 18** – Fungos endófitos isolados na temperatura de 45 °C. Fotos das placas: frente (A) e verso (B). Endófitos: 1MP1F1-45 (1); 2EP1F1-45 (2).



#### 4.4.2. Identificação dos fungos endofíticos por sequenciamento genético

A identificação taxonômica precisa é muito importante nas comunicações científicas, pois permitem aos pesquisadores o agrupamento de informações que podem levar a repostas de evolução genética e podem também ajudar a prever classes de metabólitos bioativos. A região do ITS é utilizada como um marcador de código de barras (*barcode*) universal para identificação de fungos (RAJA et al., 2017; SCHOCH et al., 2012). A identificação de nossos isolados chegou em nível de gênero, pois é bem descrito na literatura que para uma caracterização em nível de espécie é necessário que diversas regiões sejam sequenciadas e

uma análise morfológica detalhada seja realizada em paralelo (RAJA et al., 2017).

Alguns fungos isolados, selecionados fenotipicamente, foram sequenciados, sua identificação e o código de acesso a suas sequências na base de dados do “*Genetic Sequence Database*” (GenBank) encontram-se na **Tabela 3**. Os fungos sequenciados não puderam ser identificados em nível de espécies, pois apresentaram alta similaridade com mais de uma espécie dentro do mesmo gênero, considerando a região do ITS sequenciada.

Os isolados 5MP2F4, 1IP2F2 e 2IP1F1-1 foram identificados como *Penicillium*, o isolado 5MP1F2 foi identificado como *Diaporthe* e o isolado 4IP2F1 como *Aspergillus*, que são gêneros dominantes encontrados como fungos endofíticos (RASHMI et al. 2019; GOMES et al., 2013).

O isolado 4MP1F3 foi identificado como uma espécie do gênero *Daldinia*, este é um táxon pouco relatado na literatura (STADLER et al., 2014), um exemplo de endófito relatado na literatura deste gênero foi a espécie *Daldinia cf. concentrica* descrita como um endófito de *Olea europaea L.* que apresentou ser um potencial produtor de compostos voláteis antifúngicos (LIARZI et al., 2016).

**Tabela 3** - Identificação de algumas linhagens isoladas pelo sequenciamento da região ITS do DNAr.

<b>Código laboratório</b>	<b>Identificação</b>	<b>Código GenBank</b>
5MP2F4	<i>Penicillium</i> sp.	OP879817
5MP1F2	<i>Diaporthe</i> sp.	OP880303
4IP2F1	<i>Aspergillus</i> sp.	OP879236
1IP2F2	<i>Penicillium</i> sp.	OQ534014
2IP1F1-1	<i>Penicillium</i> sp.	OQ534087
4MP1F3	<i>Daldinia</i> sp.	OQ534337
1EP1F2	<i>Neodeighntonia</i> sp.	OQ534864
1MP2F2	<i>Neodeighntonia</i> sp.	OQ534865
2EP1F1	<i>Neodeighntonia</i> sp.	OQ534866
3IP1F1	<i>Neodeighntonia</i> sp.	OQ534867

Os isolados, 1EP1F2, 1MP2F2, 2EP1F1, 3IP1F1, apesar de apresentarem morfologias macroscópicas diferentes entre si, foram identificados como *Neodeightonia*, sendo este um gênero pouco estudado na literatura (RASHMI et al. 2019).

#### 4.4.3. Obtenção dos extratos orgânicos do cultivo em BDA, avaliações antibacterianas e antibiofilme

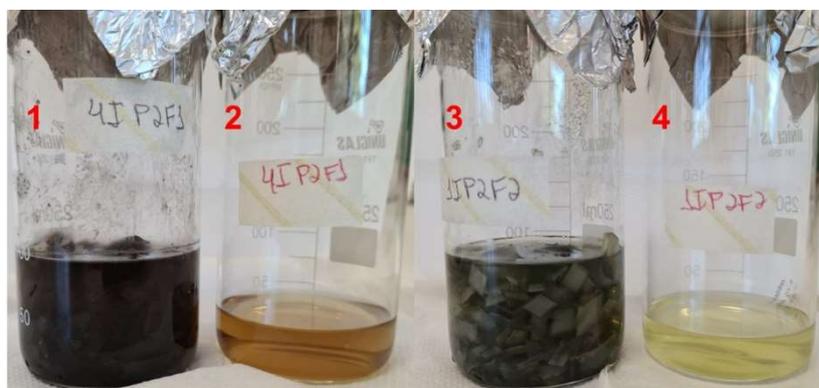
A eficácia da extração dos metabólitos dos fungos é um fator crítico para a avaliação da produção destes, por isso foi realizado um estudo de otimização para padronização do nosso método de obtenção dos extratos. Inicialmente, foram obtidos extratos com base no método de micro-extração descrita por John (2007), que consiste em retirar três secções de 6 mm de diâmetro do crescimento fúngico em placa de BDA, sendo uma secção do centro da colônia, uma da borda e outra entre estes, para representar a variabilidade de metabólitos em uma colônia (SMEDSGAARD, 1997). As secções foram transferidas para frascos de 1,5 mL seguida da adição de 1 mL da mistura metanol (MeOH), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) na proporção 1:2:3 (v/v) com 1 % de ácido fórmico. O frasco foi então incubado em banho de ultrassom por 60 minutos, centrifugado e a fase orgânica separada e seca para a obtenção do EB orgânico.

A fim de evitar o uso de solventes clorados, também se realizou a extração utilizando MeOH:AcOEt (1:1) com 1% de ácido fórmico, com base na metodologia de NIELSEN; SMEDSGAARD (2003). Os perfis cromatográficos dos EB obtidos foram semelhantes, porém os rendimentos dos EB foram insatisfatórios e impossibilitaram a realização da triagem biológica usando ambas as metodologias de extração.

A fim de obter uma massa maior de EB, realizou-se a extração de todo o material de crescimento micelial em placa de BDA (**Figura 19**). Essa metodologia tende a ser mais condizente com o potencial total da produção de metabólitos de um microrganismo a partir de uma dada condição. O volume de solvente e o número de extrações também foram avaliados, observou-se que acima de 20 mL, de uma mistura de solventes como MeOH:AcOEt (1:1) com 1% de ácido fórmico, por placa de crescimento fúngico, não se obtinha uma eficiência maior

de extração de metabólitos dos fungos. Os rendimentos dos EB obtidos encontram-se sumariados na **Tabela 4**.

**Figura 19** - Produção dos extratos brutos (EB) utilizando todo o crescimento em placa de BDA com os solventes extratores MeOH e AcOEt (1:1) com 1 % de ácido fórmico. Fotos 1 e 3: BDA + massa micelial, fotos 2 e 4: Extratos filtrados.



Dos 61 EB obtidos do crescimento dos isolados fúngicos em placa de BDA, 25 apresentaram CIM  $\leq 500$   $\mu\text{g/mL}$  frente a *S. aureus* (**Tabela 4**), o que sugere que os endófitos dos quais foram extraídos são promissores na proveniência de antibacterianos frente a bactérias gram-positivas. Apenas 7 EBs apresentaram CIM de 1000  $\mu\text{g/mL}$  frente a *K. oxytoca*, uma cepa gram-negativa. Não foi possível estabelecer relação entre o rendimento do processo extrativo e a atividade antibacteriana, ou seja, fungos com a maior capacidade de produzir extratos não necessariamente apresentaram boas atividades frente ao ensaio antimicrobiano. Além disso, nenhum dos indivíduos coletados se destacou como fonte específica das cepas ativas. Também não houve predominância morfológica entre estas.

**Tabela 4** - Atividade antibacteriana representada pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente a *S. aureus* e *K. oxytoca* e rendimento dos EB dos cultivos em BDA dos fungos endofíticos isolados de folhas de *B. balansae*. Rendimento em mg de extrato obtido por placa de crescimento. O rendimento % foi calculado com a relação da quantidade de massa micelial somada a massa de BDA / Rendimento do EB em mg.

Código Isolado	CIM <i>S. aureus</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM <i>K. oxytoca</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa EB BDA (mg)	Rendimento % EB/BDA
1EP1F2	250	NA	5,7	0,087
1EP2F1	250	NA	5,5	0,078

1EP2F2	500	NA	5,7	0,085
1IP2F1	125	NA	6,0	0,089
1IP2F2	125	1000	6,3	0,094
1IP2F4	125	1000	5,6	0,083
1MP2F2	NA	NA	10,47	0,069
2EP1F1	250	NA	9,06	0,065
2EP1F2	NA	NA	5,25	0,080
2IP1F1-1	250	1000	13,7	0,201
2IP1F1-2	125	NA	3,5	0,051
2IP2F1	250	NA	5,8	0,085
3EP1F1	1000	NA	4,3	0,065
3IP1F1	NA	NA	8,27	0,068
3IP1F2	NA	NA	2,4	0,043
3MP2F1	125	1000	22,4	0,193
3MP2F2	NA	NA	5,2	0,044
4EP1F4	NA	NA	3,4	0,028
4IP1F1	NA	NA	4,1	0,068
4IP1F3	NA	NA	18,34	0,109
4IP2F1	125	NA	8,1	0,122
4IP2F2	1000	NA	2,8	0,041
4MP1F1	500	NA	10,0	0,134
4MP1F3	NA	NA	10,18	0,078
4MP2F1	NA	NA	11	0,153
4MP2F2	NA	NA	5,9	0,041
5EP1F1	NA	NA	2,9	0,043
5EP2F2	NA	NA	4,1	0,062
5IP1F2	NA	NA	7	0,092
5IP2F1-1	NA	NA	3,2	0,044
5IP2F1-2	NA	NA	4,2	0,060
5IP2F2	NA	NA	2,7	0,038
5IP2F3	NA	NA	3	0,043
5IP2F4	500	NA	4,6	0,060
5MP1F1	NA	NA	5,1	0,073
5MP1F2	250	1000	5,1	0,083
5MP1F3	NA	NA	2,3	0,040
5MP2F1-1			2,7	0,035
5MP2F1-2	NA	NA	4,1	0,053
5MP2F2	NA	NA	2,9	0,070
5MP2F3	NA	NA	2,6	0,037
5MP2F4	32	NA	21,1	0,186
5MP2F5	500	1000	20,4	0,099
5MP2F5-1	NA	NA	3	0,041
5MP2F5-2	1000	1000	16	0,220
6EP1F1	NA	NA	2,2	0,038
6EP1F2	1000	NA	5,1	0,065

6EP2F2	500	NA	3,2	0,050
6EP2F3	NA	NA	3,8	0,054
6IP1F4	250	NA	1	0,023
6IP2F1	500	NA	2,8	0,051
6IP2F3	500	NA	4,7	0,085
6IP2F4	NA	NA	2,8	0,038
6MP1F1	500	NA	2,9	0,039
6MP1F2	NA	NA	3,7	0,053
6MP1F3-1	1000	NA	3,6	0,053
6MP1F4	1000	NA	3,2	0,059
6MP1F5	NA	NA	4,8	0,062
6MP2F1	500	NA	2,6	0,035
6MP2F3-2	500	NA	3	0,039
6MP2F4	500	NA	3	0,039

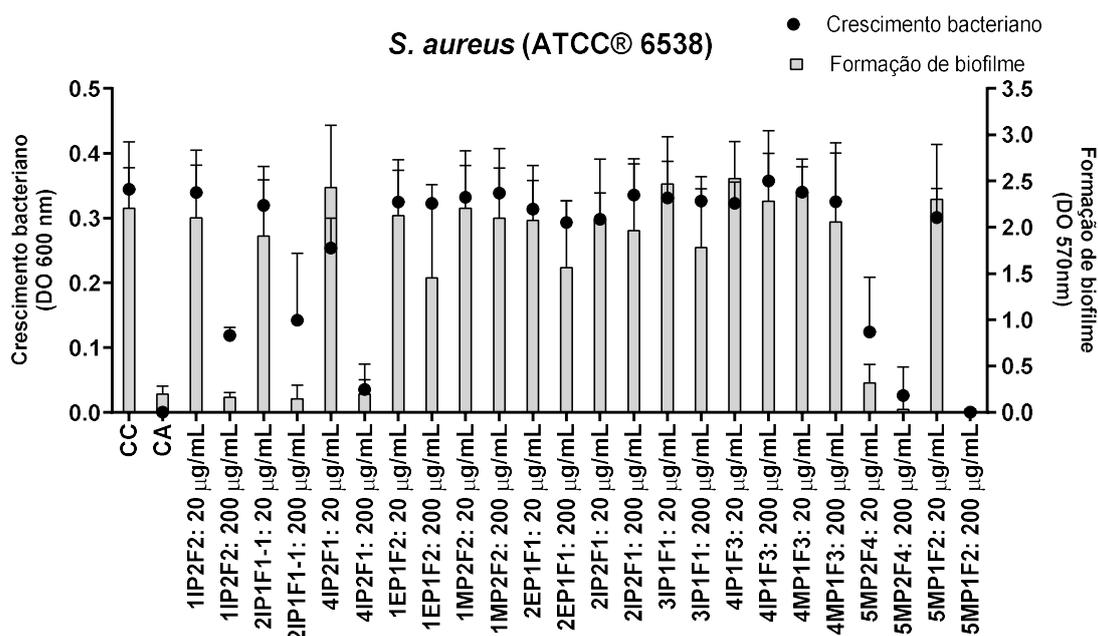
NA = não ativo; EB = Extrato bruto; BDA = batata dextrose ágar.

Além da avaliação dos EB dos cultivos em BDA contra bactérias patogênicas na forma planctônica pelo ensaio de microdiluição em caldo, outro ensaio foi realizado para observar se estes EB eram capazes de inibir a formação do biofilme bacteriano. Biofilmes são comunidades complexas de bactérias envoltas em uma matriz polimérica composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A resistência bacteriana pode estar associada a formação de biofilmes e isso aumenta de 10 a 1000 vezes mais a resistência aos efeitos dos agentes antibacterianos em relação às bactérias que se encontram em sua forma planctônica, sendo importantes alvos na descoberta de novos produtos para combater as infecções bacterianas (TRENTIN et al., 2011).

Na **Figura 20**, pode-se observar os resultados da triagem dos EB provenientes do meio de cultura BDA nas concentrações de 20 e 200 µg/mL frente a *S. aureus*, e na **Figura 21** frente a *P. aeruginosa*, tanto para o crescimento bacteriano quanto para a formação de biofilmes. Na concentração de 200 µg/mL, os isolados 1IP2F2, 2IP1F1-1, 4IP2F1, 5MP1F2 e 5MP2F4 inibiram mais que 90 % do crescimento bacteriano de *S. aureus* e a atividade antibiofilme está diretamente relacionada a atividade antibacteriana como pode ser observado no gráfico da **Figura 20**, na concentração de 20 µg/mL apenas o extrato de 5MP1F2 inibiu mais de 50%. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos nas avaliações biológicas iniciais.

Como pode ser observado na **Figura 21**, os EB dos meios de cultivo de BDA não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano e nem a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em nenhuma concentração avaliada.

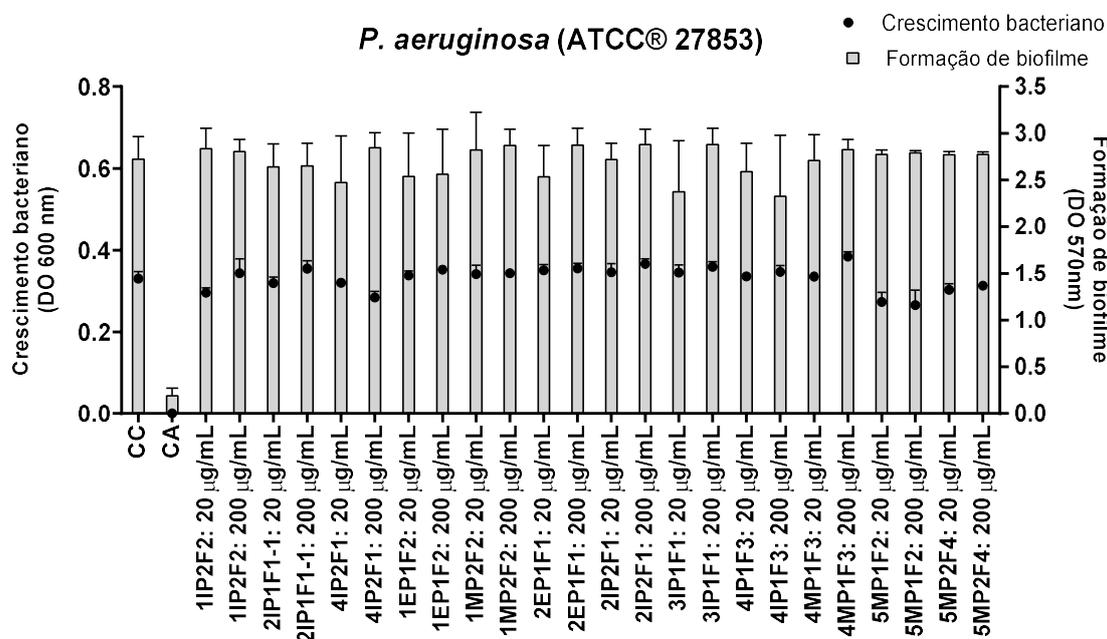
**Figura 20**– Avaliação da inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme dos EB de BDA (1IP2F2; 2IP1F1-1; 4IP2F1; 1EP1F2; 1MP2F2; 2EP1F1; 2IP2F1; 3IP1F1; 4IP1F3, 4MP1F3; 5MP1F2; 5MP2F4) frente a *S. aureus*. As barras representam o percentual de biofilme formado e os círculos representam o crescimento bacteriano. (CC = controle de crescimento, apenas meio de cultivo, CA = Controle de atividade, vancomicina a 20 µg/mL)



Pesquisadores avaliaram a atividade antimicrobiana de 385 extratos brutos de 150 fungos endofíticos de 12 espécies vegetais de mangue, destes 92 extratos apresentaram atividade frente a cepas bacterianas, sendo que 65 extratos inibiram o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, 70 extratos inibiram o crescimento de MRSA-SK1 e apenas dois extratos inibiram *P. aeruginosa* (RADIĆ; ŠTRUKELJ, 2012). Esses resultados corroboram com os nossos achados de que a descoberta de substâncias com potencial antibacteriano para *P. aeruginosa* é um grande desafio.

Desta maneira, os EB dos meios de cultivo BDA apresentaram atividade antibiótica clássica somente para *S. aureus* e nenhum efeito promissor para inibição da formação de biofilme bacteriano foi observado nas condições avaliadas.

**Figura 21** - Avaliação da inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme dos EB dos meios de cultivo BDA (1IP2F2; 2IP1F1-1; 4IP2F1; 1EP1F2; 1MP2F2; 2EP1F1; 2IP2F1; 3IP1F1; 4IP1F3, 4MP1F3; 5MP1F2; 5MP2F4) frente a *P. aeruginosa*. As barras representam o percentual de biofilme formado e os círculos representam o crescimento bacteriano. (CC = controle de crescimento, apenas meio de cultivo, CA = Controle de atividade, gentamicina a 20 µg/mL)



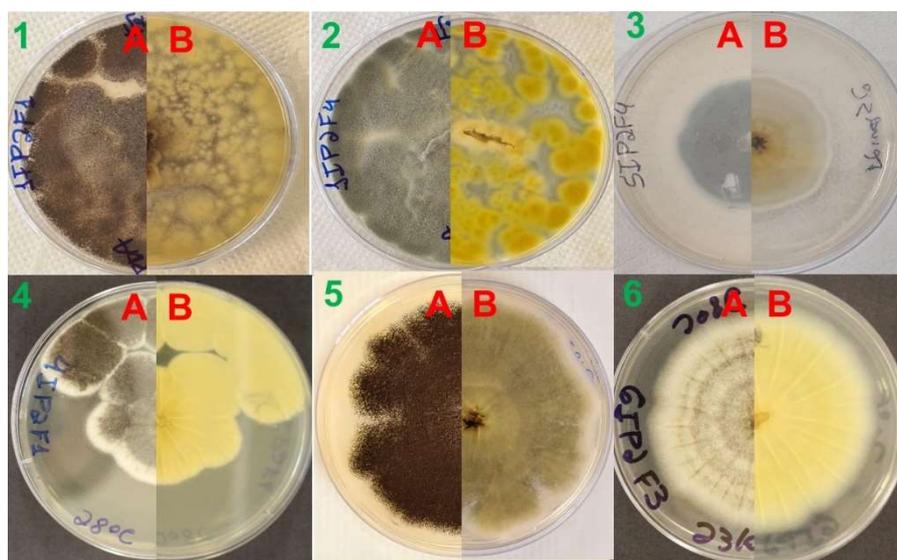
Assim, a cepa isolada 5MP2F4, a mais promissora no ensaio de atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* com CIM de 32 µg/mL, foi selecionada para o ensaio de OSMAC, análises metabolômicas e por rede molecular para a anotação dos possíveis metabólitos bioativos produzidos. Este estudo está descrito no capítulo 4 desta tese.

#### 4.4.4 Obtenção dos extratos orgânicos de cultivo em meio líquido e avaliações antibacteriana e antibiofilme

Com o intuito de avaliar a produção de metabólitos em meio de cultivo submerso, visando a cultura em escala maior, selecionamos algumas cepas que foram promissoras frente a *S. aureus* nas triagens iniciais dos EB do meio de cultivo de BDA que apresentaram CIM entre 125 e 250 µg/mL. Estas cepas selecionadas são as seguintes: 1IP2F1, 1IP2F2, 2IP1F1-1, 4IP2F1 e 5MP1F2.

Selecionamos também as cepas que apresentaram formação de exsudatos no crescimento em tubo inclinado de BDA que apresentaram MIC de 500 µg/mL, essas cepas são: 5IP2F4, 6IP2F3, 6MP1F4 e 6MP1F5. Para a triagem antibacteriana dos extratos de cultivo submerso dessas cepas selecionadas, o meio caldo de batata dextrose foi o escolhido. Na **Figura 22**, pode-se observar a variabilidade morfológica entre algumas das cepas selecionadas para o cultivo.

**Figura 22** - Endófitos isolados selecionados para cultivo em meio líquido. Fotos das placas: frente (A) e verso (B). Endófitos: 1IP2F1 (1); 1IP2F4 (2); 5IP2F4 (3); 4IP2F1 (4); 6MP1F4 (5); 6IP2F3 (6).



O método utilizado para a obtenção do EB pode interferir diretamente na diversidade e na riqueza dos metabólitos analisados, uma vez que diferentes processos extrativos e solventes extratores podem apresentar seletividades diferentes. Dentre as metodologias mais utilizadas para a obtenção de extratos dos fungos estão a maceração, a partição líquido-líquido (PLL) e a extração assistida por banho de ultrassom (EAU) (GUPTA et al., 2019).

Após o cultivo, os caldos foram separados dos micélios por filtração. Para obtenção dos extratos brutos de sobrenadante, foi utilizada a PLL utilizando AcOEt com 1% ácido fórmico. Para obtenção do extrato bruto de micélio, esses foram picotados e extraídos imediatamente com AcOEt e MeOH 1:1 (v/v) com 1% de ácido fórmico por extração assistida por banho de ultrassom (EAU). Os EBsob obtidos foram avaliados no ensaio de triagem antibacteriana.

De forma geral, os extratos provenientes dos micélios (EBmic) foram mais ativos do que os provenientes do extrato do sobrenadante (EBsob) (**Tabela 5**). Os EBmic do crescimento em meio líquido BD dos isolados 5IP2F4, 6IP2F3, 6MP1F4 e 6MP1F5 apresentaram CIM de 16, 62, 125 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente a cepa de *S. aureus*. Esses resultados foram mais promissores na busca por antibacterianos do que os resultados da triagem inicial com EB do meio de cultivo BDA, onde eles haviam apresentado CIM de 500  $\mu\text{g/mL}$  (**Tabela 4**). Esses dados nos sugerem que a avaliação de apenas uma forma de crescimento para a obtenção de extratos não é o suficiente para uma ampla e eficiente triagem biológica, além de demonstrar que os endófitos isolados possuem potencial para bioprospecção de produtos naturais bioativos frente a *S. aureus*. Essas cepas só foram selecionadas para o crescimento em meio líquido devido a observação visual da formação de exsudatos no crescimento em meio BDA em tubo de vidro, estes não foram observados em crescimento em placa de BDA.

Os extratos de sobrenadante dos isolados 1IP2F1, 1IP2F2, 1IP2F4, 2IP1F1-1, 4IP2F1, 5MP1F2 apresentaram valores de CIM entre 62 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto os extratos dos micélios se apresentaram com valores de CIM entre 16 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . As diferenças das atividades dos extratos EBsob e EBmic nos sugerem que estes podem ter composição química diferente, qualitativamente e/ou quantitativamente.

O isolado 1IP2F2 apresentou CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$  frente a *K. oxytoca*, uma bactéria gram-negativa, o que nos sugere que esse fungo pode produzir metabólitos bioativos frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dos demais extratos, nenhum outro foi capaz de inibir *K. oxytoca* nas concentrações avaliadas.

**Tabela 5** - Atividade antibacteriana representada pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente a *S. aureus* e *K. oxytoca* dos extratos de micélio (EBmic) e sobrenadante (EBsob) dos cultivos em BD, dos fungos endofíticos isolados das folhas de *B. balansae*.

<b>Código da cepa isolada-extrato bruto (EB)</b>	<b>CIM <i>S. aureus</i> (µg/mL)</b>	<b>CIM <i>K. oxytoca</i> (µg/mL)</b>
1IP2F1 - EBsob	250	NA
1IP2F1 - EBmic	16	NA
1IP2F2 - EBsob	62	250
1IP2F2 - EBmic	250	NA
1IP2F4 - EBsob	250	NA
1IP2F4 - EBmic	500	NA
2IP1F1-1 - EBsob	500	NA
2IP1F1-1 - EBmic	125	NA
4IP2F1 - EBsob	125	NA
4IP2F1 - EBmic	16	NA
5IP2F4 - EBsob	125	NA
5IP2F4 - EBmic	16	NA
5MP1F2 - EBsob	125	NA
5MP1F2 - EBmic	125	NA
6IP2F3 - EBsob	250	NA
6IP2F3 - EBmic	62	NA
6MP1F4 - EBsob	500	NA
6MP1F4 - EBmic	125	NA
6MP1F5 - EBsob	500	NA
6MP1F5 - EBmic	125	NA

NA = Não ativo

#### 4.4.5. Atividade *in vitro* antileishmania dos EB de fungos endofíticos frente a *L. infantum*

Alguns extratos brutos das cepas de fungos endofíticos isoladas neste trabalho foram avaliadas quanto ao seu potencial antileishmania, usando formas amastigotas de *L. infantum*. Os resultados obtidos nessas avaliações encontram-se sumariados na **Tabela 6**. Os índices de infecção variaram de 0,7 e 140 % em relação ao controle. Os extratos das cepas isoladas 6MP1F4, 6MP1F5, 1IP2F1 e 6IP2F3 foram os mais promissores com percentuais de inibição menores que 15 %, principalmente para EB BDA que foram aqueles obtidos a partir da extração dos fungos cultivados em meio sólido BDA. Neste contexto,

ressaltamos a atividade dos extratos EB BDA dos fungos 6MP1F5, 6MP1F4, 6IP2F3 e 1IP2F1 com índices de infecção de 0,7, 3,5, 6,6 e 10,8 %, respectivamente.

**Tabela 6** - Avaliação do potencial antileishmania dos EB das cepas isoladas: frente a formas amastigotas de *L. infantum*. O índice de infectividade foi calculado em relação ao percentual de inibição do controle. Todos os EB foram avaliados na concentração de 150 µg/mL.

Código da cepa isolada	Extrato bruto (EB)	Índice de infecção (%)
1MP2F2	EBsob	67,5
	EBmic	107,6
2EP1F1	EBsob	106,0
	EBmic	47,3
3IP1F1	EBsob	140
	EBmic	93,6
4MP1F3	EBsob	31,7
	EBmic	48,8
4IP1F3	EBsob	51,8
	EBmic	76,4
5MP1F2	EBsob	43,3
	EBmic	48,9
6MP1F4	EB BDA	3,5
	EBsob	25,5
	EBmic	59,8
6MP1F5	EB BDA	0,7
	EBsob	15,1
	EBmic	54,3
1IP2F4	EB BDA	18,7
	EBsob	61,7
	EBmic	37,3
1IP2F1	EB BDA	10,8
5IP2F4	EB BDA	46,4
6IP2F3	EB BDA	6,6

EBmic: extrato bruto de micélio; EBsob: extrato bruto de sobrenadante; EB BDA: extrato bruto do fungo cultivado em meio de BDA

Os extratos obtidos do meio submerso foram também avaliados quanto ao potencial antileishmania e, no geral, representaram atividades mais baixas do que aquelas observadas para os extratos EB BDA em amastigotas. Os extratos de EBsob mais promissores foram obtidos a partir dos fungos 6MP1F5, 6MP1F4 e 4MP1F3 com índices de infecção de 15,1, 25,5 e 31,7 %, enquanto o extrato mais promissor dentre os EBmic foi obtido do fungo 1IP2F4 com um índice de infecção de 37.3%.

Assim, demonstramos aqui que a prospecção com fungos endofíticos para a busca de compostos com atividade antileishmania é bastante promissora. Assim como a literatura mostra, porém, está prospecção com endófitos ainda é incipiente (HZOUNDA FOKOU et al., 2021; TOGHUEO, 2019) comparativamente a outras atividades estudadas como, por exemplo, antibacteriana (CAMPOS et al., 2015). Desta maneira, nosso trabalho abre perspectivas para estudos de novas e promissoras substâncias como agentes antiparasitários a partir de fungos endofíticos do Pantanal.

#### 4.4.6. Avaliação da citotoxicidade frente a células leucêmicas

A leucemia mieloide crônica (LMC) é um tipo de distúrbio mieloproliferativo ou neoplasia mieloproliferativa que é responsável por cerca de 15 % de todos os casos de leucemia em adultos (BURKNER et al., 2023). Como muitos outros tipos de câncer, a LMC pode ser difícil de tratar em estágios avançados, sendo esta linhagem um bom modelo para ensaios de triagem de extratos.

Aqui investigamos o potencial citotóxico dos EB de alguns fungos endofíticos isolados de *B. balansae* frente as células Kasumi e KG-1 que são linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (LMA), um tipo de câncer do sangue que se desenvolve nas células produtoras de sangue na medula óssea. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na **Tabela 7**.

Os resultados mais promissores frente a linhagem KG-1 foram os extratos 1IP2F1 (EB BDA), 6IP2F3 (EB BDA), 1IP2F4 (EB BDA), 1IP2F4 (EBsob), 6MP1F4 (EB BDA), 6MPIF4 (EBsob) e 6MP1F5 (EB BDA) inibiram mais que 90 % do crescimento celular. Com relação as avaliações frente a linhagem Kasumi, apenas o extrato 1IP2F4 (EB BDA) atingiu este potencial e exibiu uma inibição de 92%.

No período de 2016 a 2020 foram reportados 205 novos metabólitos secundários citotóxicos provenientes de fungos endofíticos, segundo a revisão de PRAJAPATI et al. (2021). Os gêneros fúngicos explorados com maior frequência foram: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Fusarium* e

*Pestalotiopsis*. Em termos de diversidade química, policetídeos, terpenoides, esteróis, macrólídeos, lactonas, azafilonas e alcalóides, foram as classes mais descritas. Dentre os estudos listados apenas um foi do Brasil, DE AMORIM *et al.* (2019) reportaram esporulosaldeína F, um derivado de benzopirano, com potencial citotóxico frente as linhagens LM3 (adenocarcinoma mamário de murino) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) com IC<sub>50</sub> de 39.2 e 34.4 µM respectivamente.

**Tabela 7** - Avaliação do potencial citotóxico dos extratos brutos (EB) das cepas isoladas 4IP1F3; 4MP1F3; 1MP2F2; 2EP1F1; 3IP1F1; 1EP1F2; 1IP2F1; 5IP2F4; 6IP2F3; 1IP2F4; 6MP1F4; 6MP1F5; frente as linhagens de células leucêmicas Kasumi e KG-1.

Fungo	Tipo de EB	Viabilidade celular (%)*	
		Kasumi	KG-1
4IP1F3	EBsob	78	77
	EBmic	91	93
4MP1F3	EBsob	40	22
	EBmic	85	80
1MP2F2	EBsob	78	72
	EBmic	88	86
2EP1F1	EBsob	81	71
	EBmic	108	95
3IP1F1	EBsob	98	96
	EBmic	87	89
1EP1F2	EBsob	86	92
	EBmic	89	94
1IP2F1	EB BDA	64	5
5IP2F4	EB BDA	60	80
6IP2F3	EB BDA	37	5
1IP2F4	EB BDA	8	5
	EBsob	68	6
	EBmic	98	100
6MP1F4	EB BDA	57	5
	EBsob	57	8
	EBmic	71	43
6MP1F5	EB BDA	24	6
	EBsob	81	45
	EBmic	70	40

EBmic: extrato bruto de micélio; EBsob: extrato bruto de sobrenadante; EB BDA: extrato bruto do fungo cultivado em meio de BDA; \* Todos os EB foram avaliados na concentração de 100 µg/mL.

Nossos resultados ressaltam como o estudo de PN provenientes de fungos endofíticos pode ser importante para a descoberta de novos candidatos, uma vez que observamos extratos com resultados bastantes promissores, principalmente, considerando a biodiversidade ainda a ser explorada no Pantanal.

#### 4.4.7 Análise do perfil químico do isolado 4IP2F1 *Aspergillus* sp.

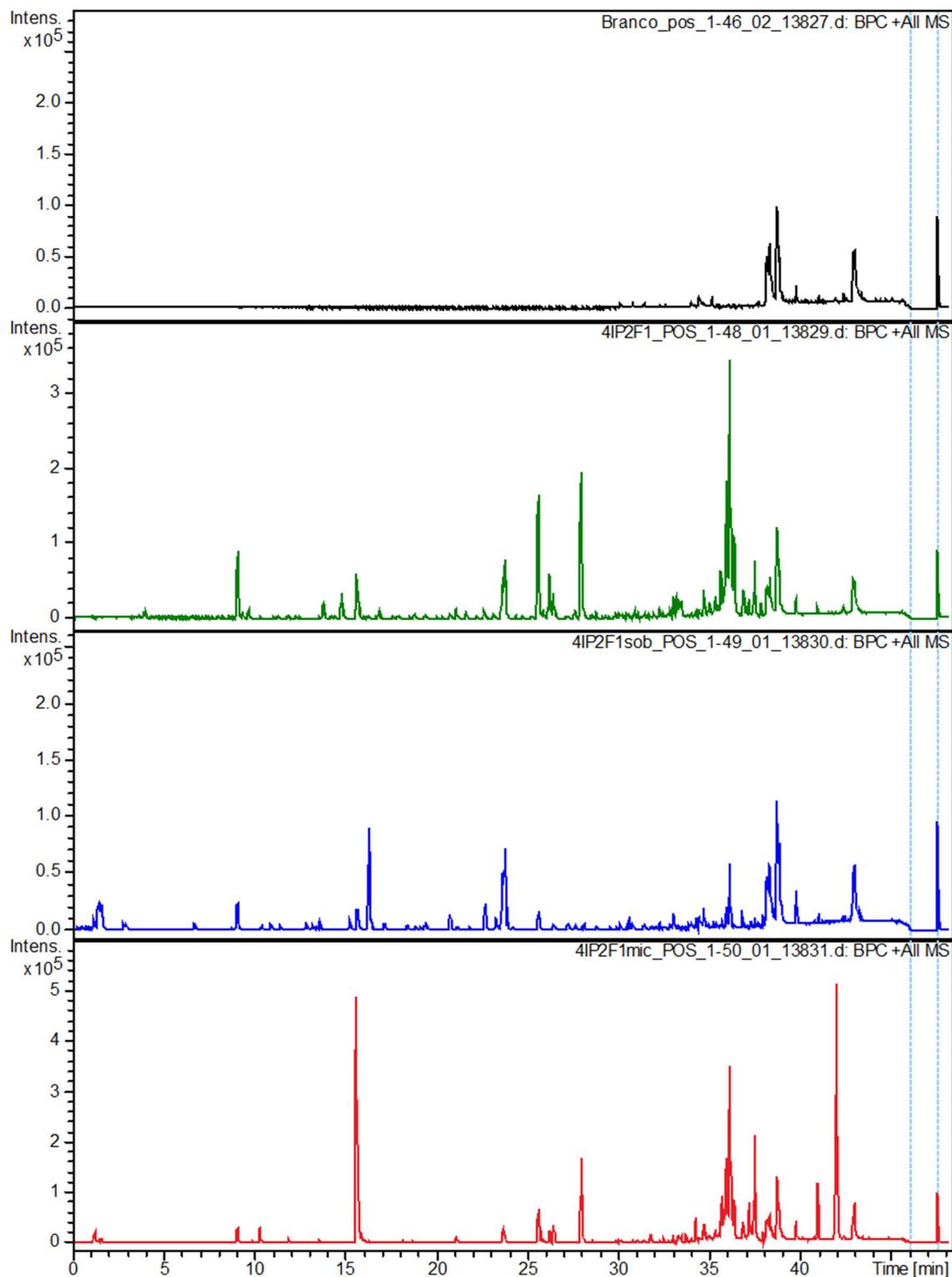
Foram analisados os perfis químicos dos extratos brutos provenientes do cultivo em placa de BDA (batata-dextrose-ágar) (EB BDA) e dos extratos provenientes dos sobrenadantes (EBsob) e dos micélios (EBmic) do cultivo em meio submerso com caldo BD (batata-dextrose).

A anotação dos metabólitos, foi realizada a partir dos dados espectrais das análises por CLAE-DAD-EM/EM, baseada em seus espectros de UV, de massas em alta resolução e perfil de fragmentação comparados a dados descritos na literatura, incluindo a comparação através da plataforma GNPS.

Os perfis químicos dos extratos EB DBA, EBsob e EBmic, do isolado *Aspergillus* sp. 4IP2F1, obtidos nas análises por CLAE-EM estão apresentados na **Figura 23**. Os dados dos constituintes dos extratos brutos como tempo de retenção (TR), fórmula molecular, espectro ultravioleta (UV) e seus íons protonados e desprotonados encontram-se sumariados na **Tabela 8**.

A partir dos dados sumariados e dos cromatogramas de EB BDA, EBsob e EBmic, pode-se observar diferenças na produção de substâncias entre as três condições de cultivo. O extrato de BDA de *Aspergillus* sp. 4IP2F1 foi o que mais apresentou substâncias exclusivas, ou seja, encontradas apenas nessa condição de cultivo.

**Figura 23** – Cromatogramas de pico base correspondentes aos extratos brutos obtidos do fungo *Aspergillus* sp. 4IP2F1 obtidos no modo de ionização positivo por CLAE-EM. A: Branco do sistema; B: Extrato bruto de BDA (EB BDA); C: Extrato bruto do cultivo em BD do sobrenadante (EBsob); D: Extrato bruto do cultivo em BD do micélio (EBmic).



**Tabela 8** - Dados espectrais e de ocorrência dos constituintes dos extratos brutos de *Aspergillus* sp. 4IP2F1 por CLAE-DAD-EM.

Pico	TR (min)	FM	UV (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> EM/EM	Composto	EB BDA	EBsob	EBmic
1	1,1	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-	181,0717	-	-	Sorbitol/manitol	-	-	x
2	1,2	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	-	-	184,0635	-	-	-	-	x
3	1,4	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	-	191,0192	-	173	Ácido cítrico	-	x	-
4	1,5	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	-	191,0192	-	173	Ácido isocítrico	-	x	x
5	1,6	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-	-	317,133	-	-	-	-	x
6	2,8	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	-	205,0350	229,0297*	-	Metil isocitrato	-	x	-
7	4	-	-	-	290,0434	-	-	x	-	-
8	6,7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	-	-	171,0277	-	-	-	x	-
9	9	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> /C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	-	233,1037	235,1181	-	-	X	x	x
10	9,3	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	261,1221	233, 207, 154	Ciclo (Pro-tyr)	x	-	-
11	9,7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	197,1272	169, 152	Ciclo (Pro-Val)	x	-	-
12	10,3	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	346,2117	-	-	-	-	x
13	10,9	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	-	225,0746	-	-	-	x	-
14	11,9	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	346,2118	-	-	-	-	x
15	12,8	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	-	-	197,0435	-	-	-	x	-
16	13,2	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	-	351,1095	335,11	-	-	-	x	-
17	13,6	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	412,222	-	-	-	x	x
18	13,8	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	211,1431	183, 165, 154	Ciclo (Leu/Ile-Pro)	x	-	-
19	14,8	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	211,1432	183, 167, 154	Ciclo (Leu/Ile-Pro)	x	-	-
20	15,2	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	-	253,1088	-	-	-	-	x	-
21	15,6	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	360,2278	-	-	x	x	x
22	15,6	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	-	273,1337	-	-	-	x	-	-
23	16,2	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	-	365,1251	-	-	-	-	x	-
24	16,8	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	245,1275	-	-	x	-	-

25	17,1	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	298	281,1036	-	-	-	-	x	-
26	18,8	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	360,1915	-	-	x	-	-
27	19,5	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-	-	235,0948	-	-	x	x	-
28	20,7	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	-	321,1349	323,1467	-	-	x	x	-
29	21,1	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O	-	-	350,2217	-	-	x	-	x
30	21,6	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-	-	542,2485	-	-	x	-	-
31	22,6	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	-	-	263,1629	-	-	x	-	-
32	22,7	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-	233,082	235,0952	-	-	-	x	-
33	23,1	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-	-	420,1665	152, 234, 261, 289, 307, 336, 386	Gladicolina B	x	-	-
34	23,3	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-	-	235,0953	-	-	-	x	-
35	23,6	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>	293	264,0874	266,1018	-	-	x	x	x
36	23,6	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	-	379,1401	-	-	-	-	x	-
37	23,8	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	374,2069	-	-	x	x	x
38	25,6	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	289, 330	432,1672	434,1817	162, 234, 261, 289, 318, 334, 388	Meleagrina	x	x	x
39	25,9	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	464,2536	-	-	x	-	-
40	26,2	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-	492,249	494,2641	-	-	x	-	x
41	26,4	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	464,2538	-	-	x	-	x
42	27,2	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-	285,0416	287,0549	171, 185, 213, 241, 251, 269	Calixantona	-	x	-
43	27,6	-	-	-	173,1311	-	-	x	-	-
44	28	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	478,2704	-	-	x	-	x
45	28,1	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	290, 440	313,0344	297,0384 <sup>#</sup>	185, 213	Endocrocina	x	x	-
46	28,5	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	462,2738	-	-	x	-	-
47	28,8	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-	-	343,0917	-	-	x	-	-
48	29,9	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	448,259	-	-	x	-	-
49	30	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	-	-	381,06	-	-	x	-	-
50	30,1	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-	303,1231	-	-	-	-	x	x
51	30,5	-	-	-	824,3105	-	-	x	x	-
52	30,7	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	-	-	333,1641	-	-	-	x	-

53	30,9	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	-	673,1806	675,1912	-	-	x	-	-
54	31	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	523,2569	525,2705	-	-	x	-	-
55	31,4	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> O <sub>11</sub>	-	665,2993	689,2981	-	-	x	-	-
56	31,7	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	-	432,264	-	-	x	-	-
57	31,8	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	-	-	537,2489	-	-	-	-	x
58	31,8	-	-	349,0016	-	-	-	-	-	x
59	31,9	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	-	673,1752	675,1927	-	-	x	-	-
60	32,3	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	-	299,0936	301,1061	-	-	-	x	-
61	32,3	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	-	655,1668	657,1811	193, 293, 395, 455, 519, 579	Ergocromo	x	-	-
62	32,5	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O	-	-	418,2851	-	-	x	-	-
63	32,8	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	-	655,1696	657,1806	193, 289, 357, 395, 455, 519, 561, 579	Ergocromo	x	-	-
64	33	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	274,2733	-	-	x	-	-
65	33,1	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-	-	313,1393	-	-	-	x	-
66	33,1	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-	299,057	-	-	-	-	x	-
67	33,2	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	283, 358	-	657,1807	193, 311, 395, 455, 519, 561, 597	Ergocromo	x	-	-
68	32,5	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O	-	-	418,2843	-	-	-	-	x
69	33	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	274,2728	-	-	-	-	x
70	33,3	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	-	546,2722	548,2853	-	-	x	-	x
71	33,5	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	-	-	657,1802	193, 299, 395, 455, 501, 519, 579	Ergocromo	x	-	x
72	33,9	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	-	-	311,1233	-	-	-	x	-
73	33,7	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	-	-	657,1811	183, 377, 413, 455, 519, 579	Ergocromo	x	-	x
74	34	-	-	-	251	-	-	x	-	-
75	34,2	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	-	639,1689	193, 261, 319, 395, 455, 561	Ergocromo	x	-	-
76	34,3	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	284, 340	-	521,2546	213, 264, 308, 360, 447, 503	Okaramine A/H	-	-	x
77	34,7	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	-	639,1705	193, 261, 319, 377, 455, 579	Ergocromo	x	x	X
78	34,7	-	-	635,1434	-	-	-	x	-	-
79	34,8	-	-	181,0518	-	-	-	-	x	-
80	34,9	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-	269,0465	-	-	-	x	x	-

81	35	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	-	639,169	183, 377, 455, 501, 579	Ergocromo	x	-	-
82	35,2	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	-	-	311,1244	-	-	-	x	-
83	35,3	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	215,1419	-	-	x	-	-
84	35,3	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	-	639,1707	193, 261, 319, 395, 455, 579	Ergocromo		-	x
85	35,3	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	-	539,2663	-	-	-	x	-	x
86	35,7	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,1578	639,1709	193, 273, 377, 455, 501, 561	Ergocromo	x	x	x
87	35,8	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	-	539,2662	-	-	-	x	-	-
88	35,9	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,1573	639,171	183, 377, 455, 501, 561	Ergocromo	x	x	x
89	36,1	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,157	639,172	183, 377, 455, 501, 461	Ergocromo	x	x	x
90	36,1	C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-	-	521,2524	-	-	X	-	x
91	36,4	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,157	639,171	183, 377, 455, 501, 561	Ergocromo	x	-	x
92	36,8	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	-	581,2269	583,239	-	-	-	x	-
93	36,9	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	267, 338	637,157	639,1708	183, 377, 431, 501, 561	Ergocromo	x	-	x
94	36,9	C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-	-	525,2856	198, 254, 328, 383, 439	Okaramine J	x	-	x
95	37	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,157	639,1692	183, 308, 377, 501, 561	Ergocromo	x	-	-
96	37,2	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,157	639,1701	183, 377, 483, 501, 561	Ergocromo	x	-	x
97	37,3	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	-	557,2269	-	-	-	-	x	-
98	37,5	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-	637,157	639,1714	183, 377, 501, 561	Ergocromo	x	x	x
99	37,9	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	-	-	545,2496	-	-	x	-	-
100	37,9	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>13</sub>	-	583,2402	585,2532	-	-	-	x	x
101	40,2	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	-	385,2745	387,2886	-	-	-	-	x
102	41	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	-	383,2589	385,2732	-	-	-	-	x
103	42	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	-	-	369,2789	-	-	-	-	x
104	43	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> NO	-	-	406,3098	-	-	-	-	x

TR: tempo de retenção (min); FM: fórmula molecular; UV: espectro ultravioleta; EB BDA: extrato bruto do fungo cultivado em meio BDA; EBSob: Extrato bruto do cultivo em BD do sobrenadante; EBmic: Extrato bruto do cultivo em BD do micélio; #: [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; \*: [M+Na]<sup>+</sup>. Fórmulas moleculares determinadas considerando erros e mSigma menores que 8 ppm e 30, respectivamente. Pro: Prolina; Tyr: Tirosina; Val: Valina; Leu: Leucina; Ile: Isoleucina.

Os espectros de massas dos picos **10**, **11**, **18** e **19** em modo de ionização positiva exibiram perfis de fragmentação semelhantes. Essas substâncias foram anotadas como dicetopiperazinas (FURTADO et al., 2007; XING et al., 2008).

Os espectros de massas dos picos **75**, **77**, **81**, **84**, **86**, **88**, **89**, **91**, **93**, **95**, **96** e **98**, exibiram um pico intenso relativo ao íon protonado de  $m/z$  639, sendo compatíveis com a fórmula molecular  $C_{32}H_{30}H_{14}$ . Essas doze substâncias apresentaram compatibilidade com a mesma fórmula molecular e perfis de fragmentação semelhantes, os quais podem ser observados na **Tabela 8**. Os espectros na região do ultravioleta (UV) desses compostos revelaram duas bandas de absorção em 267 e 338 nm, sendo estas compatíveis com os cromóforos de ergocromos (ANDERSEN et al., 1977; WEZEMAN; BRÄSE; MASTERS, 2014). Uma dessas substâncias foi anotada como ácido secalônico de acordo com a busca nas bases de dados do GNPS. Ácido secalônicos são ergocromos, dímeros de xantonas, que já foram descritos em extratos de *Aspergillus* sp. (FAROOQ et al., 2020; WEZEMAN; BRÄSE; MASTERS, 2014).

Os espectros de massas dos picos **61**, **63**, **67**, **71**, **73**, em modo de ionização positiva, exibiram íon intenso de  $m/z$  657  $[M+H]^+$ , o que sugeriu a fórmula molecular  $C_{32}H_{32}H_{15}$  para todos eles. Esses cinco metabólitos também apresentaram perfis de fragmentação semelhantes, indicando serem isômeros (**Tabela 8**). Os espectros de UV desses compostos revelaram duas bandas de absorção com  $\lambda_{max} \approx 283$  e 358 nm. Além disso, o íon fragmento  $m/z$  455, que também está presente nas fragmentações dos ácidos secalônicos, sugere que todas essas substâncias pertencem ao grupo dos ergocromos.

O espectro de massa do pico **33** exibiu um íon intenso de  $m/z$  420,1665  $[M+H]^+$ , o que é compatível com a fórmula molecular  $C_{22}H_{21}N_5O_4$ . Este composto foi anotado na base de dados do GNPS através de comparações espectrais como o alcaloide indólico glandicolina B. Enquanto que, o metabólito **38**, correspondente ao íon  $m/z$  434,1672  $[M+H]^+$ , apresentou fórmula molecular  $C_{23}H_{23}N_5O_4$ , sendo anotado na base de dados do GNPS como o alcaloide indólico meleagrina. Esse composto apresentou bandas de absorção com  $\lambda_{max} \approx 289$  e 330 nm, como descrito na literatura (KAWAI et al., 1984). Além disso, as fragmentações observadas para **33** e **38** foram compatíveis com os dados descritos na literatura para esses compostos anotados (ALI et al., 2013).

Meleagrina e glandicolina B são alcaloides indólico prenilados e possuem diversas atividades biológicas já reportadas como, por exemplo, anticancerígena, antibiótica, antiparasitária e inseticida (NEWMISTER et al., 2018).

O espectro de massa do pico **42** apresentou um íon protonado de  $m/z$  287,0549  $[M+H]^+$  e fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_6$ , sendo anotado na base de dados do GNPS como calixantona. Esta substância e outros ergocromos já foram isolados a partir de extratos de *Penicillium* sp.. A calixantona exibiu atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* com CIM de 46, 39 e 38  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (YONG et al., 2021). Além disso, essa substância também exibiu atividade antiproliferativa frente a células de glioma U87MG com  $IC_{50}$  de 46,6  $\mu\text{M}$  (YONG et al., 2021).

O metabólito **45** revelou duas bandas de absorção em seu espectro de UV em 290 e 440 nm, enquanto em seus espectros de massas revelou um íon intenso de  $m/z$  313,0344, sugerindo a fórmula molecular  $C_{16}H_{10}O$ . Esses dados espectrais são compatíveis com endocrocina, um metabólito já descrito em extratos de *Aspergillus* sp. (NEUBAUER et al., 2016).

O pico **94** apresentou um íon intenso de  $m/z$  525,2856  $[M+H]^+$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{32}H_{36}N_4O_3$ . A partir das comparações e busca na base de dados do GNPS, o metabólito **94** foi anotado como okaramine J. Este composto e os ácidos secalonicos já foram descritos em extratos de *Aspergillus aculeatus* (PETERSEN et al., 2014). O pico **76** exibiu íon de  $m/z$  521,2546  $[M+H]^+$ , sugerindo a fórmula molecular  $C_{32}H_{32}N_4O_3$ . Esse metabólito foi anotado como uma okaramina e em buscas na literatura, comparando dados espectrais e ocorrência, esse foi então anotado como okaramina A/H.

## *Capítulo 4*

## 5. Capítulo 4

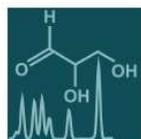
Estratégias metabolômicas para melhorar as informações químicas de estudos OSMAC de fungos endofíticos.

O conteúdo deste capítulo é composto pelo artigo intitulado “*Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi*”, publicado no periódico *Metabolites*. A reprodução deste documento pelos autores é autorizada sob os termos da Creative Commons Attribution 4.0 license (anexo 9.2).

Referência:

SILVA, F. M. R. et al. Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. **Metabolites**, v. 13, p. 236, 2023.

Versão final publicada disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-1989/13/2/236#B13-metabolites-13-00236>



*metabolites*

IMPACT  
FACTOR  
5.581

Indexed in:  
PubMed

Article

---

# Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi

---

Fernanda Motta Ribeiro da Silva, Gecele Matos Paggi, Flávia Roberta Brust, Alexandre José Macedo and Denise Brentan Silva

Special Issue

Metabolomics in Natural Products

Edited by

Dr. Hamidreza Ardalani and Dr. Peter Spégel



<https://doi.org/10.3390/metabo13020236>

Article

# Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi

Fernanda Motta Ribeiro da Silva <sup>1</sup>, Gecele Matos Paggi <sup>2</sup>, Flávia Roberta Brust <sup>3</sup>, Alexandre José Macedo <sup>3</sup> and Denise Brentan Silva <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LaPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology (LEBio), Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil

<sup>3</sup> Biofilms and Diversity Laboratory, Faculty of Pharmacy and Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

\* Correspondence: denise.brentan@ufms.br

**Abstract:** Metabolomics strategies are important tools to get holistic chemical information from a system, but they are scarcely applied to endophytic fungi to understand their chemical profiles of biosynthesized metabolites. Here *Penicillium* sp. was cultured using One Strain Many Compounds (OSMAC) conditions as a model system to demonstrate how this strategy can help in understanding metabolic profiles and determining bioactive metabolites with the application of metabolomics and statistical analyses, as well as molecular networking. *Penicillium* sp. was fermented in different culture media and the crude extracts from mycelial biomass (CEm) and broth (CEb) were obtained, evaluated against bacterial strains (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), and the metabolomic profiles by LC-DAD-MS were obtained and chemometrics statistical analyses were applied. The CEm and CEb extracts presented different chemical profiles and antibacterial activities; the highest activities observed were against *S. aureus* from CEm (MIC = 16, 64, and 128 µg/mL). The antibacterial properties from the extracts were impacted for culture media from which the strain was fermented. From the Volcano plot analysis, it was possible to determine statistically the most relevant features for the antibacterial activity, which were also confirmed from biplots of PCA as strong features for the bioactive extracts. These compounds included **75** (13-oxoverruculogen isomer), **78** (austalide P acid), **87** (austalide L or W), **88** (helvamide), **92** (viridicatumtoxin A), **96** (austalide P), **101** (dihydroaustalide K), **106** (austalide k), **110** (spirohexaline), and **112** (pre-viridicatumtoxin). Thus, these features included diketopiperazines, meroterpenoids, and polyketides, such as indole alkaloids, austalides, and viridicatumtoxin A, a rare tetracycline.

**Keywords:** metabolomics; OSMAC; molecular networking; bioprospection



**Citation:** da Silva, F.M.R.; Paggi, G.M.; Brust, F.R.; Macedo, A.J.; Silva, D.B. Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. *Metabolites* **2023**, *13*, 236. <https://doi.org/10.3390/metabo13020236>

Academic Editors: Hamidreza Ardalani and Peter Spéjel

Received: 7 January 2023

Revised: 26 January 2023

Accepted: 3 February 2023

Published: 5 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The search for natural products with biological activities from endophytic fungi is imminent, due to their remarkable ability to biosynthesize compounds with high levels of structural complexity and prominent pharmacological properties [1,2]. Endophytic fungi have a valuable biosynthetic arsenal for the biotechnological production of promising compounds for the pharmaceutical, agricultural, and food industries; moreover, they are compatible with Sustainable Development Goals [3]. In addition, microorganisms are important sources of molecules that can act against human and animal diseases, such as cancer and bacterial infections. Thus, they are notable for the research and development of new antibacterials, which are drugs in high demand due to the current global crisis of bacterial infections [4].

The regulation of the biosynthesis of natural products is complex and the conditions under which the microorganisms are cultivated can drastically influence the production

of metabolites [5]. The application of new strategies to get bioactive compounds has been an alternative to improve the current natural product research and access new products. Traditional bioprospection studies from fungi require large-scale growth to produce extracts and often can lead to the re-isolation of known substances [6]. Microorganisms have an untapped biosynthetic arsenal due to the typical growth conditions in the laboratory, and several methodologies to increase the chemical diversity by the induction of silenced gene clusters have been described, such as co-cultivation, the addition of elicitor molecules, and One Strain Many Compounds (OSMAC) strategy [7]. The OSMAC concept is based on the hypothesis that changes in cultivation parameters can modify the biosynthetic profiles of microorganism strains that can increase the variability of compound production by a single strain and lead to the discovery of new compounds or increase the production of a specific metabolite [8]. OSMAC strategy is gaining prominence due to the low investment required and its promising results.

Metabolomics can be defined as a comprehensive analysis of metabolites to get the metabolic information of low weight (<1000 Da) from an organism or biological system [9]. The metabolomics associated with chemometric tools is a useful tool to get holistic chemical information [10] from microorganisms, resulting in a broad view of metabolite production, as well as assisting the appointments of metabolic pathways, global metabolism of cells, and giving a direction for the selection of metabolites of interest, such as bioactive metabolites for isolation procedures [11]. In addition, metabolomics can contribute to different research fields, for example, fungal classification and identification, metabolic pathways, the comprehension of plant-fungal chemical interactions, and the discovery of fungal natural products [12]. However, fungal metabolomics is still under development, and the databases of fungal metabolites remain singular and incomplete [9].

Given that there is still no consensus for an initial and wide investigation of metabolite production capacity by endophytic fungi and that the choice of culture medium influences this biosynthetic production from the microorganisms, here we aimed to evaluate the metabolites produced by the strain *Penicillium* sp. 5MP2F4 applying the OSMAC strategy and screening the antibacterial and antibiofilm activities. Additionally, we aimed to get broad chemical information by metabolomics and chemometrics tools.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Fungal Material and Identification of Strain

The strain *Penicillium* sp. 5MP2F4 (Figure S1, Supporting Information) was isolated in May 2019 from leaves of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae), a bromeliad species occurring in the ironstone outcrops of the Pantanal biome in Brazil. The fungal strain was identified according to morphological traits and ITS rDNA sequence analysis, as reported by Cassemiro et al. [13]. The sequence data were submitted to GenBank with accession n<sup>o</sup> OP879817. The strain was deposited at the library of the Federal University of Mato Grosso do Sul. The study was registered under the number AE8625B in the National Genetic Heritage Management System (SisGen).

### 2.2. OSMAC-Based Cultivation of Fungi

The strain was incubated in five different culture media to activate biosynthetic gene clusters [8]. The submerged culture media were the following: PDB (Potato Dextrose Broth—potato infusion (infusion from 200 g/L of potatoes) and 20 g/L of dextrose); MEB (Malt Extract Broth—dextrose 6 g/L, malt extract 6 g/L, maltose 1.8 g/L, and yeast extract 1.2 g/L); YPD (Yeast extract Peptone Dextrose—yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, and dextrose 20 g/L); SAB (Sabouraud—peptone 10 g/L, and dextrose 40 g/L); CZA (Czapek—sucrose 30 g/L, NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, and FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L).

The fungus 5MP2F4 was initially cultivated on PDA (Potato Dextrose Agar—Infusion broth of 200 g/L potatoes, 20 g/L dextrose, and 15 g/L agar) and then a pre-inoculum was prepared on submerged PDB medium and cultured under static conditions for 7 days at

28 ± 2 °C. The OSMAC experiment was performed in submerged culture media, under static conditions, in the absence of light, and in Erlenmeyer flasks, each containing 150 mL of medium and 5 mL of pre-inoculum for inoculation. The experiments were performed in triplicate incubated for 16 days, and subsequently, they were pooled to produce one sample for each culture medium.

### 2.3. Extraction from Broth and Mycelial Biomass

From liquid cultures of OSMAC experiments, the crude extracts (CE) from broth (CEb) and mycelial biomass (CEm) were obtained after fermentation for 16 days. The mycelial biomass was separated from the broth by filtration. The broth was extracted by liquid-liquid extraction using ethyl acetate containing 1% formic acid, and the compounds with higher affinity for the organic phase were extracted based on their partition coefficient. The organic phase was separated and concentrated by rotary evaporation (Buchi, São Paulo, Brazil) to yield the CEb extract.

The biomass materials were lyophilized, pulverized, and then extracted with ethyl acetate and methanol 1:1 (*v/v*) added 1% formic acid by ultrasonic bath for 10 min. This methodology was previously optimized, and the results were better for the extraction (qualitative and quantitative). After the extraction, the mycelium was discarded, and the organic phase was concentrated by rotary evaporation (Buchi, São Paulo, Brazil) to yield the CEm extract.

### 2.4. Chemical Characterization of Compounds by HPLC-DAD-MS/MS

The chemical analyses were acquired on a UFLC-20AD Prominence Shimadzu coupled with a diode array detector (DAD) and mass spectrometer with electrospray ionization source and quadrupole and time-of-flight (MicroTOF-Q III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) analyzers. A Kinetex<sup>®</sup> C18 chromatography column (2.6 µm, 100 Å, 150 × 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used. The flow rate was 0.3 mL/min, and the chromatographic column was maintained at 50 °C during the chromatographic analyses. The mobile phase was composed of acetonitrile (B) and water (A) with 0.1% (*v/v*) formic acid. The gradient elution profile was the following: 0–2 min (3% of B), 2–25 min (3–25% of B), 25–40 min (25–80% of B), and 40–43 min (80% of B, isocratic). For the MS analyses, nitrogen was applied as nebulizer (4 Bar), collision, and drying gas (9 L/min); the capillary voltage was 2500 kV. The samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL in methanol and water (7:3, *v/v*), filtered on PTFE filters (Millex 0.22 mm × 13 mm, Millipore<sup>®</sup>, Burlington, MA, USA), and 2 µL of each sample were injected into the chromatographic system, except for the pool samples (quality control) that were injected with a volume of 5 µL. The pool was produced by mixing all samples from CEb and CEm. The UV analyses were monitored in the range 210–800 nm. The mass spectrometry data were acquired in positive and negative ion modes for all the samples.

### 2.5. Antibiofilm and Antibacterial Evaluations

Bacterial biofilm formation was quantified using a crystal violet assay on 96-well microtiter plates (Costar 3599, Corning, Inc., Corning, NY, USA) [14]. Into each well was pipetted 4 µL of each sample solubilized in DMSO, added to sterile water (76 µL), 40 µL of Brain Heart Infusion (BHI) broth for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 or Tryptone Soya Broth (TSB) for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and bacterial suspension (80 µL, ×10<sup>8</sup> CFU/mL). Biofilm/bacterial growth control was performed with vehicle DMSO (4 µL) instead of the sample, and gentamicin 20 µg/mL (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as a control for the inhibition of bacterial growth. The samples were evaluated at concentrations of 20 and 200 µg/mL and the plates were incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, the planktonic cells were removed, and the wells were washed three times using sterile saline. Adherent biofilm was heat-fixed at 60 °C for 1 h, and then the biofilm biomass was stained with crystal violet (0.4% for 15 min at room temperature). Finally, the plate was washed with water, the biofilm was resuspended with ethanol for 30 min, and

the absorbance (570 nm) was measured. The antibacterial activity was evaluated by the difference of final ( $t = 24$  h) and initial bacterial growth ( $t = 0$ ) using absorbance at 600 nm.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined on 96-well microtiter plates as described above. The samples were serially diluted twofold in water and added to the wells, resulting in a final concentration ranging from 0.25 to 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After 24 h of incubation at 37 °C, the MIC was defined as the lowest concentration of the sample with no visible bacterial growth in the well.

A protocol adapted from Zimmer et al. [15] was used to evaluate the eradication of *S. aureus* biofilm. At first, the biofilm was formed as aforementioned. After 24 h of incubation at 37 °C, planktonic cells were removed, and the samples were added (concentration range from 4 to 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The plate was incubated again under the same conditions as before, and following this incubation the same steps used for the quantification of biofilm were performed. Biofilm formation controls were performed with DMSO (growth control) and vancomycin 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma–Aldrich Co., USA, activity control).

#### 2.6. Processing Data and Statistical Analyses

The raw data acquired by HPLC-DAD-MS were firstly visualized in DataAnalysis software (version 4.2, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) and subsequently converted to .cdf. Next, the data were aligned by MetAlign software [16], producing a dataset with 5067 entries. These data were reduced by MSclust [17] which resulted in a dataset with 359 entries. The quality control sample was prepared from a mixture of 50  $\mu\text{L}$  of each sample and it was injected every four samples during data acquisition. Subsequently, we manually refined the data using spreadsheets, and all entries up 5000 of peak intensities were considered. We also removed all the entries corresponding to the culture media constituents and the blank interferents. The statistical analyses were performed by the MetabolAnalyst 5.0 platform [18]. The data from CEm and CEB were normalized by median, log-transformed, and data scaled by mean centering. We performed multivariate statistical analyses such as principal component analysis (PCA), volcano plot, hierarchical cluster analysis (HCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), and heatmap. In addition, univariate analyses were also performed, such as Pattern-hunter, applying Pearson  $r$ , to determine the metabolites that correlated with the antibacterial activity against *S. aureus*. These biological results were added to the dataset after the application of the formula (100-bacterial growth percentage at 200  $\mu\text{g}/\text{mL} \times 100$ ).

#### 2.7. Molecular Networking and Data Analysis

The HPLC-MS data were converted to .mzXML format by MsConvert software [19]. The converted files were uploaded to the GNPS platform (<http://gnps.ucsd.edu> (accessed on 26 October 2022) [16] and classified into two groups of extract samples: CEB and CEm from *Penicillium* sp. 5MP2F4, and blank compounds (relative to extracts of culture media and solvent analyses) were removed. The molecular network was created using the online workflow on the GNPS platform (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/> (accessed on 26 October 2022). The data were filtered by removing all MS/MS fragment ions within  $\pm 17$  Da of the precursor ion. MS/MS spectra were window-filtered by selecting only the top six fragment ions in the  $\pm 50$  Da window throughout the spectrum. For the precursor, ion mass tolerance was set to 0.02 Da, and for the MS/MS fragment ion tolerance was set to 0.08 Da. A molecular network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.6 and at least five matched peaks. The parameters for the library search were set to have a score above 0.6 and at least five matched peaks to assist in the metabolite annotation [20]. The molecular network job on GNPS can be found at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e513be1b31844e7ab44f504f7047bd9d> (accessed on 26 October 2022) (positive mode). The results were exported and visualized in Cytoscape® (version 3.9) [21].

### 2.8. Annotation of Compounds

The annotation of metabolites was performed based on the accurate mass spectral data to establish the molecular formula from the experimental high-resolution mass and isotope pattern, fragmentation pattern, and UV data in comparison with the obtained spectral data from literature databanks (such as MassBank, PubChem, NPAtlas, Louts, Chemical Abstract Service), and some compounds were confirmed by the injection of authentic standards. The molecular formula of each substance was determined considering errors and mSigma below 5 ppm and 30, respectively. Spectral comparisons were also performed by the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform.

## 3. Results

### 3.1. Identification of Fungal Strain

The isolated endophytic fungal strain 5MP2F4 was molecularly identified by the similarity with the ITS sequences deposited in the NCBI Blast tool using the Standard databases and the nucleotide collection (nr/nt). The search for similarity in the NCBI Blast tool was performed using the rRNA/ITS databases and the Internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type. The sequence of the fungus 5MP2F4 showed 100% similarity with the sequence from GenBank code NR\_111499, which belongs to the fungus identified as *P. brasilianum* [22]. In addition, several metabolites annotated here were also described for the species *P. brasilianum* [23]. Thus, the chemical data reinforced the possibility of the identification of strain 5MP2F4 as *P. brasilianum*.

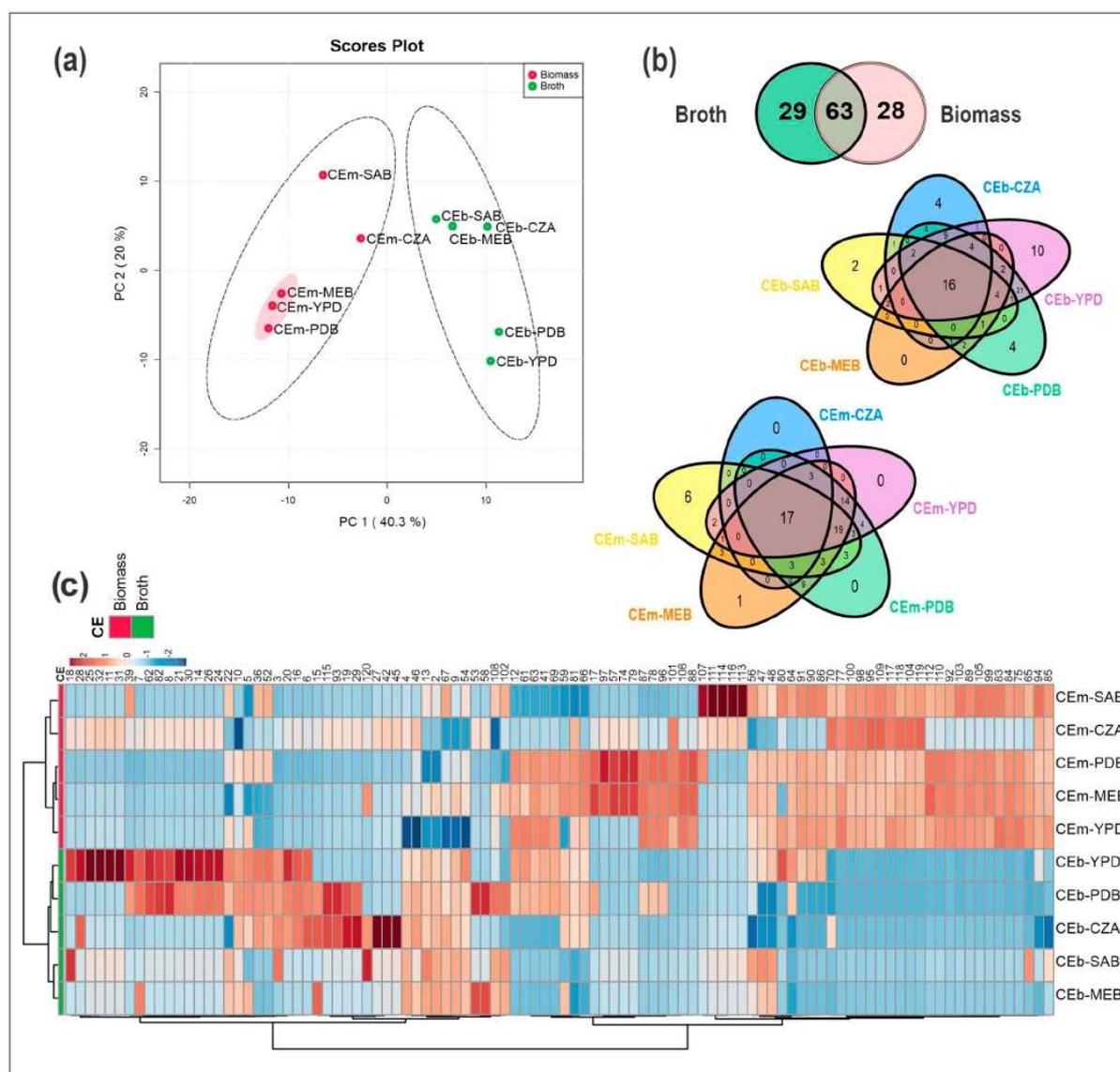
### 3.2. OSMAC Experiments from *Penicillium* sp. 5MP2F4

The fungi 5MP2F4 was cultivated in different culture media (PDB, MEB, SAB, CZA, and YPD) in the OSMAC experiment, and it revealed visual changes in appearance, including the colors of the mycelia and broths (Figure S2). Additionally, the sporulation characteristics were also modified, which can be related to changes in the structure of the cell membrane formed [24]. The PDB medium showed high dark green sporulation and formation of light yellow exudates, differing from what was observed for the material cultured in CZA medium, where the mycelium was white and revealed no spores.

The fresh mycelial biomass from submerged cultures was freeze-dried and revealed a large amount of water (Figure S3). The lyophilized mycelia favored the extraction with the organic solvent to obtain the crude extracts from mycelia (CEm), since the presence of water can disrupt the obtention of CEm. The fresh to freeze-dried mass ratio reaches almost 12 in the biomass from the culture in MEB, and this ratio was around 5 to 7 times in the other culture media, while the extracts obtained from broths (CEb), cultivated in different media, were the highest mass yields in the cultivation with SAB and MEB (Figure S4).

### 3.3. Chemical Diversity of the Crude Extracts of Broth (CEb) and Mycelial Biomass (CEm) from *Penicillium* sp. Strain 5MP2F4 Obtained by OSMAC Strategy

To explore the chemodiversity of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, the OSMAC strategy together with metabolomics and chemometrics tools was applied to improve and broaden the chemical information from this strain. Then, the CEb and CEm extracts obtained from the OSMAC strategy were chemically profiled by HPLC-DAD-MS, along with all control samples to exclude their chromatographic peaks from the final datasets (Figures S5–S7). From the comparison between the CEb and CEm extracts, differences in their chemical profiles were observed (Figure 1). The CEb extracts showed mainly compounds with lower interactions to the C18 stationary phase used in the chromatographic analyses (retention times up to 32 min), while the CEm extracts revealed compounds with higher interactions (retention times above 31 min) (Figures S6 and S7).



**Figure 1.** Metabolomic analyses from the crude extracts of mycelial biomass (CEm) and broth (CEb) of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 cultivated on different culture media (PDB, MEB, SAB, YPD, and CZA). (a) Principal component analysis (PCA) from all the crude extracts. The highlighted samples CEm-MEB, CEm-YPD, and CEm-PDB were the most active extracts against *S. aureus*. (b) Venn diagram of metabolites in CEB and CEM. (c) Heatmap and hierarchical clustering analysis (HCA) of the features ranging from red to blue color, representing high to low ion intensities. Groups of CEm and CEB samples are in red and green color, respectively.

The HPLC-MS data were initially aligned and clustered. The final dataset, used for subsequent chemometrics analyses, was obtained after the removal of control peaks and resulted in 120 features from the ten extracts (CEb and CEM). All spectral data for these compounds are summarized in Table S1, and the chromatographic peaks were numbered from 1 to 120 according to retention time and applied in the statistical analyses.

Multivariate statistical analyses were performed from the dataset of CEB and CEM. An unsupervised method of the chemical profiles was carried out by a principal component

analysis (PCA), which revealed the formation of two groups constituted by the CEb and CEm extracts (Figure 1a). PC1 explained 40.3% of the data variance, while PC2 explained 20%, and both accounted for 60.3% of the total data variance.

From all the extracts analyzed in our study, the twenty-nine unique metabolites from CEb extracts were verified, while from CEm extracts there were twenty-eight unique metabolites (Figure 1b); moreover, they revealed significant ion intensity differences, as observed from the heatmap (Figure 1c). Regarding the number of metabolites biosynthesized in each culture medium, the compounds from CEb and CEm represented a total of 104 for the PDB medium, 97 for YPD, 63 for SAB, 78 for MEB, and 49 for CZA. These data can also be observed in Table S2, which summarizes the occurrence and diversity of metabolites from each extract.

Therefore, there are notable differences in the chemical profiles of broth and mycelial extracts from strain *Penicillium* sp. 5MP2F4. In addition, the variation in the culture media influenced the production of metabolites, some of which are dependent on the culture medium, such as the metabolite **32** that was found only from CEb-YPD. In contrast, the metabolite **120**, for example, was observed in the mycelial biomass and broth extracts from samples CEm-MEB, CEb-CZA, and CEb-SAB. These observations are useful, as they can aid in studies of targeted metabolites.

The heatmap and hierarchical cluster analysis (HCA) were constructed from the data of all CEb and CEm samples, and they are illustrated in Figure 1c. Variations in the occurrence of metabolites were also observed from the CEm and CEb extracts, as were the differences in ion intensities and diversity of compounds produced by the growth microorganism using the OSMAC strategy. In addition, the formation of two groups of samples, a group of CEm and another of CEb, was also detected in HCA, and their metabolites (with lower and higher retention times) were also observed in the heatmap. Thus, the CEb samples accumulated mainly compounds with lower retention times with the C18 stationary phase, while CEm were composed of metabolites with higher retention times.

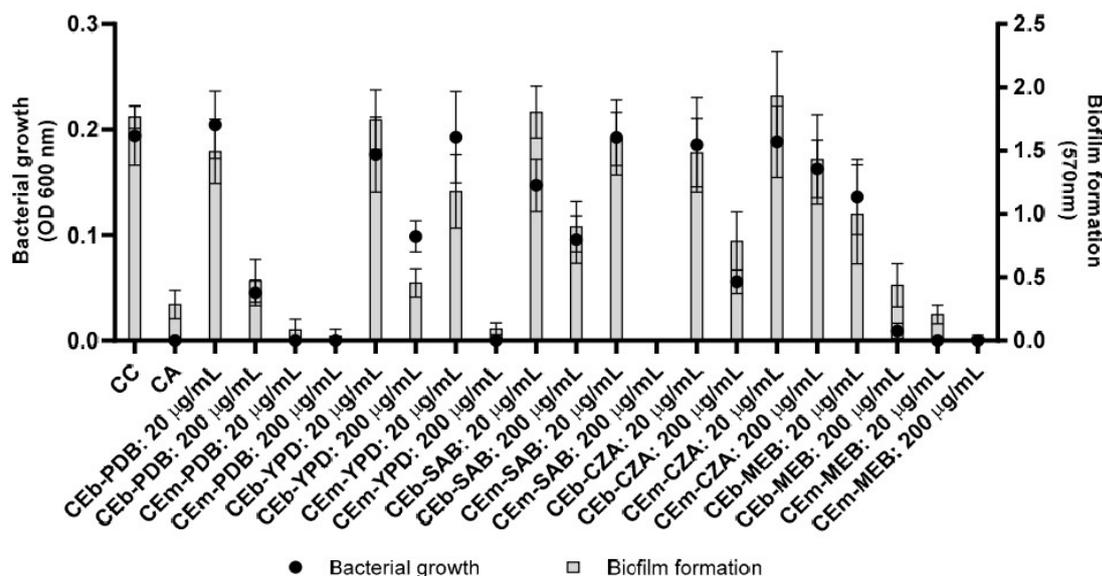
The CEm-CZA and CEm-SAB extracts grouped in the same cluster, similar to what was observed in the PCA, where they clustered in the same quadrant; in contrast, CEm-YDB, CEm-MEB, and CEm-PDB clustered in another cluster belonging to the group of CEm extracts, demonstrating that these last three extracts show more chemical similarities. Interestingly, these similarities can also be observed in their antibacterial activities. For the CEb extracts, we observed similarities between the samples cultivated on culture media that differed from those observed for CEm. Thus, greater similarities were observed between CEb-MEB and CEb-SAB.

From the partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), in which two relevant variables are (1) variable importance in projection (VIP) and (2) sum of the weights of the absolute regression coefficients, the graph with the VIP scores was obtained (Figure S8). The most relevant compounds for the separation of the CEm and CEb groups are mainly nonpolar (substances with higher numbering—high retention time) and polar metabolites (substances with lower numbering—low retention time), respectively. Thus, the compounds with the highest VIP scores and the top ten for CEm extracts were components **104** (palmitoyl-sn-glycerophosphatidylethanolamine), **100** (linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), **98** (linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-isomer), **77**, **118**, **119** (octadecadienoic acid), **117**, **95** (linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), **109** (lysophosphatidylethanolamine 18:1) and **103**, while for CEb they were **3** (unknown), **13**, **2** (5,6-dihydro-6-hydroxy penicillic acid), **9**, **16**, **4** (penicillic acid), **6** (orselinic acid), **10** (unknown), **20** (dihydroxyfumitremorgin C) and **7**. These appointments evidenced a wide chemical characterization from both samples of broths and mycelia.

### 3.4. Evaluation of Antibacterial and Antibiofilm Activities of Crude Extracts of Broth (CEb) and Mycelial Biomass (CEm) from *Penicillium* sp. Strain 5MP2F4 Obtained by OSMAC Strategy

To investigate further the antibacterial potential, all extracts (CEb and CEm) obtained by the strain *Penicillium* sp. 5MP2F4 were evaluated against *S. aureus* and *P. aeruginosa* to determine their activities on bacterial growth and biofilm formation.

The CEm and CEb extracts, at concentrations of 20 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , were initially evaluated against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, but no inhibitory effect was observed against *P. aeruginosa* (Figure S9). The CEm and CEb extracts revealed activity against *S. aureus* by inhibition of bacterial growth (Figure 2), except in the CEm-CZA extract. Subsequently, the CEm extracts were also evaluated against *S. aureus* at different concentrations (Figure S10). CEm-PDB (Figure S10a) and CEm-MEB (Figure S10e) were the most active and revealed MIC of 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while the CEm-YPD (Figure S10b) and CEm-SAB (Figure S10c) extracts showed MIC of 64 and 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The CEm-CZA (Figure S10d) extract was not active at the highest concentration tested (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figure 2.** Biofilm formation and bacterial growth of *S. aureus* treated with the crude extracts of mycelial biomass (CEm—CEm-PDB, CEm-YPD, CEm-SAB, CEm-CZA, and CEm-MEB) and broth (CEb—CEb-PDB, CEb-YPD, CEb-SAB, CEb-CZA, and CEb-MEB) of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 at concentration 20 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . CC = growth control, culture medium only; CA = activity control, gentamicin 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

The crude extracts from broth (CEb) were also evaluated in the assays of bacterial growth and biofilm formation against *S. aureus* at different concentrations (Figure S11), but these extracts showed moderate activity. The CEb-PDB (Figure S11a) inhibited more than 50% of the bacterial growth at 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The CEb-MEB extract showed the best potential to inhibit bacterial growth, when compared to the CEb samples, resulting in an inhibition of approximately 50% of bacterial growth at the concentration of 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure S11e).

Therefore, the CEb and CEm extracts presented classical antibiotic activity. In addition, the most promising antibacterial extracts, CEm-PDB and CEm-MEB, were also evaluated for the potential to eradicate the pre-formed bacterial biofilm (Figure S12). However, these extracts showed no potential to eradicate the biofilm.

### 3.5. Metabolomics and Statistical Analyses Applied to Determine the Chemical Differences between Samples with High and Moderate Antibacterial Activity

All CEB and CEM extracts were also evaluated for bacterial growth inhibition and revealed different activities against *S. aureus* (Figures S10a–e and S11a–e). From the MIC values of these samples, two groups were classified: (1) extracts with high activity, composed of CEM-PDB (MIC = 16 µg/mL), CEM-YPD (MIC = 64 µg/mL), and CEM-MEB (MIC = 16 µg/mL), (2) extracts with moderate activity, composed of CEM-SAB (MIC = 128 µg/mL), CEM-CZA (MIC > 256 µg/mL), CEB-SAB (MIC > 256 µg/mL), CEB-MEB (MIC > 256 µg/mL), CEB-CZA (MIC > 256 µg/mL), CEB-PDB (MIC > 256 µg/mL) and CEB-YPD (MIC > 256 µg/mL). Thus, the statistical analyses were performed from chemical data and biological properties to propose the active metabolites.

The PCA analyses (Figure 1a) revealed more chemical similarities between the extracts with higher antibacterial activity (CEM-MEB, CEM-YPD, and CEM-PDB). From the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), the variable importance in projection (VIP) with the sum of absolute regression coefficients (coef.) were plotted from 30 features (Figure 3a). Thus, the compounds **12**, **41**, **63**, **65–66**, **73**, **75**, **77–78**, **83–84**, **87–89**, **92**, **96**, **98–99**, **101**, **104–106**, **110**, **112**, and **118** were the most important for the separation of active samples. All the annotated metabolites are summarized in Table 1 and their spectral data in Table S1.

**Table 1.** Metabolites annotated from the crude extracts of *Penicillium* sp. 5MP2F4 by HPLC-DAD-MS/MS and their spectral data.

Peak	RT (min)	Compound	MF **	Positive Mode (m/z)
				[M+H] <sup>+</sup>
2	3.89	5,6-Dihydro-6-hydroxypenicillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	189.0761
3	11.17	Unknown	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> S	275.0582 #
4	11.68	Penicillic acid *	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	171.0655
6	12.90	Orsellinic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	151.0384 #
8	15.36	Dihydroxypropyl dihydroxy-methylbenzoate	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	243.0866
10	16.33	Unknown	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	275.1124
11	16.64	Unknown	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	194.0813
12	17.16	Brasiliamide I	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	385.2123
17	21.74	Brasiliamide E	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	383.1958
20	23.78	Dihydroxyfumitremorgin C or Cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1863
21	24.64	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	444.176
22	25.67	Dihydroxyfumitremorgin C or Cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1855
23	26.21	Triacetylfulsarinin C	C <sub>39</sub> H <sub>60</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub>	853.4161
24	26.24	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	410.1701 <sup>F</sup>
25	26.82	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	426.1664 #
26	26.99	Dihydroxy-spirotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	410.1705 #
28	27.11	Spirotryprostatin G	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	394.1765
30	27.22	Cyclotryprostatin E	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	412.1869 <sup>M</sup>
31	27.36	Unknown	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	484.2073
32	28.58	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	426.1963
33	28.66	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	410.1705 #

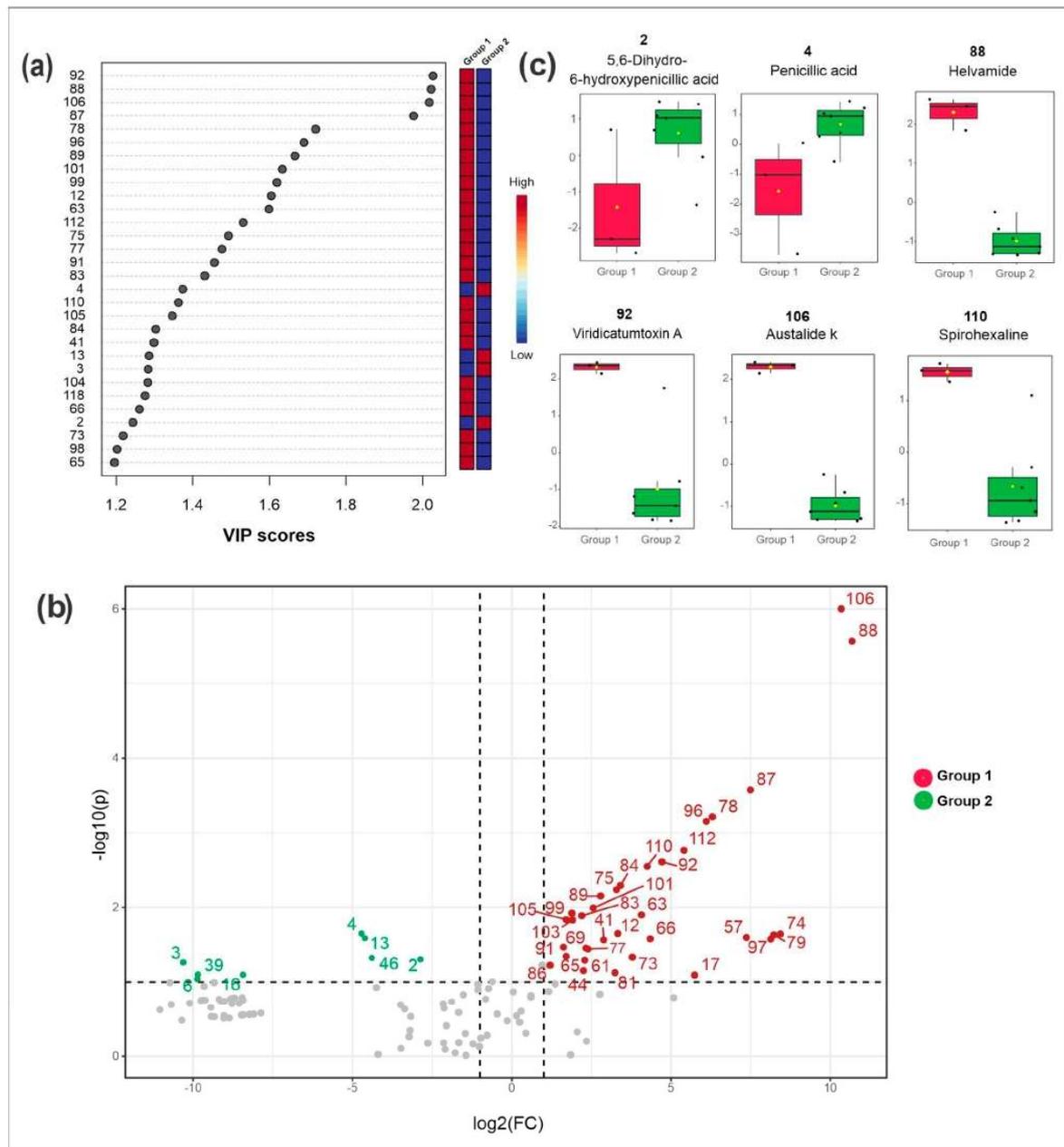
Table 1. Cont.

Peak	RT (min)	Compound	MF **	Positive Mode (m/z)
				[M+H] <sup>+</sup>
34	28.76	N-acetyl brasiliamide I	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	427.2212
36	29.10	Dihydroxyfumitremorgin C/Cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1861
37	29.38	Dihydroxyfumitremorgin C/Cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	394.1752 #
38	29.76	Cyclotryprostatin C /hydroxycycloprostatin A	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	382.1755
39	30.08	Cyclotryprostatin B	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	394.1756
40	30.14	Cyclotryprostatin C	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	364.1561
41	30.16	Unknown	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	555.2699
43	30.62	Oxo-cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	392.1600 #
45	30.66	Abcisic acid	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	265.1439
44	30.66	Austalide H acid	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	463.231
47	30.97	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	378.179 #
48	31.01	Dehydroxycyclotryprostatin C	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	348.1704 #
50	31.23	17-O-desmethyl austalide B *	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	461.2156
52	31.32	Unknown	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	408.1893
53	31.46	Unknown	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	463.087
54	31.49	Tryprostatin B	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	352.2019
55	31.74	Cyclodepsipeptide (JBIR-113)	C <sub>31</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	596.3086
56	31.89	Fumitremorgin C	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	380.1947
57	32.08	Unknown	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	488.2171
58	32.13	Unknown	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	431.0599 <sup>M</sup>
59	32.14	Brasiliamide D	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	425.2058
60	32.37	Dihydroxyfumitremorgin C/Cyclotryprostatin A	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1854
61	32.43	Chrysosporazine P	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	489.2372
63	32.48	Austalide Q acid	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	445.2216
64	32.69	Tryprostatin B isomer	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	352.2014
65	32.82	Oxoverrucologen (isomer)	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.222
66	32.90	Brasiliamide C	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	423.1899
68	33.08	Brasiliamide A	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	439.1861
69	33.19	Austalide H	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	477.2460
70	33.29	Unknown	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	509.2747
71	33.34	Oxoverrucologen	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.2316
72	33.50	Brasiliamide B	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	423.1865
73	33.58	13-O-deacetyl austalide I/austalide J	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	445.2198
74	33.91	Unknown	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	503.2177
75	34.07	Oxoverrucologen (isomer)	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.2231
76	34.45	Indole alkaloid—diketopiperazine	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	398.1712
78	34.61	Austalide P acid	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	447.2362
80	34.68	Oxo-Hydroxyfumitremorgin C	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	410.1712
81	34.74	Chrysosporazine D	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	487.2217
82	34.84	Unknown	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	660.329

Table 1. Cont.

Peak	RT (min)	Compound	MF **	Positive Mode (m/z)
				[M+H] <sup>+</sup>
83	35.09	Hydroxy-verruculogen	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	510.2213 <sup>#</sup>
84	35.09	Oxofumitremorgin B	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	478.2324
85	35.39	Verruculogen	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	494.2282 <sup>#</sup>
86	35.59	Fumitremorgin B (isomer)	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2375 <sup>#</sup>
87	35.82	Austalide L/Austalide W	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	429.2259
88	35.94	Helvamide	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	485.2076
89	36.21	Deoxy-fumitremorgin B	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	446.2426 <sup>#</sup>
90	36.35	Hydroxyfumitremorgin B	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	478.2325 <sup>#</sup>
91	36.41	Fumitremorgin B (isomer)	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2375 <sup>#</sup>
92	36.55	Viridicatumtoxin A *	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	548.1909 <sup>#</sup>
93	36.55	Indole alkaloid	C <sub>37</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	642.3179
94	36.58	Fumitremorgin B	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2389 <sup>#</sup>
95	36.68	Linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (isomer)	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	478.2869
96	36.78	Austalide P	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	443.2418 <sup>#</sup>
97	36.83	Viridicatum toxin A (isomer)	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	548.1909 <sup>#</sup>
98	37.02	Linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (isomer)	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	478.29
99	37.05	Di-deoxy-fumitremorgin B	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	448.2574
100	37.26	Linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	520.3381
101	37.33	Dihydroaustalide K	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	415.2484
102	37.43	GameXPeptide C	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>9</sub>	552.4114
104	37.75	Palmitoyl-sn-glycerophosphatidylethanolamine	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	454.2941
105	37.93	Indole alkaloid—diketopiperazine	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	446.2434
106	38.04	Austalide K	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	413.24
107	38.07	Unknown	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P	498.3781
108	38.13	GameXPeptide D	C <sub>30</sub> H <sub>55</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	566.4266
109	38.29	Lysophosphatidylethanolamine (18:1)	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>7</sub> P	480.3082
110	38.40	Spirohexaline	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	547.1949 <sup>#</sup>
111	38.46	LDGTS 18:2	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>6</sub>	498.3711
112	38.73	Previridicatumtoxin	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>	550.2062 <sup>#</sup>
113	39.36	LDGTS 16:0	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>6</sub>	474.375
116	39.86	LDGTS 18:1	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>6</sub>	500.3881
119	42.29	Octadecadienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	303.2282 <sup>N</sup>
120	42.30	DGTS 18:2-18:2	C <sub>46</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>7</sub>	760.6068

MF: Molecular Formula; RT: retention time; \*: confirmed by an authentic standard; \*\* determined by considering errors and mSigma less than 8 ppm and 30, respectively. <sup>#</sup>: [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, <sup>N</sup>: [M+Na]<sup>+</sup>, <sup>F</sup>: [M+H-HCOOH]<sup>+</sup>, <sup>M</sup>: [M+H-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>.



**Figure 3.** Metabolomics and statistical analyses from *Penicillium* sp. 5MP2F4. (a) Variable importance in projection (VIP) scores obtained by PLS-DA; (b) Volcano plot displaying the differences in metabolic profiles between the moderately active (represented in the left quadrant) and active (right quadrant) extracts. The x and y axes represent, respectively, the  $\log_2$  of the quantitative variation of compounds (fold change, FC) and the  $-\log_{10}$  of the p-value of all metabolites; (c) Box plots with the average distribution of ion intensities from the metabolites 2, 4, 88, 92, 106 and 110. Group 1 (red): samples with higher antibacterial activity; Group 2 (green): samples with lower antibacterial activity; CEM: crude extract from mycelial biomass and CEB: crude extract from broth cultured in different media (PDB, MEB, CZA, and YPD).

The Volcano plot (Figure 3b), which combines the fold change (FD) results and the statistical significance by t-test, revealed the statistically most relevant compounds for the separation of the samples of high (Group 1 in red) and moderate activities (Group 2 in green).

Compounds **2** (5,6-dihydroxy 6-hydroxy penicillic acid), **3**, **4** (penicillic acid), **6** (orselinic acid), **13**, **16**, **39** (spirotriprostatin G), and **46** were those statistically relevant for the samples of group 2 (moderate activity) compared to group 1 (high activity). The intensities of these compounds were higher in group 2 samples compared to group 1, as observed in the box plots for some of them (Figure 3c).

The metabolites marked in red (group 1) in Figure 3b are suggestively related to the biological activity and they are the main targets for the annotation, described in the subsequent section. Among these target compounds, we highlighted the following: **17** (brasiliamide E), **44** (austalide H acid), **63** (austalide Q acid), **66** (brasiliamide B), **73** (austalide J/13-O-desacetyl austalide), **75** (13-oxoverruculogen isomer), **78** (austalide P acid), **81** (chrysosporazine D), **87** (austalide L or W), **88** (helvamide), **92** (viridicatumtoxin A), **96** (austalide P), **101** (dihydroaustalide K), **106** (austalide k), **110** (spirohexaline) and **112** (pre-viridicatumtoxin). The box plots from some of them are illustrated in Figure 3c, and their highest intensities can be seen in those samples with the highest antibacterial activities.

These features, which were suggestively related to the biological activity, were also confirmed from biplots of PCA as strong variables for the most active extracts (cEm-PDB, cEm-YPB, and cEm-MEB) (Figure S13). Additionally, the compounds deoxy-fumitremorgin B (**89**), hydroxyfumitremorgin B (**90**), fumitremorgin B and isomers (**86**, **91**, **94**), and di-deoxy-fumitremorgin B (**109**) were also visualized as strong variables for the CEm-PDB, CEm-YPD, and CEm-MEB.

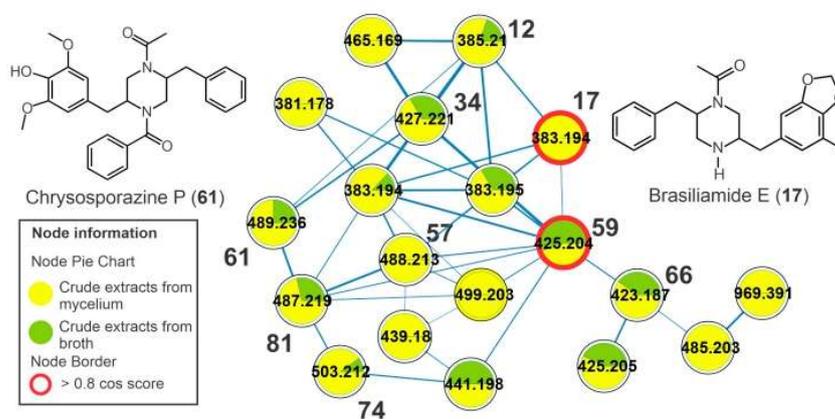
### 3.6. Annotation of Constituents from Crude Extracts of Broth (cEb) and Mycelial Biomass (cEm) from *Penicillium* sp. Strain 5MP2F4 and Molecular Networking

The annotation of the constituents from cEb and cEm extracts is summarized in Table 1. The annotation was made from the spectral data of UV, high-resolution mass spectra, and fragmentation profile (Table S1) and compared to data described in the literature, and deposited in databanks, including the GNPS platform. In addition, some substances were confirmed by the injection of authentic standards. The MS and MS/MS data were also used to generate the molecular network and, thus, to organize the vast mass spectrometry datasets according to the similarity between fragmentation patterns (MS/MS) and their related precursor ions [25]. The compounds with similar fragmentation profiles were grouped into clusters that facilitated and expanded their annotation. We used the analyses of the CEB and CEM extracts, as well as the analyses of the controls (solvent/blank and culture media) to remove their peaks in the final analysis and for the construction of the molecular networking.

The molecular network is illustrated in Figure S14, where the thickness of the edges is proportional to the cosine values, and the entries with the intensity distributions receive green and yellow coloring relative to CEB and CEM, respectively. The overall molecular network visualization also indicated the differences between the CEB and CEM samples, highlighting the requirement of analyses from both materials (broth and mycelial biomass) to broaden the knowledge of microbial metabolite diversity from *Penicillium* sp. 5MP2F4.

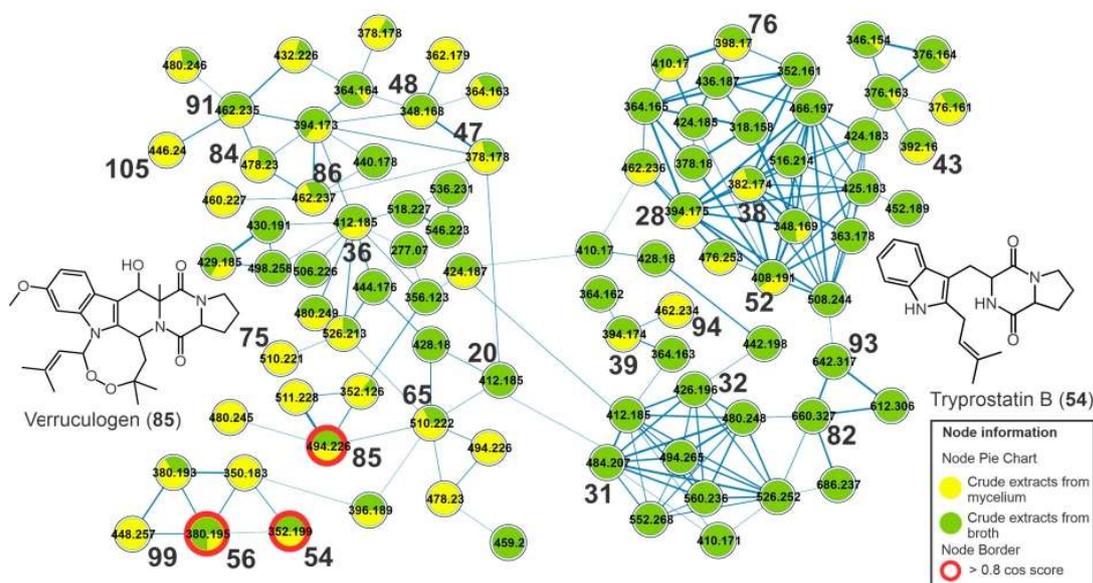
The chromatographic peaks **12** ( $m/z$  385.2123 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>), **17** ( $m/z$  383.1958 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>), **34** ( $m/z$  427.2212 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>), **59** ( $m/z$  425.2058 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>), **66** ( $m/z$  423.1899 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>), **68** ( $m/z$  439.1861 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>), and **72** ( $m/z$  423.1865 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>) showed protonated ions and molecular formulas compatible with two nitrogen atoms (Table 1, Figure S15). These compounds were clustered together in the molecular network (Figure 4), and they revealed ketene losses (42 u) that indicated the presence of acetyl groups. From the fragmentation of the piperazine ring, it was possible to observe characteristic product ions at  $m/z$  191 for compounds **17**, **59**, and **66**, which are relative to fragments containing the methoxy-

lated aromatic ring and the methylenedioxy (Figure S16). For the other compounds, the modification of this fragment was important for the annotation of the compounds, and so **12**, **17**, **34**, **59**, **66**, **68**, and **72** (Figure S15) were annotated. This fragmentation profile is compatible with that observed in the spectra deposited at GNPS, and some features showed high cosine scores, such as brasiliamide D (**59**) and brasiliamide E (**17**). In the same cluster, two chrysosporazines, a rare class of phenylpropanoid piperazine alkaloid described for *Penicillium* species [26], were annotated, such as the metabolites **61** ( $m/z$  489.2372 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>) and **81** ( $m/z$  487.2217 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>) (Figure S15).



**Figure 4.** Cluster of brasiliamides from the molecular network of the crude extracts of mycelial biomass (CEm) and broth (CEb) of the endophytic fungi *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, considering the positive ionization mode (ESI<sup>+</sup>) data. Nodes represent the parent ions, and edge strength indicates the chemical similarity between the MS/MS spectra. Groups of CEm and CEsb samples are in yellow and green coloring, respectively. The numbers represent the annotated metabolites which are described in Table 1, and the nodes circled in red indicate the compounds annotated by GNPS.

A cluster yielded from indolic alkaloids of the diketopiperazine type and the metabolite verruculogen (**85**), for example, was observed in the molecular network (Figure 5). Compound **85** showed a UV spectrum similar to the chromophore of tryptophan [27] and an intense ion at  $m/z$  494.2282 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>), relative to the dehydration reaction in the ionization source. The fragment ion of **85** at  $m/z$  352 (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>) was yielded from the cleavage of the eight-membered ring. Subsequent cleavage of the piperazinodione ring produces the product ion at  $m/z$  255.0766 (C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>) after the loss of C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO and with subsequent loss of a CO molecule (28 *u*) producing the fragment at  $m/z$  227.0808 [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, similar to what was described in the literature [28]. This same fragmentation profile was observed for **83**, which exhibited a molecular formula containing additional oxygen compared to verruculogen (**85**). Thus, **83** was annotated as hydroxy verruculogen, with hydroxylation occurring on the eight-membered ring, and the rare substances 24-hydroxy verruculogen and 26-hydroxy verruculogen have been described in the literature from *Penicillium brefeldianum* [29]. Additionally, the metabolites **65**, **71**, and **75** revealed the same molecular formula, C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, a difference of 2 *u* in relation to verruculogen (**85**), and a similar fragmentation pathway – for example, the cleavage of endoperoxide with losses of 142 *u* and subsequent losses of water and carbon monoxide. The fragment ions at  $m/z$  271, yielded from cleavage of the piperazinodione ring, were also observed. Thus, they were annotated as oxoverruculogen isomers (**65**, **71**, and **75**).



**Figure 5.** Cluster of diketopiperazine-type indolic alkaloids from the molecular network of the crude extracts of mycelial biomass (CEm) and broth (CEb) of the endophytic fungi *Penicillium* sp. Strain 5MP2F4, considering the positive ionization mode (ESI+) data. Nodes represent the parent ions, and edge strength indicates the chemical similarity between the MS/MS spectra. Groups of CEm and CEb samples are in yellow and green coloring, respectively. The numbers represent the annotated metabolites which are described in Table 1, and the nodes circled in red indicate the compounds annotated by GNPS.

Peak 56 showed an intense ion at  $m/z$  380.1947  $[M+H]^+$ , confirming the molecular formula  $C_{22}H_{25}N_3O_3$ . From this protonated ion, a loss of 56  $u$  ( $C_4H_8$ ) yielded the product ion at  $m/z$  324.1337 ( $C_{18}H_{18}N_3O_3^+$ ), suggesting the 2-methylpropene group, and this undergoes a subsequent ring contraction with a loss of a CO molecule (28  $u$ ) and the generation of an ion at  $m/z$  296.1374 ( $C_{17}H_{18}N_3O_2^+$ ). Cleavage in the piperazinodione ring by a loss of hexahydropyrrol [1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione yielded an intense product ion at  $m/z$  226.1227 ( $C_{15}H_{16}NO^+$ ). An additional cleavage of the central ring resulted in the formation of the ion of  $m/z$  212.105 ( $C_{14}H_{14}NO^+$ ), and the fragment ion  $m/z$  255.1476 ( $C_{16}H_{19}N_2O^+$ ) was yielded from the cleavage of the piperazinodione ring, and subsequently, the loss of 2-methylpropene yielded the ion at  $m/z$  199.0868 ( $C_{12}H_{11}N_2O^+$ ). This fragmentation profile is compatible with fumitremorgin C (56) described by Fornal et al. [28] and deposited at GNPS.

The compounds 20, 22, 36, 37, and 60 revealed the same molecular formula  $C_{22}H_{25}N_3O_5$ , which represents an addition of two oxygens compared to fumitremorgin C (56). They revealed losses of a water molecule (18  $u$ ) in the ionization source, indicating the presence of saturated hydroxyl groups; moreover, losses of 56  $u$  ( $C_4H_8$ ) with subsequent losses of CO and water molecules were also observed, such as the fragment ions at  $m/z$  356  $[M+H-C_4H_8]^+$ , 338  $[M+H-C_4H_8-H_2O]^+$ , and 310  $[M+H-C_4H_8-H_2O-CO]^+$  from 22. Thus, they were annotated as dihydroxyfumitremorgin C/cyclotryprostatin A isomers.

The metabolite 94 showed an intense ion at  $m/z$  462.2389  $[M+H-H_2O]^+$ , compatible with the molecular formula  $C_{27}H_{33}N_3O_5$ , and relative to the dehydration reaction in the ionization source of the mass spectrometer. This intense dehydration reaction is common when there are OH substituents on the central ring from secondary and/or tertiary aliphatic alcohols, such as for the compounds 94 and 90. The product ion of  $m/z$  394, observed from  $m/z$  462 (94), was yielded by the loss of an isoprenic unit ( $C_5H_8$ , 68  $u$ ), and subsequent elimination of the pyrrole ring produced the ion  $m/z$  327. A similar fragmentation was

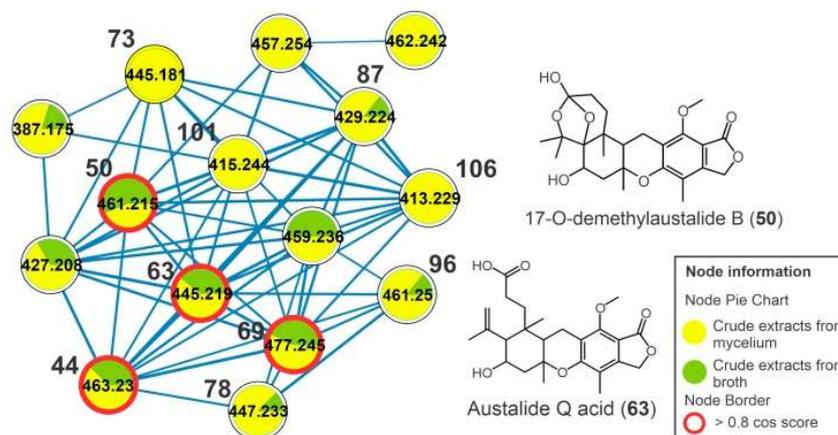
observed for **86**, **89–91**, and **94**, which were annotated as fumitremorgin B isomers (**86**, **91**, **94**), deoxy-fumitremorgin B (**89**), and hydroxy-fumitremorgin B (**90**). Additionally, the compounds oxofumitremorgin B (**84**) and di-deoxy-fumitremorgin B (**99**) were also annotated. Several compounds annotated here are diketopiperazine-type indolic alkaloids, which have been described as precursors of the verruculogen biosynthetic pathway, as observed in Figure S17.

Compounds **54** and **64** revealed the same molecular formula,  $C_{21}H_{25}N_3O_2$ , and a similar fragmentation profile; moreover, **54** showed a score hit with tryprostatin B deposited in the GNPS. The product ions at  $m/z$  296  $[M+H-C_4H_8]^+$  and 268  $[M+H-C_5H_8]^+$  indicated the presence of an isoprene group and yielded fragments with subsequent losses of CO (28  $u$ ) to produce the ions  $m/z$  268 and 240. The peaks **54** and **64** were annotated as tryprostatin B (isomers). Moreover, the metabolites **26**, **28**, **30**, **38**, **39**, **40**, **43**, and **48** were annotated as dihydroxy-spirotryprostatin A, spirotryprostatin G, cyclotryprostatin E, cyclotryprostatin C or hydroxycycloprostatin A, cyclotryprostatin B, cclotryprostatin C, oxo-cyclotryprostatin A, and dehydroxycyclotryprostatin C, respectively.

It was possible to observe another cluster, formed by austalide-type meroterpenoids, which includes the compounds **44**, **50**, **63**, **69**, **73**, **78**, **87**, **96**, **101**, and **106** (Figure 6). These metabolites showed an absorption band at  $\lambda_{max}$  270 nm in their UV spectra that is compatible with that described for austalides [30]. The compounds **44** ( $m/z$  463.2310  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{34}O_8$ ), **50** ( $m/z$  461.2156  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_8$ ), **63** ( $m/z$  445.2216  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_7$ ), **69** ( $m/z$  477.2460  $[M+H]^+$ ,  $C_{26}H_{36}O_8$ ), **73** ( $m/z$  445.2198  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_7$ ), **78** ( $m/z$  447.2362  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{34}O_7$ ), **87** ( $m/z$  429.2259  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_6$ ), **96** ( $m/z$  443.2418  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $C_{26}H_{36}O_7$ ), **101** ( $m/z$  415.2484  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{34}O_5$ ), and **106** ( $m/z$  413.2400  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_5$ ) (Table 1, Figure S18) revealed two diagnostic fragment ions at  $m/z$  207 ( $C_{11}H_{11}O_4^+$ ) and 177 ( $C_{10}H_9O_3^+$ ). The fragment ion  $m/z$  207 is yielded from retro Diels-Alder fission and subsequent loss of  $CH_2O$  (30  $u$ ) that indicates the presence of the lactone group (Figure S19). For all the austalides, no modification was observed in the three rings fused to the benzolactone group. In addition, consecutive neutral losses of water molecules (18  $u$ ) indicated the presence of non-phenolic hydroxyls, such as those observed for the metabolites **44** ( $m/z$  445  $[M+H-H_2O]^+$  and 409  $[M+H-3xH_2O]^+$ ) and **69** ( $m/z$  459  $[M+H-H_2O]^+$  and 441  $[M+H-2xH_2O]^+$ ). Thus, these consecutive losses of water molecules were important in suggesting the aliphatic hydroxyl groups in the austalides, as well as the losses to yield the acylium fragment (e.g., losses of water or methanol molecules for acid or ester austalides, respectively).

The compound 17-*O*-desmethyl austalide B (**50**) was confirmed by the authentic standard. Beyond the similar fragmentation pathway described here, the metabolite **63** exhibited a cosine of 0.94 and 0.96 between the austalides **69** and **44**, revealing greater structural similarity between them. The metabolite **73** showed a cosine of 0.89 in relation to **87** and **101**. Thus, **63** and **73** were annotated as austalide Q acid and austalide J or 13-*O*-desacetyl austalide I, respectively. Metabolites **101** ( $m/z$  415.2484  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{34}O_5$ ) and **106** ( $m/z$  413.2400  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{32}O_5$ ) showed a fragmentation profile similar to that observed for austalides and the cosine between them was 0.97, suggesting a high similarity between them and a difference of 2  $u$  relative to the presence of a double bond. They were annotated as dihydroaustalide K (**101**) and austalide K (**106**).

The chromatographic peaks **92**, **110**, and **112** showed two absorption bands, at  $\lambda_{max} \approx 285$  and 430 nm in their UV spectra. Their deprotonated ions  $m/z$  564.1870, 563.1918, and 566.2027 are compatible with molecular formulas  $C_{30}H_{31}NO_{10}$ ,  $C_{31}H_{32}O_{10}$  e  $C_{30}H_{33}NO_{10}$ , respectively. These compounds exhibited polyketide fragmentation patterns [31] with successive losses of water molecules (18  $u$ ), and for **92** and **112** an additional loss of an ammonia molecule (17  $u$ ) was also observed. Compound **92** was also confirmed by injection of authentic standards. Thus, **92**, **110**, and **112** were annotated as viridicatumtoxin A, spirohexalin, and previridicatum (Figure S20), respectively.



**Figure 6.** Cluster of austalides from the molecular network of the crude extracts of mycelial biomass (CEm) and broth (CEb) of the endophytic fungi *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, considering the positive ionization mode (ESI+) data. Nodes represent parent ions, and edge strength indicates the chemical similarity between the MS/MS spectra. Groups of CEm and CEb samples are in yellow and green coloring, respectively. The numbers represent the annotated metabolites which are described in Table 1, and the nodes circled in red indicate the compounds annotated by GNPS.

Lipid classes were also detected in the molecular network (Figure S21). A cluster generated from phosphate-free lipids was formed by the chromatographic peaks **111** ( $m/z$  498.3711 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>), **113** ( $m/z$  474.375 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>26</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>), **116** ( $m/z$  500.3881 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>), and **120** ( $m/z$  760.6068 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>46</sub>H<sub>82</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup>). These compounds were annotated as isomers of lysodiacylglyceryltrimethylhomoserine (LDGTS) (**111**, **113**, **116**) and diacylglyceryl trimethylhomoserine (DGTS) (**120**). Additionally, a cluster with phospholipids was observed, and it was generated by compounds **95** ( $m/z$  478.2869 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup>), **98** ( $m/z$  478.29 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup>), **104** ( $m/z$  454.2941 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup>), **107** ( $m/z$  498.3781 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>P<sup>+</sup>), and **109** ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup>).

The compounds *N*-acetyl brasiliamide I (**34**), oxo-cyclotryprostatin A (**43**), chrysosporazine P (**61**), chrysosporazine D (**81**), helvamide (**88**), and oxoverrucologen isomers (**65**, **71**, and **75**) are described here for the first time in the genus *Penicillium*, while the metabolites viridicatumtoxin A (**92**), spirohexaline (**110**), previridicatumtoxin (**112**), austalide H acid (**44**), 17-*O*-desmethyl austalide B (**50**), austalide Q acid (**63**), austalide H (**69**), austalide J/13-*O*-desacetyl austalide (**73**), austalide P acid (**78**), austalide L/W (**87**), austalide P (**96**), dihydroaustalide K (**101**), and austalide k (**106**) are described for the first time from a microorganism isolated in Brazil. Therefore, our study contributes to enlarging the chemical knowledge from the genus *Penicillium* and Brazilian microorganisms.

#### 4. Discussion

Fungi can biosynthesize diverse structures with different polarities, functions, and biological properties (e.g., antimicrobial, immunomodulatory, antitumor, anti-inflammatory, antiviral, and antioxidant effects), and they can occur at different levels of abundance in each microorganism [3,6,25,31]. Consequently, in the research to describe the metabolic production capacity of a strain it is a challenge to perform a comprehensive screening with the detection of as many metabolites as possible. Routes of work aimed at isolating metabolites can often lead to known substances and a lot of work without innovation. Herein, an untargeted metabolomic approach from *Penicillium* sp. was applied to evaluate the effects of five different culture media on the metabolome of strain 5MP2F4.

This strain was collected as an endophyte from *Bromelia balansae* Mez that occurs in ironstone outcrops in the Pantanal biome of Mato Grosso do Sul, Brazil [32]. This plant

species is adapted to several stressful environmental factors, such as conditions of a high incidence of UV radiation, shallow soils with few nutrients, and periods of water scarcity [33]. In addition to all these peculiar characteristics, studies on endophytes from these sites and from the Pantanal are scarce, especially those centered on the characterization of secondary metabolites [34–38].

The OSMAC strategy has been applied to obtain a greater diversity of microbial metabolites as well as in the search for new bioactive compounds [39]. Although OSMAC is a valuable and simple tool, several published studies apply it to guide metabolite isolation procedures; however, detailed information about chemical composition related to changes with different culture media is sparsely addressed, such as by more holistic appointments on chemicals by metabolomics tools and statistical analyses. In addition, the differences in metabolite production between extracts from broth and biomass of fungi are also scarcely reported by a wide approach, and several works used only mycelial biomass or broth fungal to obtain the crude extracts and to isolate the target metabolites [40–42].

Our efforts here involved the description of a great variability of metabolites produced by an endophytic fungus and the annotation of them from both broth and mycelial biomass, which revealed different chemical profiles. We also observed that the metabolites biosynthesized by strain *Penicillium* sp are dependent on the culture medium, since the exclusive metabolites were observed from a specific culture medium, as were differences in their intensities. These appointments have been described from strains of *Penicillium* with the application of the OSMAC strategy [41,42], but the authors used no wide chemical strategies to get information from these experiments, such as metabolomics.

From the statistical analyses illustrated in Figure 1, we highlighted the importance to study both the broth and the mycelial biomass, since they represented variations in the chemical profiles, resulting in significant changes in the antibacterial activity that opened up perspectives to find new bioactive compounds. A simple variation in the nutrients of the culture medium can lead to a great change in the production of metabolites and to enlarging the chemical diversity of a strain. For example, here the crude CEB-YPD and CEB-PDB extracts showed similar chemical compositions, while the crude mycelial biomass extracts, CEm-MEB and CEm-PDB, were the ones that showed more similarities.

The metabolomics data were also correlated with the antibacterial properties of the extracts (CEb and CEm obtained by OSMAC strategy) by statistical analyses to suggest the possible bioactive metabolites, optimizing the targets for further studies. The application of metabolomics and statistical tools to accelerate the research of bioactive compounds has been used by several studies, including compounds with antibacterial, larvicidal, and antileishmanial properties [25,43–45]. Thus, brasiliamides, austalides, diketopiperazine-type indolic alkaloids, and polyketides from the strain *Penicillium* sp. 5MP2F4 were highlighted here as chemical classes related to antibacterial activity against *S. aureus*.

The extracts from broth and biomass (CEb and CEm) showed different antibacterial activities and promising results to inhibit *S. aureus* bacterial growth. The increase in the number of bacterial infections together with the shortage of new antibiotics is a huge public health problem. It is estimated that the increase in the rates of bacterial infections caused by microorganisms ranks among the main causes of human mortality, and the bacteria *S. aureus* is on the list of multiresistant bacteria that call for the development of new drugs [46]. In this context, endophytic fungi have been highlighted as a relevant and important source to develop new drugs. They are poorly studied, since it is estimated that only 0.75–1.5% of the endophytes of plant species are known [47], highlighting the extensive goals to be studied [48].

In this work, we annotated different types of diketopiperazine-type alkaloids, such as brasiliamides A, C, D, E, I, and N-acetyl brasiliamide I. They are a class of metabolites widely distributed in fungi, bacteria, sponges, and actinomycetes. Brasiliamides are alkaloids that contain a piperazine grouping and they possess diverse biological activities including antibiotic, immunosuppressive, and antineoplastic activities, and they have great potential in future therapeutic applications [49]. Their biosynthesis has as an initial step

the condensation of two or three amino acids as precursors [50], and they are considered rare in the literature, since only ten analogs have been described, such as brasiliamides A, B, C, D, E, F, G, H, I, J [50–53].

The brasiliamides A and B (Figure S15) were first described in 2002 from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379, and their potential to produce convulsions in animals was evaluated, using the silkworm (*Bombyx mori*) as an experimental model. Brasiliamide A and B showed ED<sub>50</sub> of 300 and 50 µg/g, (concentration values of the substances per gram of diet), respectively. In this work, these brasiliamides were proposed as a new class of tremorgenic substances [52]. Later, this same research group described, for the first time, brasiliamides C, D and E from the cultivation of the same fungal strain. Brasiliamides C and D presented tremorgenic potential with ED<sub>50</sub> of 400 µg/g, while brasiliamide E was not active at the concentration of 500 µg/g [51].

Fill and co-workers described the isolation of brasiliamides A-F from *Penicillium brasilianum*, an endophyte of *Melia azedarach* (Meliaceae). The antimicrobial activity of brasiliamide A against a strain of *Bacillus subtilis* was also described, revealing an MIC of 250 µg/mL [53], and this substance was one of those found in our extracts. Furthermore, *P. brasilianum* WZXY-M122-9 was used to study the biosynthesis of brasiliamides and the implication of its enzymes. Thus, the authors described for the first time brasiliamide I [50], a metabolite also annotated here in our study. Additionally, *N*-acetyl brasiliamide I (34) was also annotated, which has not yet been reported in the literature.

Fumitremorgin B (isomer) (91), oxoverruculogen (isomer) (75), hydroxy-verruculogen (83), deoxy-fumitremorgin B (89), di-deoxy-fumitremorgin B (99) are also compounds statically related to the antibacterial activity. These compounds are diketopiperazine-type indolic alkaloids that are commonly reported from *Aspergillus* and *Penicillium* species [54]. They have been related to different biological activities, such as antimicrobial, antiviral, anticancer, immunomodulatory, insecticidal, and antiphytopathogenic activities [55,56]. For this reason, these alkaloids are goals for drug development and their basic skeleton is an inspiration [54]. Diketopiperazine-type indolic alkaloids are biosynthesized by the condensation reaction of tryptophan with a second amino acid that can be a proline, phenylalanine, histidine, or leucine, yielding the indol diketopiperazine structure [54]. The metabolite fumitremorgin C (56) has been described as a potent inhibitor of breast cancer resistance protein [54,57], while verruculogen (85), a tremorgenic mycotoxin, acts in the central nervous system and induces sustained tremors, convulsions, and can lead to the death of animals. Furthermore, verruculogen inhibits the high conductance calcium-activated potassium channels of smooth muscle, and it has been a target of further drug research [58].

Austalides also presented correlations with antibacterial activity, including austalide Q acid (63), austalide P acid (78), austalide L/austalide W (87), austalide P (96), dihydroaustalide K (101), and austalide K (106). They are meroterpenoids with several activities described for them, such as antitumor, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral (influenza A H1N1), and osteoclast differentiation inhibitors [30]. Although few austalides have been evaluated against pathogenic bacteria, austalides M, N and R have been tested against sea-derived bacterial strains (*Halomonas aquamarina*, *Polaribacter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Roseobacter litoralis*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio harveyi*, *V. natriegens* and *V. carchariae*), and they showed a broad spectrum of activity with MIC values between 0.001 and 1 µg/mL [59]. In addition, austalides M, N and R were also evaluated against the bacteria *S. aureus* and *Escherichia coli*, but they were not active [59]. These austalides were isolated from a strain of *Aspergillus* sp. isolated from the sponge *Tethya aurantium*, and they are suggested as antibacterial compounds useful in aquaculture [59].

The tetracycline-like polyketides, such as the annotated compounds viridicatumtoxin A (92), spirohexaline (110), and previridicatumtoxin (112) are recognized by their antibacterial potentials [60–62]. These fungal polyketides are an important class of metabolites with various biological activities described and other applications, such as pigmentation [63].

Viridicatumtoxin A (92) is a substance with a hybrid polyketide-isoprenoid structure. It is a rare tetracycline-like compound produced by fungi, which is structurally considered privileged because it possesses the ability to interact with different biological targets [64]. It presents potent antibacterial activity against different gram-positive strains, including some of clinical importance, for example, the strain of methicillin-resistant *S. aureus* with MIC of 0.5 µg/mL [62]. Viridicatumtoxin A has proven to be a useful potential antibiotic agent in times of increasing resistance; its total synthesis is described by Nicolaou [65], and its biosynthetic genes are also described. Thus, this tetracycline is a candidate for large-scale production, synthetically or genetically through BGC (biosynthetic gene cluster) modification for fermentation, and it is even used as a base skeleton to provide other relevant bioactive analogs [66].

## 5. Conclusions

From the endophytic fungi *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, metabolomics, statistical, and molecular networking were applied and revealed broad chemical results from the crude extracts of broth (CEb) and mycelial biomass (CEm), including differences in the chemical profiles between them and their antibacterial activities. Several metabolites annotated here are reported for the first time from an endophytic fungus of Brazil and in the genus *Penicillium*. The OSMAC strategy induced the biosynthesis of different compounds and the application of metabolomics and chemometrics tools were useful in indicating antibacterial compounds, such as diketopiperazines, meroterpenoids, and polyketides, highlighting the rare tetracyclin viridicatumtoxin A. These findings reveal that the chemical and biological study of simple cultures can be useful in optimizing the knowledge of the metabolic potential of fungal strains.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo13020236/s1>, Figure S1. *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 at 7-day cultured in PDA, photo of front (A) and reverse (B) of culture. Figure S2. Cultivation of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 in different nutrient conditions. A: PDB (Potato Dextrose Broth); B: MEB (Malt Extract Broth); C: SAB (Sabouraud); D: CZA (Czapek); E: YPD (Yeast extract Peptone Dextrose). Figure S3. Fresh and freeze-dried biomass obtained from the growth of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 on different types of culture medium. Figure S4. Yields of crude extracts obtained from the broth of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 (CEb) in different nutrient conditions PDB (Potato Dextrose Broth), MEB (Malt Extract Broth), SAB (Sabouraud), CZA (Czapek), and YPD (Yeast extract Peptone Dextrose). Figure S5. Base peak chromatograms corresponding to crude extracts from different types of medium blanks used in OSMAC experiment obtained in positive ion mode by HPLC-MS. Figure S6. Base peak chromatograms obtained in positive ionization mode by HPLC-MS of the crude extracts of broth (CEb) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 cultures on different types of medium. Figure S7. Base peak chromatograms obtained in positive ionization mode by HPLC-MS of the crude extracts of biomass (CEm) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 cultures on different types of medium. Figure S8. Metabolomic study of the *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 in relation to different extracts from broth (CEb-PDB, CEb-MEB, CEb-SAB, CEb-YPD, and CEb-CZA) and mycelial biomass (CEm-PDB, CEm-MEB, CEm-SAB, CEm-YPD, and CEm-CZA). Major metabolites identified by PLS-DA and VIP score analyses on the x-axis. The colored squares on the right indicate the relative intensities of the compounds in each group. Figure S9. Biofilm formation and bacterial growth of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in the presence of 20 and 200 µg/mL of the broth (CEb) and biomass crude extracts (CEb) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. CC = Growth control, culture medium only; CA = Activity control, gentamicin 20 µg/mL. Figure S10. Biofilm formation and bacterial growth of *S. aureus* (ATCC 6538) treated with the biomass crude extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 ((a) CEm-PDB; (b) CEm-YPD; (c) CEm-SAB; (d) CEm-CZA; (e) CEm-MEB) at different concentrations. CC = Growth control, culture medium only; CA = activity control, gentamicin 20 µg/mL. Figure S11. Biofilm formation and bacterial growth of *S. aureus* treated with broth crude extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. (a) CEb-PDB; (b) CEb-YPD; (c) CEb-SAB; (d) CEb-CZA; (e) CEb-MEB) at different concentrations. CC = Growth control, culture medium only; CA = activity control, gentamicin 20 µg/mL. Figure S12. Pre-formed biofilm *S. aureus* treated with the CEm-PDB and CEm-MEB biomass extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 at different concentrations. CC = Growth control;

CA = activity control, vancomycin at 20 µg/mL. Figure S13. Biplot of principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). The samples CEm-PDB, CEm-YPD, and CE-MEB are the most active against *S. aureus*. Figure S14. Molecular networking of crude extracts from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, using positive ionization mode (ESI+) data. Crude extracts from broth (CEb) samples are colored green and Crude extracts from biomass (CEm) samples are colored yellow. The edge strength is proportional to the cosine values. Figure S15. Structures of brasiliamides and chrysosporazines annotated in extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. Figure S16. Fragmentation proposal for some observed ions for metabolite 59. Figure S17. Simplified proposal of the biosynthetic pathway for verruculogen based on Han et al. [67]. Metabolites with the indication of numbers were annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. Figure S18. Structures of austalide-type meroterpenoid annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. Figure S19. Proposed fragmentation pathway for metabolite 44. Figure S20. Polyketides annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. Figure S21. Cluster of lipid compounds from the molecular network of the crude extracts of mycelium biomass (CEm) and broth (CEb) of the endophytic fungi *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, considering the positive ionization mode (ESI+) data. Nodes represent parent ions, and edge strength indicates the chemical similarity between the MS/MS spectra. Groups of CEm and CEb samples are in yellow and green color, respectively. The numbers represent the annotated metabolites described in Table 1, and the nodes circled in red indicate the compounds annotated by GNPS. Table S1: Table of spectral data of constituents of biomass and broth crude extracts from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 by HPLC-DAD-MS/MS. Table S2. Presence or absence of compounds in the extracts of broth and biomass of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 by HPLC-MS analysis.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.M.R.d.S., G.M.P. and D.B.S.; methodology, F.M.R.d.S. and D.B.S.; validation, F.M.R.d.S. and D.B.S.; investigation, F.M.R.d.S., A.J.M. and F.R.B.; resources, D.B.S.; writing—original draft preparation, F.M.R.d.S.; writing—review and editing, G.M.P. and D.B.S.; supervision, D.B.S.; project administration, D.B.S.; funding acquisition, D.B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, 71/032.390/2022).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are available in this publication.

**Acknowledgments:** The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 313047/2020-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, process number 71/032.390/2022), and Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) for financial support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Atanasov, A.G.; Zotchev, S.B.; Dirsch, V.M.; Orhan, I.E.; Banach, M.; Rollinger, J.M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E.A.; et al. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2021**, *20*, 200–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gakuubi, M.M.; Munusamy, M.; Liang, Z.X.; Ng, S.B. Fungal endophytes: A promising frontier for discovery of novel bioactive compounds. *J. Fungi* **2021**, *7*, 786. [[CrossRef](#)]
3. Mishra, R.; Venkateswara Sarma, V. Current perspectives of endophytic fungi in sustainable development. In *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*; Gehlot, P., Singh, J., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp. 553–584, ISBN 978-981-13-0393-7.
4. Gomes, S.H.C.; Navegantes-Lima, P.W.P.; Reis, K.C.; Carvalho, J.D.E.; Končić, Z.K.; Tomczyk, M.; Helena, S.; Nogueira-Lima, C.; Wender, P.; Gomes, P.; et al. The roots of *Deguelia Nitidula* as a natural antibacterial source against *Staphylococcus aureus* strains. *Metabolites* **2022**, *12*, 1083. [[CrossRef](#)]
5. Pham, J.V.; Yilma, M.A.; Feliz, A.; Majid, M.T.; Maffetone, N.; Walker, J.R.; Kim, E.; Cho, H.J.; Reynolds, J.M.; Song, M.C.; et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Gupta, S.; Chaturvedi, P.; Kulkarni, M.G.; van Staden, J. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *39*, 107462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Romano, S.; Jackson, S.A.; Patry, S.; Dobson, A.D.W. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 244. [[CrossRef](#)]
8. Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature’s chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619–627. [[CrossRef](#)]
9. Oprea, E.; Li, G.; Jian, T.; Liu, X.; Lv, Q.; Zhang, G.; Ling, J. Application of metabolomics in fungal research. *Molecules* **2022**, *27*, 7365. [[CrossRef](#)]
10. Hamany Djande, C.Y.; Piater, L.A.; Steenkamp, P.A.; Tugizimana, F.; Dubery, I.A. A metabolomics approach and chemometric tools for differentiation of barley cultivars and biomarker discovery. *Metabolites* **2021**, *11*, 578. [[CrossRef](#)]
11. Ye, D.; Li, X.; Shen, J.; Xia, X. Microbial metabolomics: From novel technologies to diversified applications. *TrAC Trends Analyt. Chem.* **2022**, *148*, 116540. [[CrossRef](#)]
12. Belinato, J.R.; Bazioli, J.M.; Sussulini, A.; Augusto, F.; Filla, T.P. Metabolômica microbiana: Inovações e aplicações. *Quim Nova* **2019**, *42*, 546–559. [[CrossRef](#)]
13. Cassemiro, N.S.; Sanches, L.B.; Kato, N.N.; Ruller, R.; Carollo, C.A.; de Mello, J.C.P.; dos Santos dos Anjos, E.; Silva, D.B. New derivatives of the iridoid specioside from fungal biotransformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 7731–7741. [[CrossRef](#)]
14. da Silva Trentin, D.; Giordani, R.B.; Zimmer, K.R.; da Silva, A.G.; da Silva, M.V.; dos Santos Correia, M.T.; Baumvol, I.J.R.; Macedo, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 327–335. [[CrossRef](#)]
15. Zimmer, K.R.; Macedo, A.J.; Giordani, R.B.; Conceição, J.M.; Nicastro, G.G.; Boechat, A.L.; Baldini, R.L.; Abraham, W.R.; Termignoni, C. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 2008–2018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lommen, A. MetAlign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3079–3086. [[CrossRef](#)]
17. Tikunov, Y.M.; Laptinok, S.; Hall, R.D.; Bovy, A.; de Vos, R.C.H. MS-Clust: A tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. *Metabolomics* **2012**, *8*, 714–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Moraes, D.A.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.-É.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W388–W396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Adusumilli, R.; Mallick, P. Data conversion with ProteoWizard MsConvert. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1550*, 339–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)]
21. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schoch, C.L.; Robbertse, B.; Robert, V.; Vu, D.; Cardinali, G.; Irinyi, L.; Meyer, W.; Nilsson, R.H.; Hughes, K.; Miller, A.N.; et al. Finding needles in haystacks: Linking scientific names, reference specimens and molecular data for fungi. *Database* **2014**, *2014*, 1–21. [[CrossRef](#)]
23. Bazioli, J.M.; Amaral, L.D.S.; Fill, T.P.; Rodrigues-Filho, E. Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential. *Molecules* **2017**, *22*, 858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Filtenborg, O.; Frisvad, J.C.; Thrane, U. The significance of yeast extract composition on metabolite production in *Penicillium*. In *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*; Samson, R.A., Pitt, J.I., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1990; pp. 433–441, ISBN 978-1-4899-3579-3.
25. Demarque, D.P.; Dusi, R.G.; de Sousa, F.D.M.; Grossi, S.M.; Silvério, M.R.S.; Lopes, N.P.; Espindola, L.S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1051. [[CrossRef](#)]
26. Dewa, A.A.; Khalil, Z.G.; Elbanna, A.H.; Capon, R.J. Chrysosporazines revisited: Regioisomeric phenylpropanoid piperazine P-glycoprotein inhibitors from Australian marine fish-derived fungi. *Molecules* **2022**, *27*, 3172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fill, T.P.; Pallini, H.F.; da Silva Amaral, L.; da Silva, J.V.; Bidóia, D.L.; Peron, F.; Garcia, F.P.; Nakamura, C.V.; Rodrigues-Filho, E. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1444–1451. [[CrossRef](#)]
28. Fornal, E.; Parfieniuk, E.; Czaczek, R.; Bilinska-Wielgus, N.; Frac, M. Fast and easy liquid chromatography–mass spectrometry method for evaluation of postharvest fruit safety by determination of mycotoxins: Fumitremorgin C and verruculogen. *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *131*, 46–54. [[CrossRef](#)]
29. An, C.-Y.; Li, X.-M.; Li, C.-S.; Xu, G.-M.; Wang, B.-G. Prenylated indole-diketopiperazine peroxides and related homologues from the marine sediment-derived fungus *Penicillium brefeldianum* SD-273. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 746–756. [[CrossRef](#)]
30. Liu, L.; Ruan, H. An overview of natural australides: Structure, bioactivity and synthesis. *Phytochem. Lett.* **2022**, *47*, 81–92. [[CrossRef](#)]

31. Sversut, R.A.; Vieira, J.C.; Kassab, N.M.; Silva, D.B.; Salgado, H.R.N. Forced degradation behavior of two-drug combinations: Isolation and characterization of major degradation products by LC-MS. *Microchem. J.* **2019**, *150*, 104074. [[CrossRef](#)]
32. de Lima, M.S.; Takahasi, A.; Damasceno-Junior, G.A.; Araujo, A.C. Checklist of the flora in ironstone outcrops at the urucum plateau, Corumbá, Mato Grosso Do Sul. *Biota Neotrop.* **2019**, *19*, 20180708. [[CrossRef](#)]
33. Viana, T.F.C.; Campelo, A.P.S.; Baldani, J.I.; Fernandes-Júnior, P.I.; Baldani, V.L.D.; Silva, W.M.; Paggi, G.M.; Brasil, M.S. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. *Braz. J. Biol.* **2020**, *80*, 872–880. [[CrossRef](#)]
34. Noriler, S.A.; Savi, D.C.; Ponomareva, L.V.; Rodrigues, R.; Rohr, J.; Thorson, J.S.; Glienke, C.; Shaaban, K.A. Vochysiamides A and B: Two new bioactive carboxamides produced by the new species *Diaporthe vochysiae*. *Fitoterapia* **2019**, *138*, 104273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Noriler, S.A.; Savi, D.C.; Aluizio, R.; Palácio-Cortes, A.M.; Possiede, Y.M.; Glienke, C. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, Pantanal, and Cerrado. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Iantas, J.; Savi, D.C.; Schibelbein, R.d.S.; Noriler, S.A.; Assad, B.M.; Dilarri, G.; Ferreira, H.; Rohr, J.; Thorson, J.S.; Shaaban, K.A.; et al. Endophytes of Brazilian medicinal plants with activity against phytopathogens. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 714750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Savi, D.C.; Aluizio, R.; Glienke, C. Brazilian plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. *Planta Med.* **2019**, *85*, 619–636. [[CrossRef](#)]
38. Gubiani, J.R.; Oliveira, M.C.S.; Neponuceno, R.A.R.; Camargo, M.J.; Garcez, W.S.; Biz, A.R.; Soares, M.A.; Araujo, A.R.; Bolzani, V.d.S.; Lisboa, H.C.F.; et al. Cytotoxic prenylated indole alkaloid produced by the endophytic fungus *Aspergillus terreus* P63. *Phytochem. Lett.* **2019**, *32*, 162–167. [[CrossRef](#)]
39. Pan, R.; Bai, X.; Chen, J.; Zhang, H.; Wang, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 294. [[CrossRef](#)]
40. Hoang, T.P.T.; Roullier, C.; Boumard, M.C.; Robiou Du Pont, T.; Nazih, H.; Gallard, J.F.; Pouchus, Y.F.; Beniddir, M.A.; Grovel, O. Metabolomics-driven discovery of meroterpenoids from a mussel-derived *Penicillium ubiquestum*. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 2501–2511. [[CrossRef](#)]
41. Xie, C.L.; Liu, Q.; He, Z.H.; Gai, Y.B.; Zou, Z.B.; Shao, Z.Z.; Liu, G.M.; Chen, H.F.; Yang, X.W. Discovery of andrastones from the deep-sea-derived *Penicillium allii-sativi* MCCC 3A00580 by OSMAC strategy. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Meng, L.H.; Li, X.M.; Liu, Y.; Xu, G.M.; Wang, B.G. Antimicrobial alkaloids produced by the mangrove endophyte *Penicillium brocae* MA-231 using the OSMAC approach. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 55026–55033. [[CrossRef](#)]
43. Morais, L.S.; Dusi, R.G.; Demarque, D.P.; Silva, R.L.; Albernaz, L.C.; Bao, S.N.; Merten, C.; Antinarelli, L.M.R.; Coimbra, E.S.; Espindola, L.S. Antileishmanial compounds from *Connarus suberosus*: Metabolomics, isolation and mechanism of action. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. de Oliveira Brownogurski, D.S.; Silva Trentin, D.; Boaretto, A.G.; Rigo, G.V.; da Silva, R.C.; Tasca, T.; Macedo, A.J.; Carollo, C.A.; Silva, D.B. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. *Food Res. Int.* **2018**, *111*, 661–673. [[CrossRef](#)]
45. Deutsch, J.M.; Mandelare-Ruiz, P.; Yang, Y.; Foster, G.; Routhu, A.; Houk, J.; de La Flor, Y.T.; Ushijima, B.; Meyer, J.L.; Paul, V.J.; et al. Metabolomics approaches to dereplicate natural products from coral-derived bioactive bacteria. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 462–478. [[CrossRef](#)]
46. Minarini, L.A.D.R.; de Andrade, L.N.; de Gregorio, E.; Grosso, F.; Naas, T.; Zarrilli, R.; Camargo, I.L.B.C. Antimicrobial resistance as a global public health problem: How can we address it? *Front. Public Health* **2020**, *8*, 768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Singh, A.; Singh, D.K.; Kharwar, R.N.; White, J.F.; Gond, S.K.; Singh, A.; Singh, D.K.; Kharwar, R.N.; White, J.F.; Gond, S.K. Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: Insights, avenues, and challenges. *Microorganisms* **2021**, *9*, 197. [[CrossRef](#)]
48. Radić, N.; Štrukelj, B. Endophytic fungi—The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 1270–1284. [[CrossRef](#)]
49. Song, Z.; Hou, Y.; Yang, Q.; Li, X.; Wu, S. Structures and biological activities of diketopiperazines from marine organisms: A Review. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 403. [[CrossRef](#)]
50. Yuan, B.; Liu, D.; Guan, X.; Yan, Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Yang, D.; Ma, M.; Lin, W. Piperazine ring formation by a single-module NRPS and cleavage by an  $\alpha$ -KG-Dependent nonheme iron dioxygenase in brasiliamide biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 6149–6159. [[CrossRef](#)]
51. Fujita, T.; Hayashi, H. New brasiliamide congeners, brasiliamides C, D and E, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 820–826. [[CrossRef](#)]
52. Fujita, T.; Makishima, D.; Akiyama, K.; Hayashi, H. New convulsive compounds, brasiliamides A and B, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1697–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fill, T.P.; da Silva, B.F.; Rodrigues-Fo, E. Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *20*, 622–629. [[CrossRef](#)]
54. Ma, Y.-M.; Liang, X.-A.; Kong, Y.; Jia, B. Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 6659–6671. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, H.-C.; Ma, Y.-M.; Liu, R.; Zhou, F. Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *45*, 31–33. [[CrossRef](#)]

56. Zhang, Y.H.; Geng, C.; Zhang, X.W.; Zhu, H.J.; Shao, C.L.; Cao, F.; Wang, C.Y. Discovery of bioactive indole-diketopiperazines from the marine-derived fungus *Penicillium brasilianum* aided by genomic information. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kato, N.; Suzuki, H.; Takagi, H.; Asami, Y.; Kakeya, H.; Uramoto, M.; Usui, T.; Takahashi, S.; Sugimoto, Y.; Osada, H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 920–928. [[CrossRef](#)]
58. Knaus, H.G.; McManus, O.B.; Lee, S.H.; Schmalhofer, W.A.; Garcia-Calvo, M.; Helms, L.M.; Sanchez, M.; Giangiacomo, K.; Reuben, J.P.; Smith, A.B., 3rd. Tremorgenic indole alkaloids potentially inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5819–5828. [[CrossRef](#)]
59. Zhou, Y.; Debbab, A.; Wray, V.; Lin, W.; Schulz, B.; Trepos, R.; Pile, C.; Hellio, C.; Proksch, P.; Aly, A.H. Marine bacterial inhibitors from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Tetrahedron. Lett.* **2014**, *55*, 2789–2792. [[CrossRef](#)]
60. Shang, Z.; Salim, A.A.; Khalil, Z.; Quezada, M.; Bernhardt, P.V.; Capon, R.J. Viridicatumtoxins: Expanding on a rare tetracycline antibiotic scaffold. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12501–12508. [[CrossRef](#)]
61. Li, W.; Li, L.; Zhang, C.; Cai, Y.; Gao, Q.; Wang, F.; Cao, Y.; Lin, J.; Li, J.; Shang, Z.; et al. Investigations into the antibacterial mechanism of action of viridicatumtoxins. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1759–1769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zheng, C.J.; Yu, H.E.; Kim, E.H.; Kim, W.G. Viridicatumtoxin B, a new anti-MRSA agent from *Penicillium* sp. FR11. *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 633–637. [[CrossRef](#)]
63. Lebeau, J.; Venkatachalam, M.; Fouillaud, M.; Petit, T.; Vinale, F.; Dufossé, L.; Caro, Y. Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by ascomycetous fungi from terrestrial and marine habitats. *J. Fungi* **2017**, *3*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chooi, Y.H.; Cacho, R.; Tang, Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 483–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Nicolaou, K.C.; Hale, C.R.H.; Nilewski, C.; Ioannidou, H.A.; Elmarrouni, A.; Nilewski, L.G.; Beabout, K.; Wang, T.T.; Shamoo, Y. Total Synthesis of Viridicatumtoxin B and Analogues Thereof: Strategy Evolution, Structural Revision, and Biological Evaluation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12137–12160. [[CrossRef](#)]
66. Newman, D.J. Old and modern antibiotic structures with potential for today's infections. *ADMET DMPK* **2022**, *10*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Han, J.; Liu, M.; Jenkins, I.D.; Liu, X.; Zhang, L.; Quinn, R.J.; Feng, Y. Genome-inspired chemical exploration of marine fungus *Aspergillus fumigatus* MF071. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 352. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

*Supplementary Material*

## **Metabolomic Strategies to Improve the Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi**

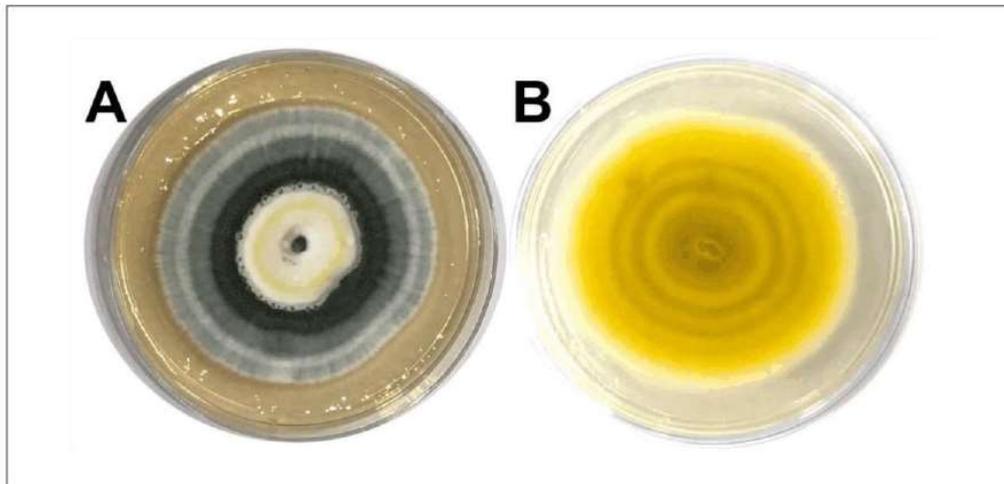
**Fernanda Motta Ribeiro da Silva <sup>1</sup>, Gecele Matos Paggi <sup>2</sup>, Flávia Roberta Brust <sup>3</sup>, Alexandre José Macedo <sup>3</sup> and Denise Brentan Silva <sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LaPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology (LEBio), Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil

<sup>3</sup> Biofilms and Diversity Laboratory, Faculty of Pharmacy and Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

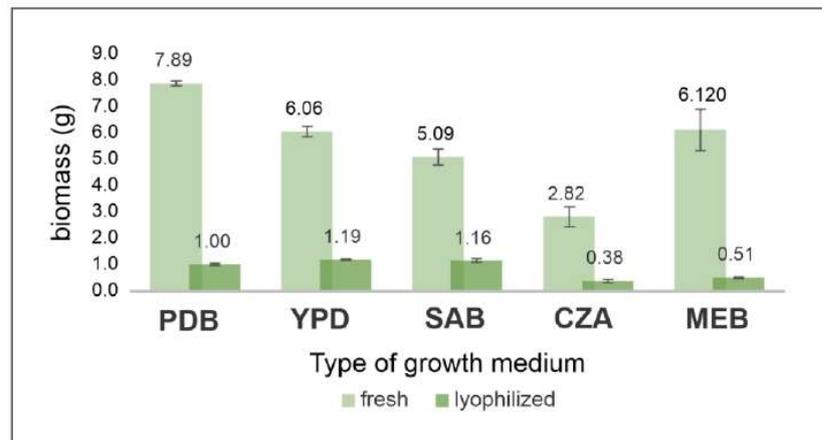
\* Correspondence: denise.brentan@ufms.br



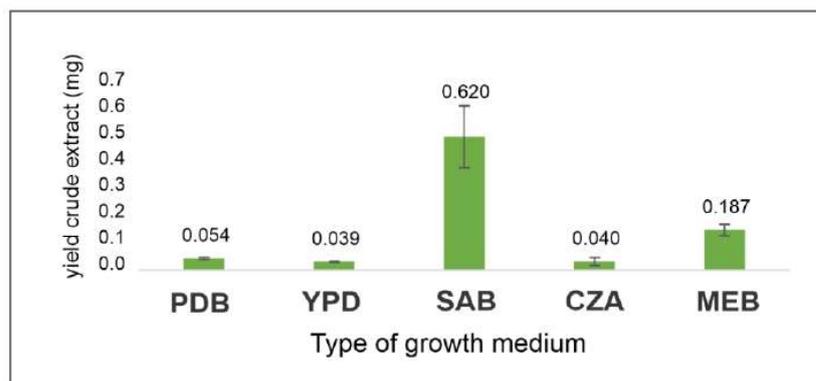
**Figure S1.** *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 at 7-day cultured in PDA, photo of front (A) and reverse (B) of culture.



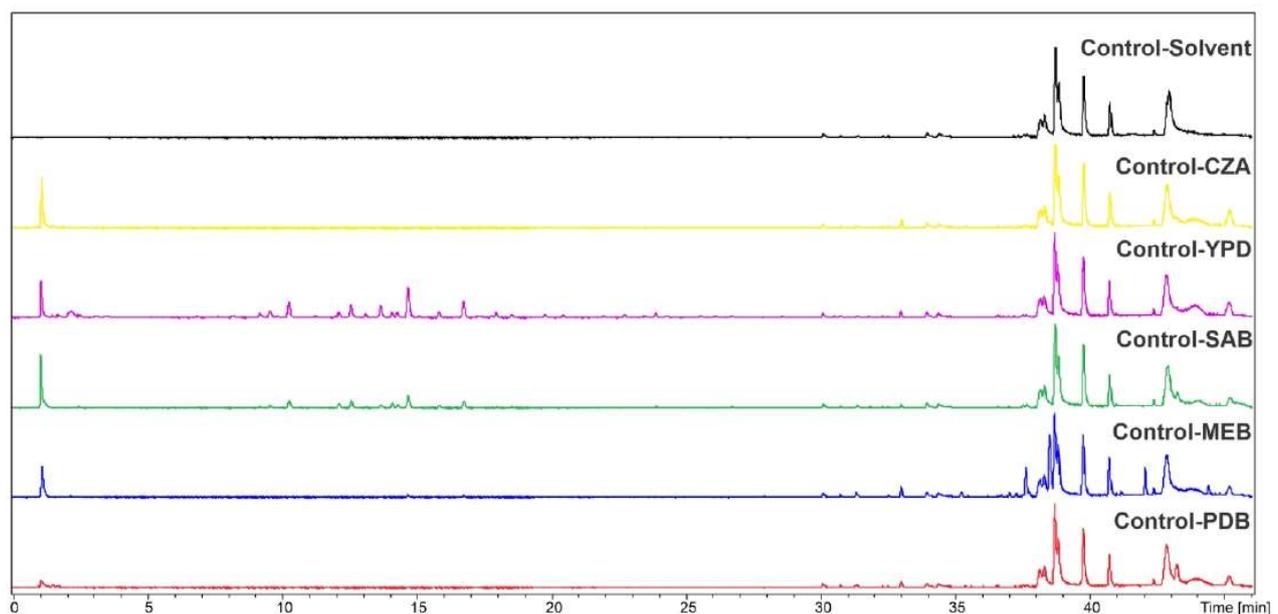
**Figure S2.** Cultivation of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 in different nutrient conditions. A: PDB (Potato Dextrose Broth); B: MEB (Malt Extract Broth); C: SAB (Sabouraud); D: CZA (Czapek); E: YPD (Yeast extract Peptone Dextrose).



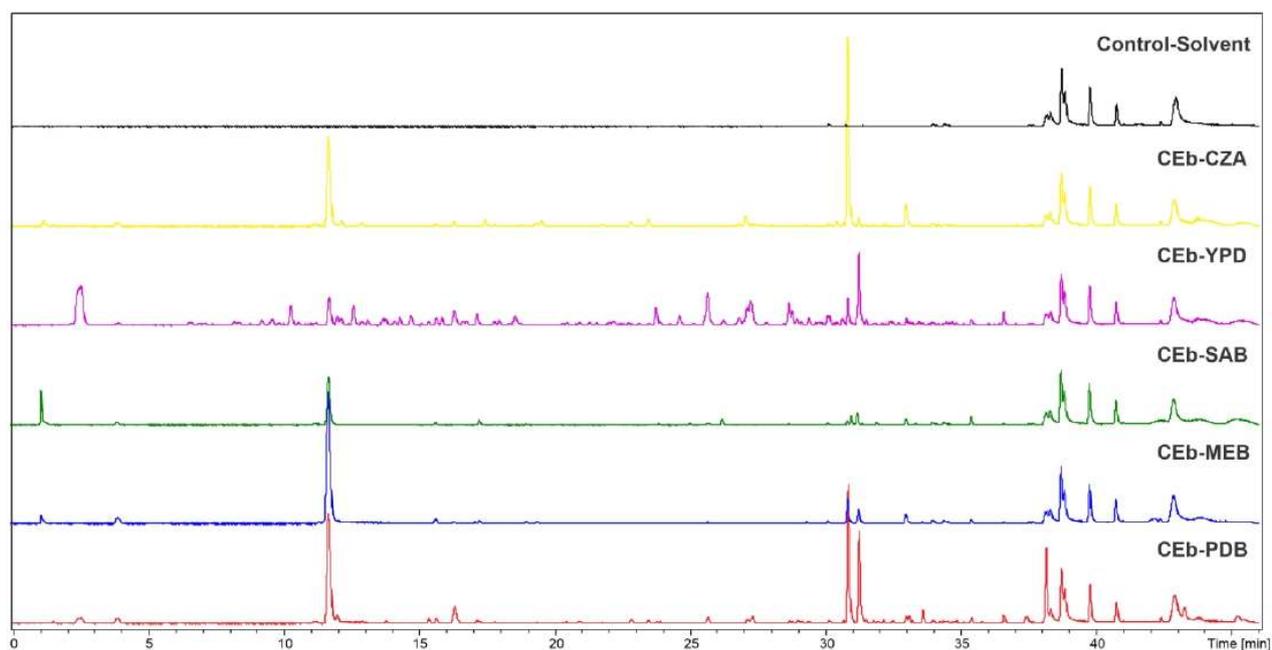
**Figure S3.** Fresh and freeze-dried biomass obtained from the growth of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 on different types of culture medium.



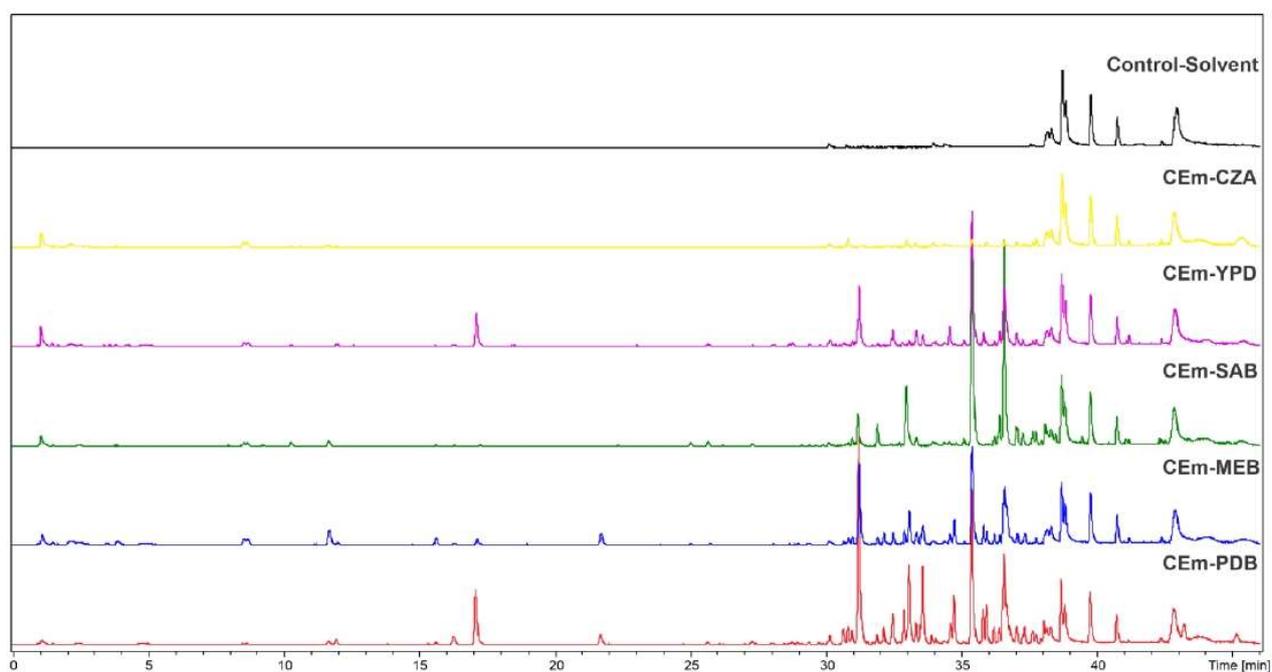
**Figure S4 -** Yields of crude extracts obtained from the broth of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 (CEb) in different nutrient conditions PDB (Potato Dextrose Broth), MEB (Malt Extract Broth), SAB (Sabouraud), CZA (Czapek), and YPD (Yeast extract Peptone Dextrose).



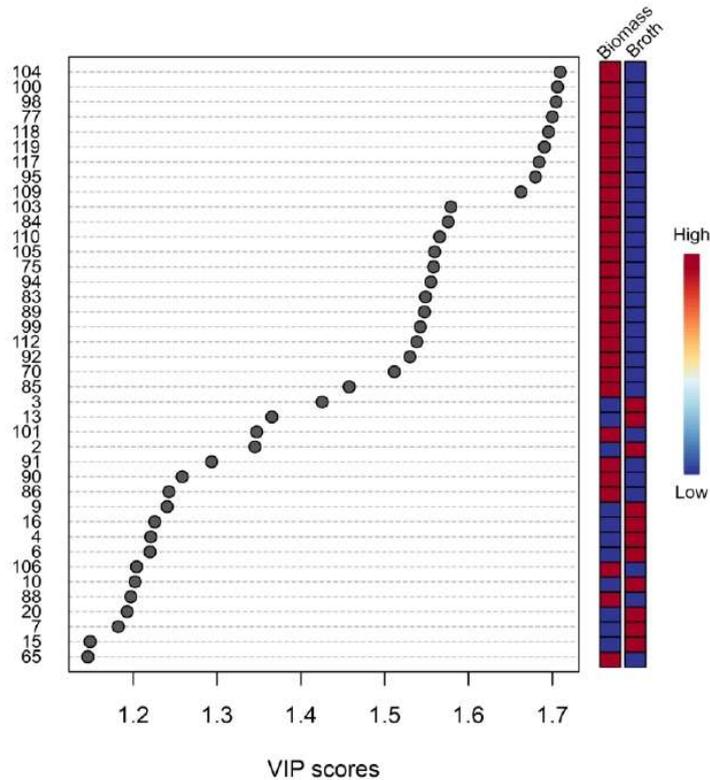
**Figure S5.** Base peak chromatograms corresponding to crude extracts from different types of medium blanks used in OSMAC experiment obtained in positive ion mode by HPLC-MS.



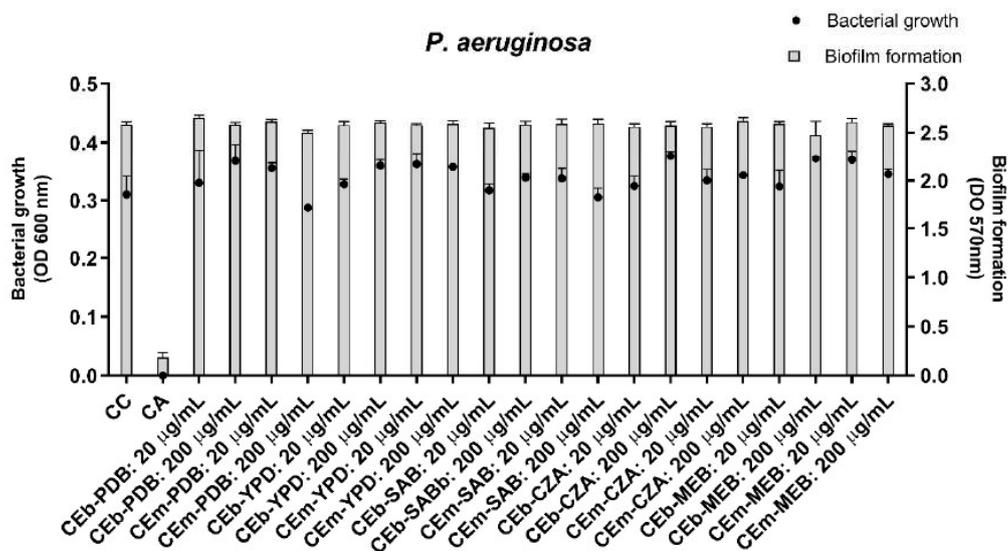
**Figure S6.** Base peak chromatograms obtained in positive ionization mode by HPLC-MS of the crude extracts of broth (CEb) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 cultures on different types of medium.



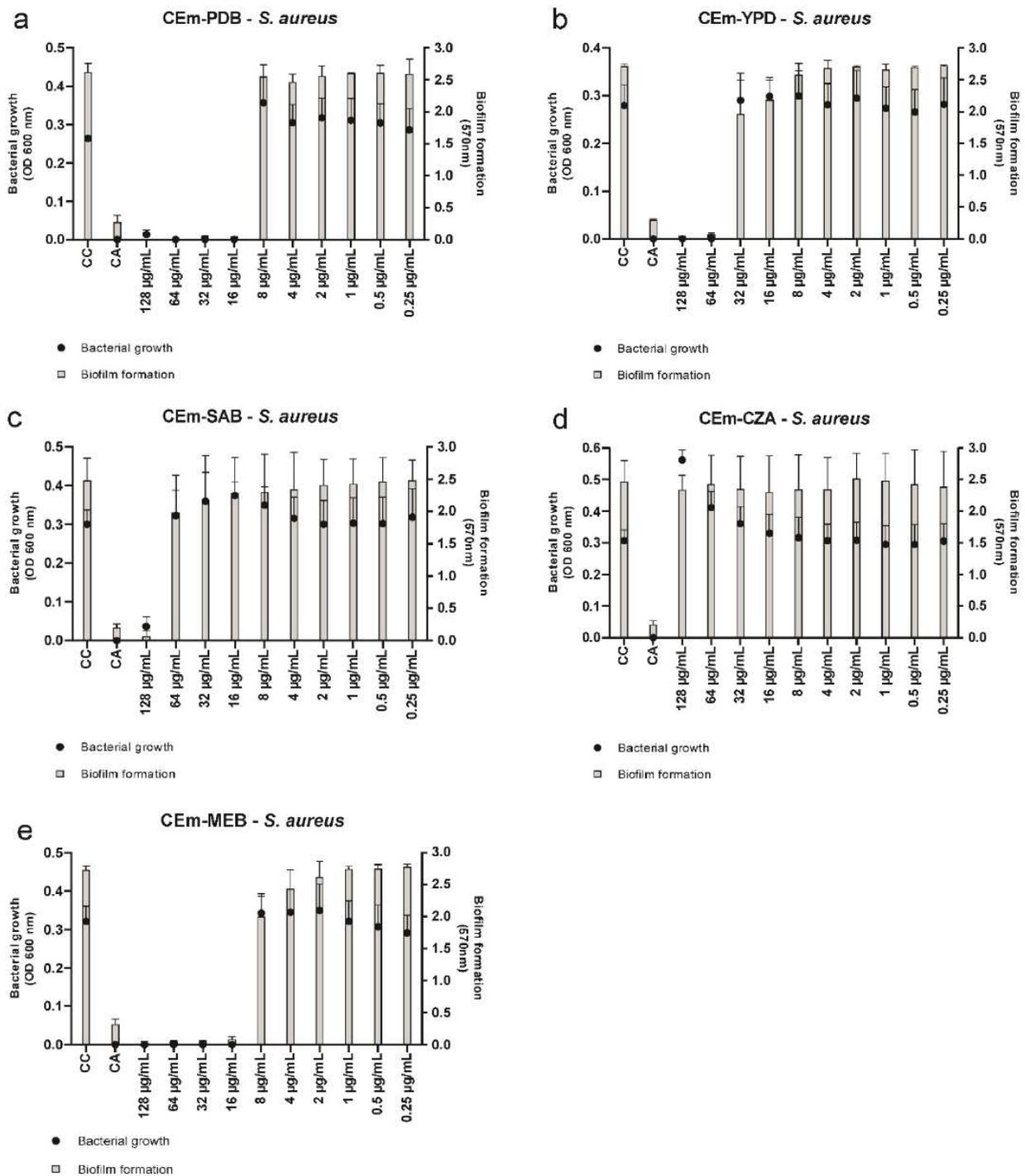
**Figure S7.** Base peak chromatograms obtained in positive ionization mode by HPLC-MS of the crude extracts of biomass (CEm) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 cultures on different types of medium.



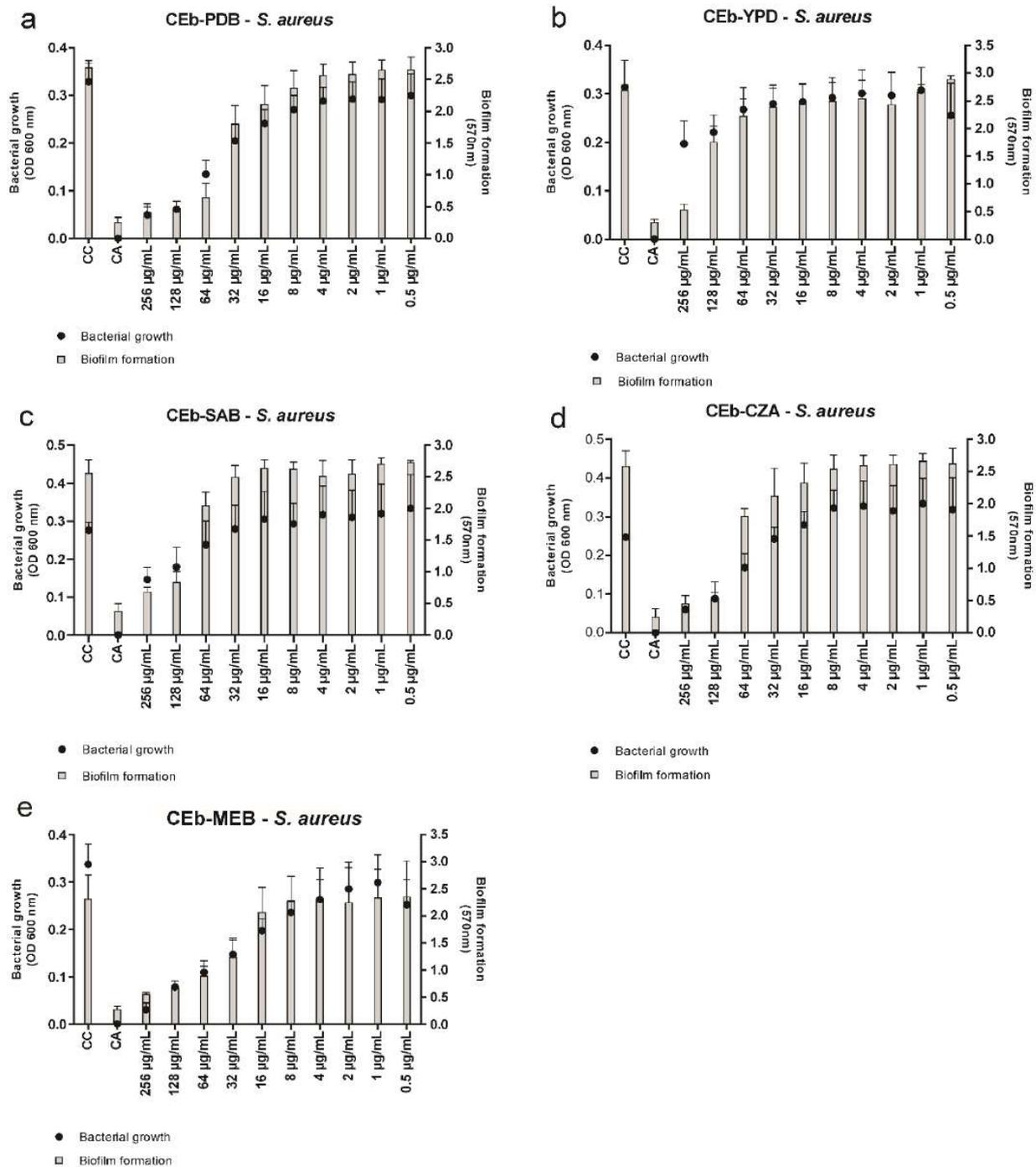
**Figure S8.** Metabolomic study of the *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 in relation to different extracts from broth (CEb-PDB, CEb-MEB, CEb-SAB, CE-YPD, and CEb-CZA) and mycelial biomass (CEm-PDB, CEm-MEB, CEm-SAB, CEm-YPD, and CEm-CZA). Major metabolites identified by PLS-DA and VIP score analyses on the x-axis. The colored squares on the right indicate the relative intensities of the compounds in each group.



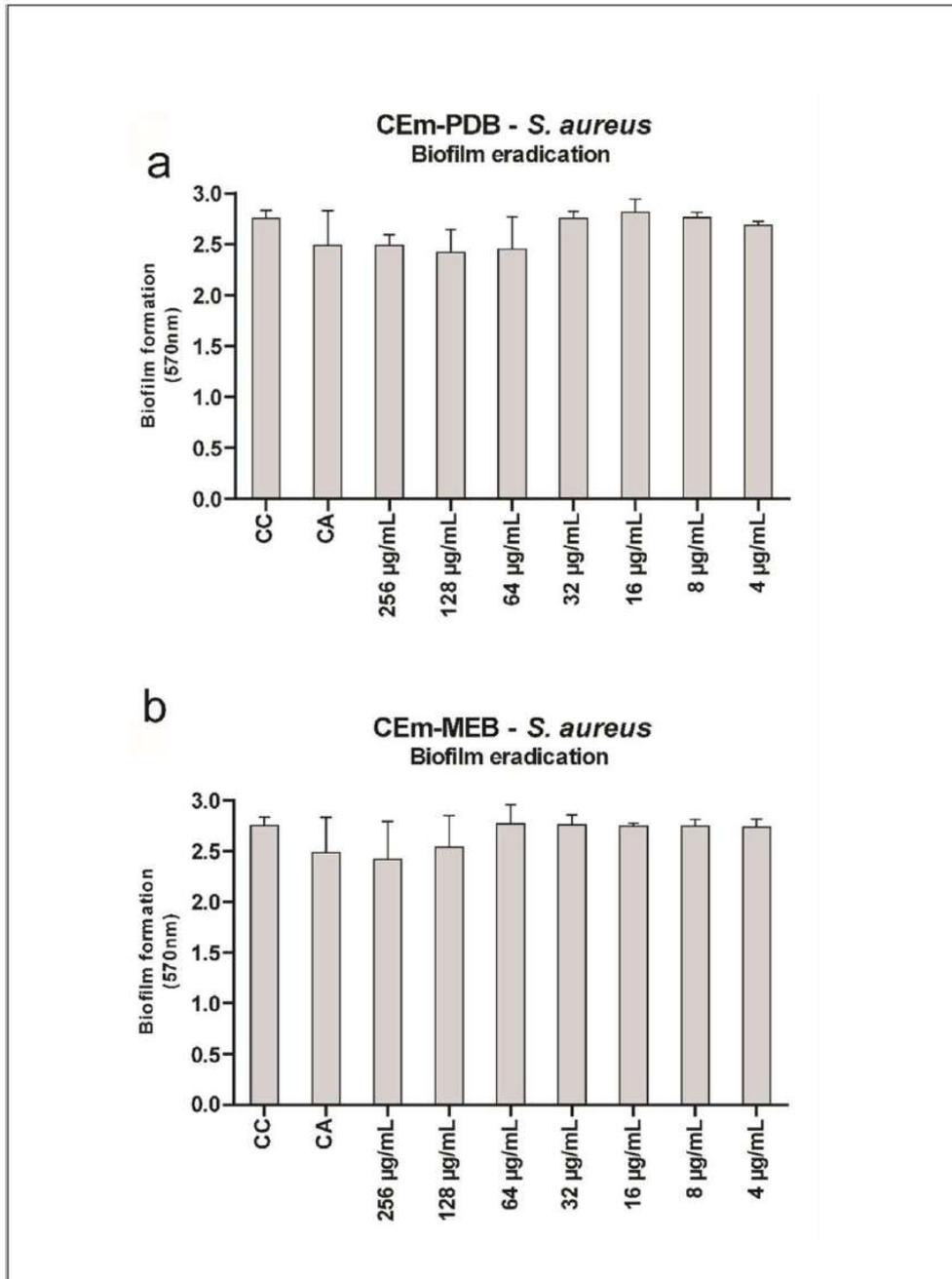
**Figure S9** - Biofilm formation and bacterial growth of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in the presence of 20 and 200 µg/mL of the broth (CEb) and biomass crude extracts (CEb) from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. CC = Growth control, culture medium only; CA = Activity control, gentamicin 20 µg/mL



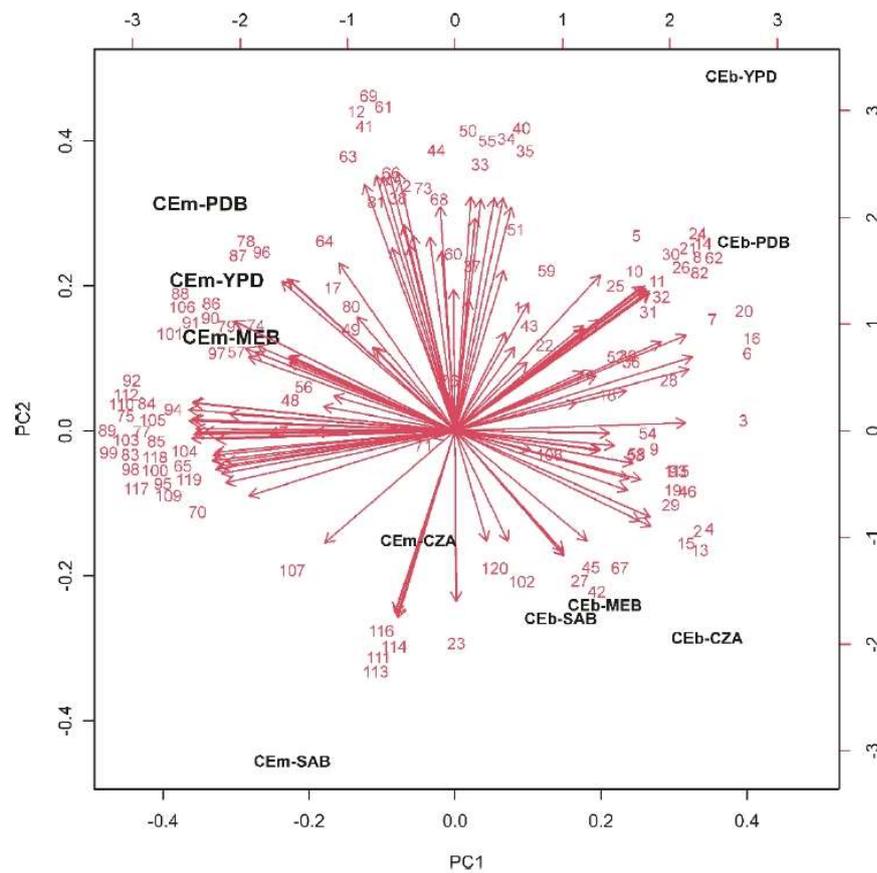
**Figure S10.** Biofilm formation and bacterial growth of *S. aureus* (ATCC 6538) treated with the biomass crude extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 ((a) CEm-PDB; (b) CEm-YPD; (c) CEm-SAB; (d) CEm-CZA; (e) CEm-MEB) at different concentrations. CC = Growth control, culture medium only; CA = activity control, gentamicin 20 µg/mL.



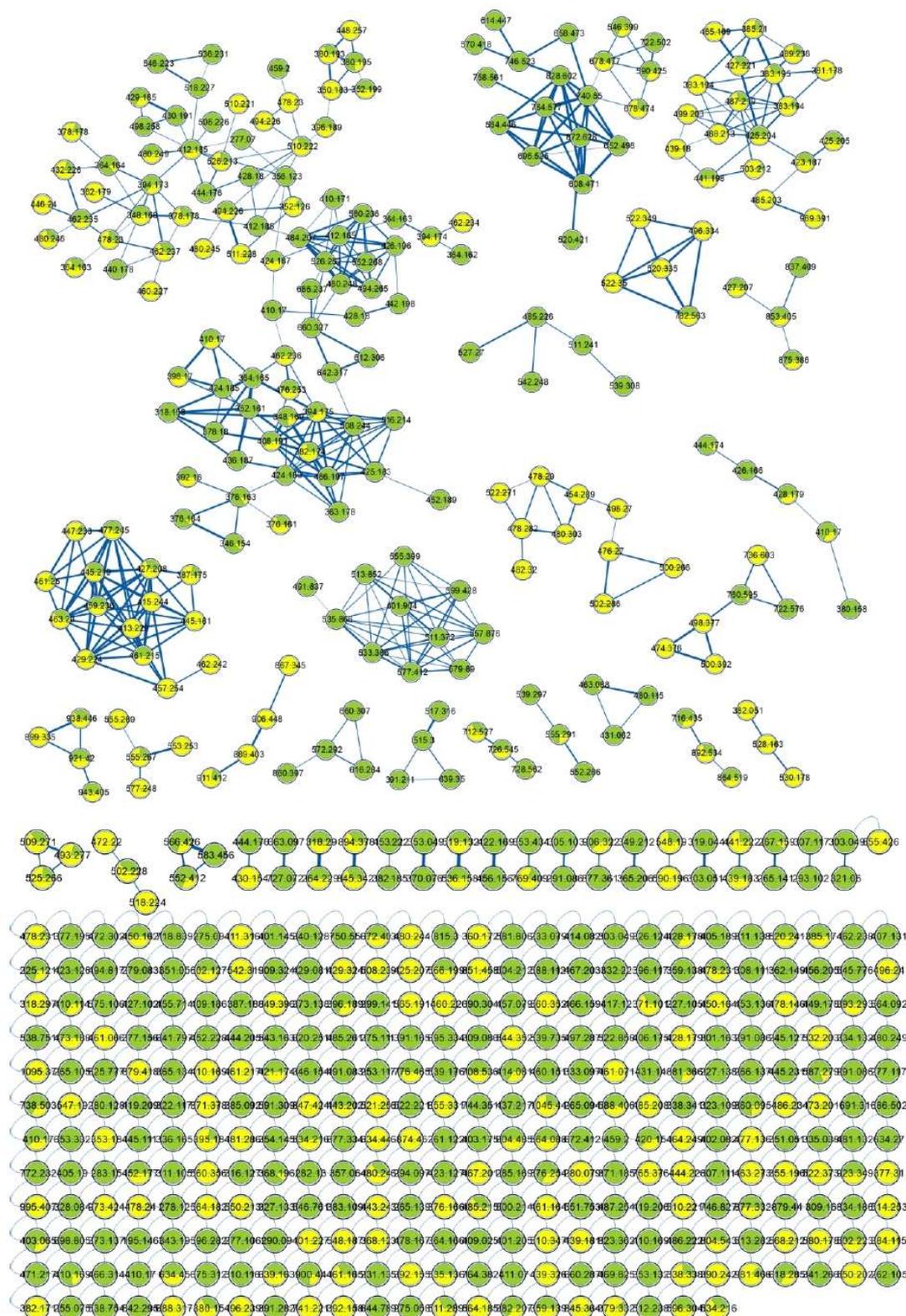
**Figure S11.** Biofilm formation and bacterial growth of *S. aureus* treated with broth crude extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4. (a) CEB-PDB; (b) CEB-YPD; (c) CEB-SAB; (d) CEB-CZA; (e) CEB-MEB) at different concentrations. CC = Growth control, culture medium only; CA = activity control, gentamicin 20 µg/mL.



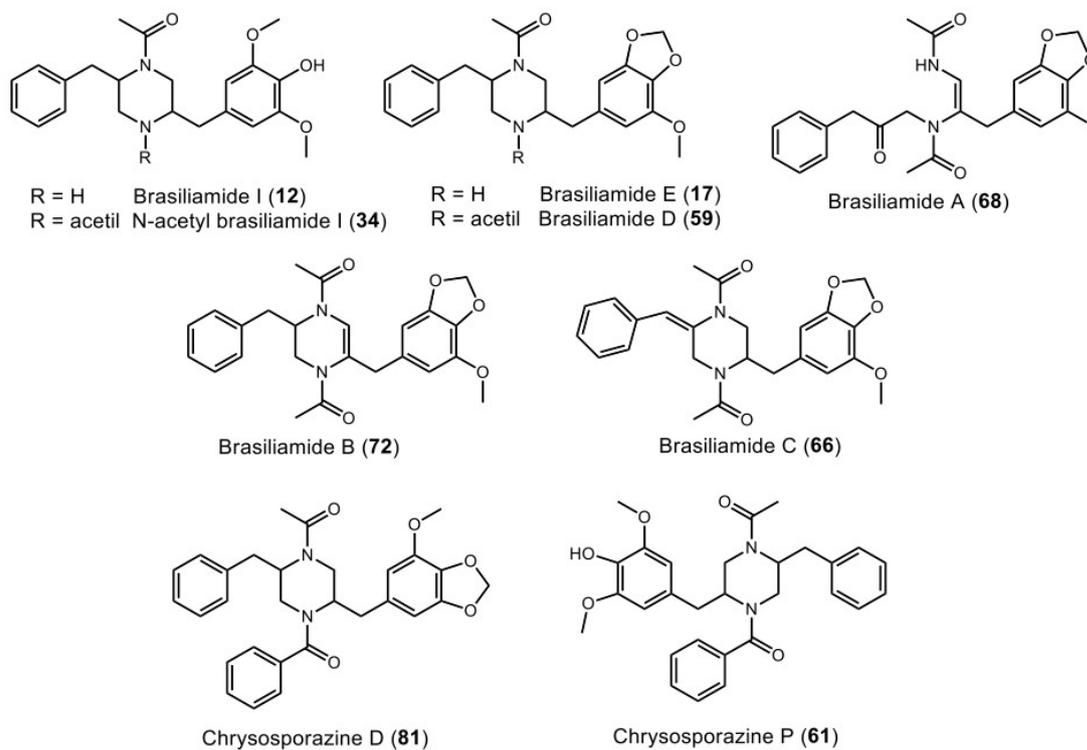
**Figure S12.** Pre-formed biofilm *S. aureus* treated with the biomass extracts CEm-PDB and CEm-MEB of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 at different concentrations. CC = Growth control; CA = activity control, vancomycin at 20 µg/mL.



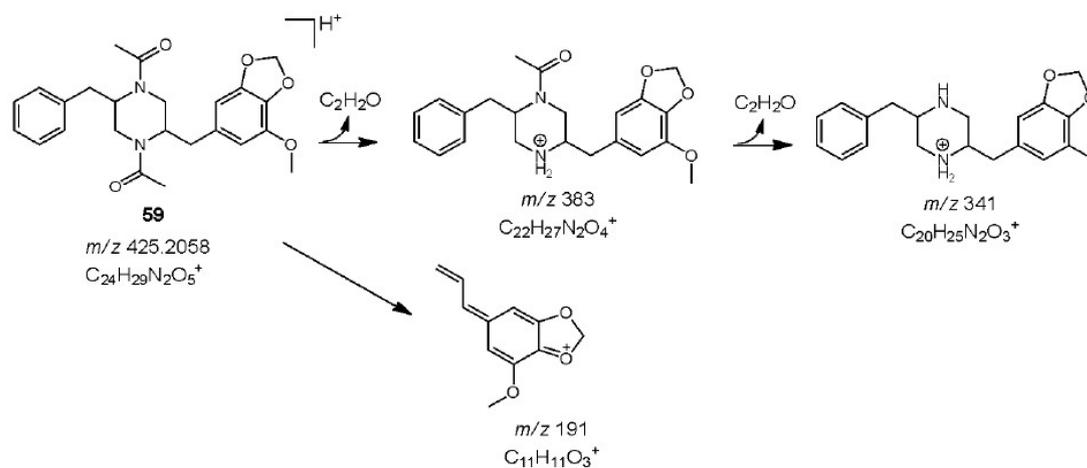
**Figure S13.** Biplot of principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). The samples CEm-PDB, CEm-YPD, and CEm-MEB are the most active against *S. aureus*.



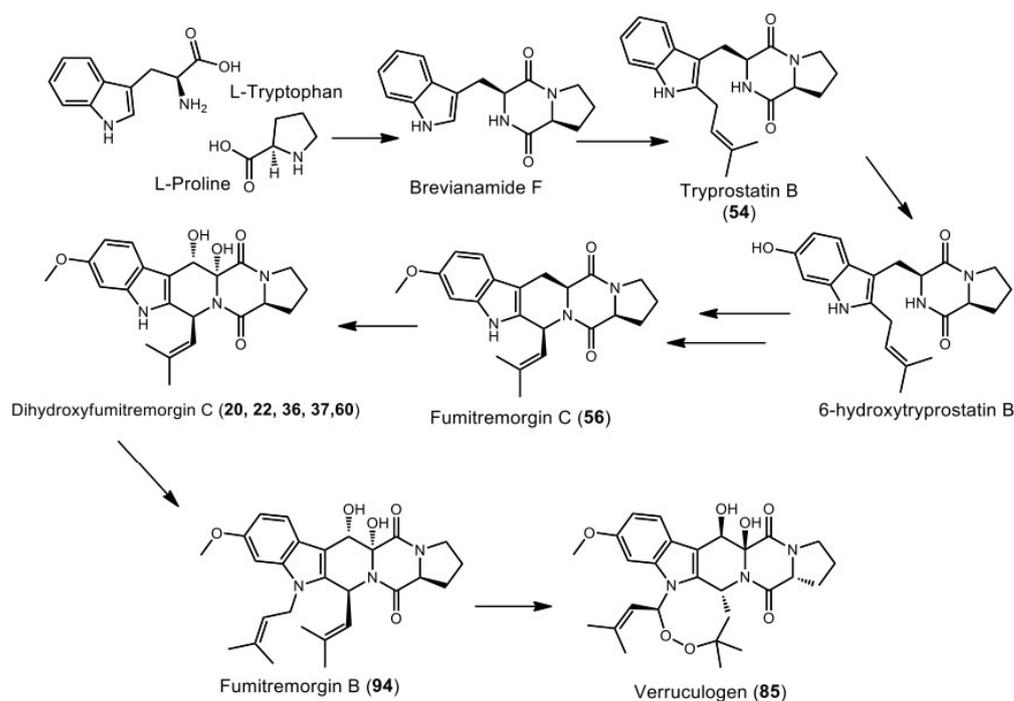
**Figure S14.** Molecular networking of crude extracts from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, using positive ionization mode (ESI+) data. Crude extracts from broth (CEb) samples are colored green and Crude extracts from biomass (CEm) samples are colored yellow. The edge strength is proportional to the cosine values.



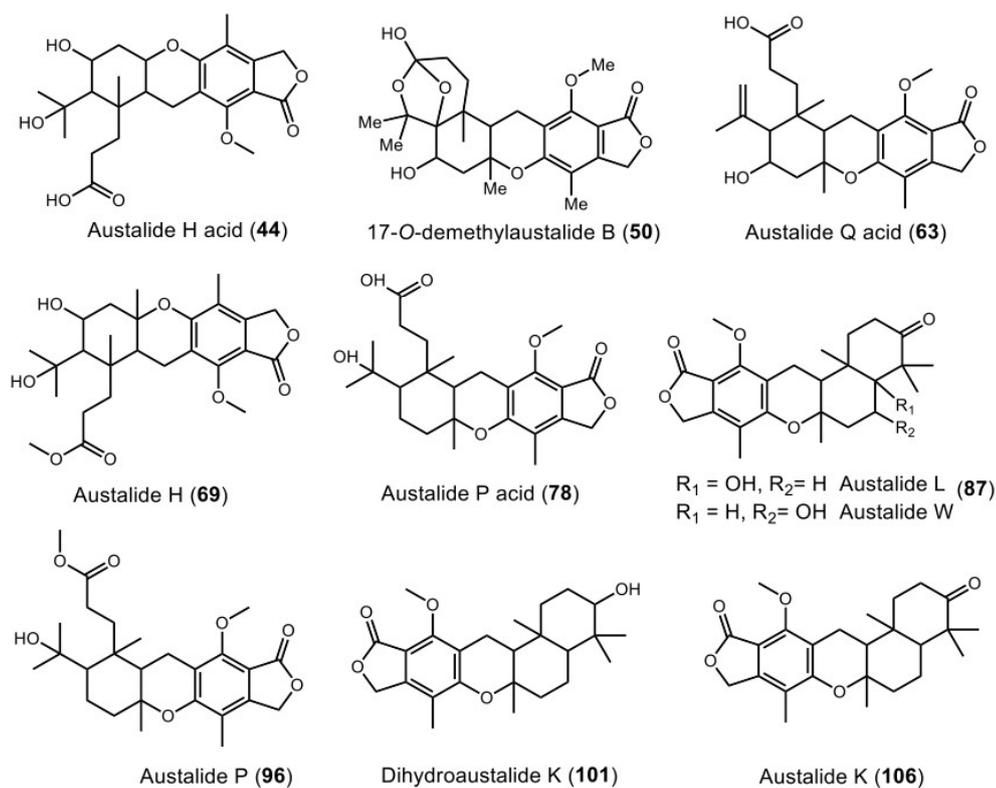
**Figure S15.** Structures of brasiliamides and chrysosporazines annotated in extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4.



**Figure S16.** Fragmentation proposal for some observed ions for metabolite 59.



**Figure S17.** Simplified proposal of the biosynthetic pathway for verruculogen based on Han et al [1]. Metabolites with the indication of numbers were annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4.



**Figure S18.** Structures of austerolide-type meroterpenoid annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4.

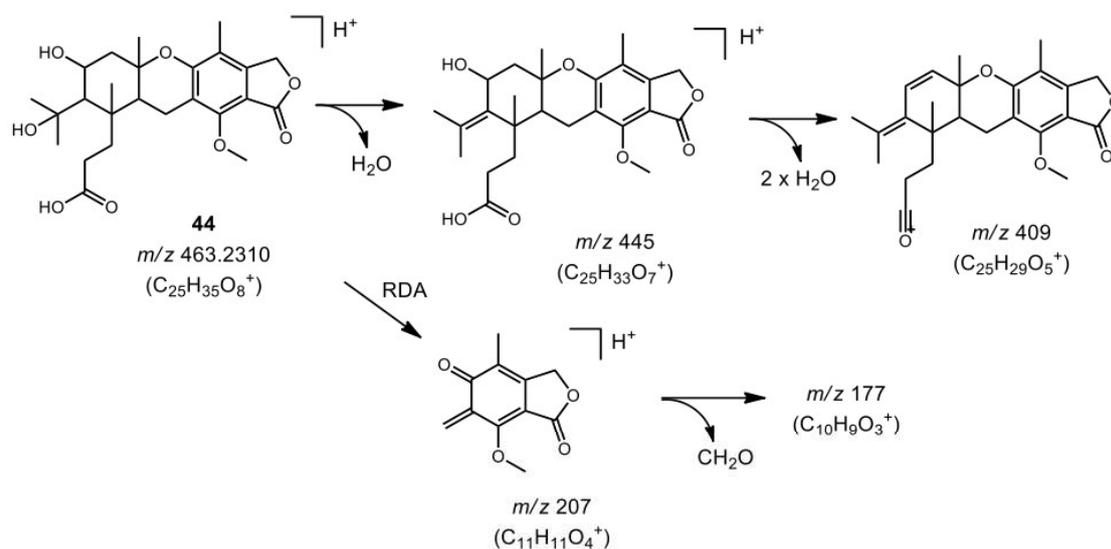


Figure S19. Proposed fragmentation pathway for metabolite 44.

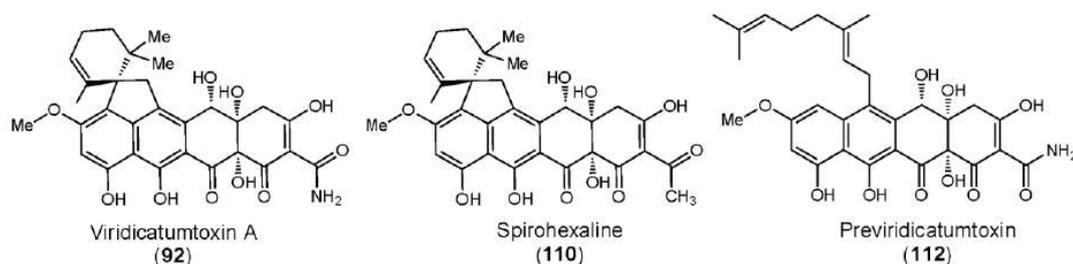


Figure S20. Polyketides annotated from extracts of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4.

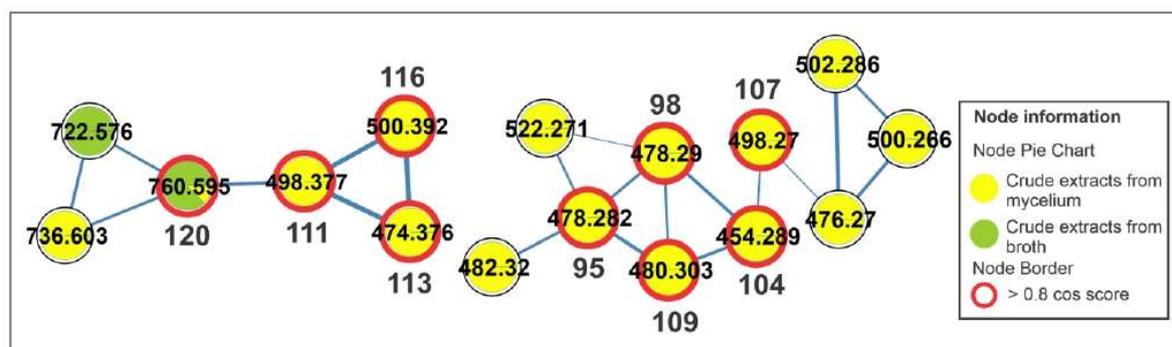


Figure S21. Cluster of lipid compounds from the molecular network of the crude extracts of mycelium biomass (CEm) and broth (CEb) of the endophytic fungi *Penicillium* sp. strain 5MP2F4, considering the positive ionization mode (ESI+) data. Nodes represent parent ions, and edge strength indicates the chemical similarity between the MS/MS spectra. Groups of samples CEm and CEsb in yellow and green color, respectively. The numbers represent the annotated metabolites described in Table 1 and the nodes circled in red indicate the compounds annotated by GNPS.

**Table S1:** Table of spectral data of constituents of biomass and broth crude extracts from *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 by HPLC-DAD-MS/MS.

Peak	RT (min)	UV (nm)	MF**	Positivo (m/z)		Negativo (m/z)	
				[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS
1	2.60	301	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>	294.0975	210, 164	-	-
2	3.89	-	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	189.0761	171	187.0619	169
3	11.16	-	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	275.0582 <sup>f</sup>	209, 171, 158, 153	291.0551	-
4	11.68	-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	171.0655	155	169.0511	94
5	11.99	-	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	261.0985	-	259.0825	-
6	12.90	259, 300	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	151.0384 <sup>f</sup>	-	167.0344	-
7	13.78	298	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	285.0399	-	283.0247	-
8	15.36	-	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	243.0866	167	-	-
9	15.65	284	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	225.1232	189, 161, 145	223.1092	208
10	16.32	286	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	275.1124	257, 207, 197, 165, 153	-	-
11	16.64	280, 320	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	194.0813	176, 158	-	-
12	17.15	290	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	385.2123	368, 343, 217, 193, 175, 167	-	-
13	17.26	-	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	195.1486	177, 162, 147	-	-
14	18.54	291	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	394.1753 <sup>2f</sup>	394, 338, 310, 287, 259, 214, 202, 174	428.1821	-
15	19.34	267, 345	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	353.0498	322, 261, 246, 221, 205, 177	351.0371	319, 245, 217, 188, 175, 159
16	21.56	-	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	207.1115 <sup>f</sup>	229, 207, 189, 161, 146	251.1038	-
17	21.73	282	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	383.1958	366, 341, 217, 175, 165	-	-
18	22.18	290	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	394.1753	-	-	-
19	23.47	-	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	349.2129	293, 265, 209, 179, 163	-	-
20	23.78	269, 284	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1863	394, 315, 287, 269, 251, 236, 211	-	-
21	24.64	290, 380	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	444.1760	390, 362, 339, 311, 230, 202	442.1613	-

22	25.67	268, 296	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1855	394, 356, 338, 310, 287, 259, 231, 213, 188	410.1718	-
23	26.21	-	C <sub>39</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub>	853.4161	741, 569, 457, 379, 285, 173	851.4021	-
24	26.23	290	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	410.1701	392, 326, 295, 269, 251, 228, 178	458.1934	-
25	26.82	291, 395	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	426.1664 <sup>f</sup>	391, 362, 319, 293, 267, 230, 202, 174	442.1606	-
26	26.98	290	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	410.1705 <sup>f</sup>	313, 287, 230, 188, 162	426.1702	-
27	27.06	285, 320	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.0862	276, 259, 231, 215, 207, 185, 159, 147	289.0718	-
28	27.11	-	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	394.1760	297, 279, 269, 251, 236, 224	442.198	-
29	27.14	-	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	405.1895	341, 295, 247, 229, 201, 183, 153	403.1743	-
30	27.22	-	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	412.1869 <sup>M</sup>	370, 315, 287, 258, 216, 193, 161	442.1984	-
31	27.36	-	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	484.2073	412, 394, 315, 287, 269, 251, 236, 211, 168	-	-
32	28.58	-	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	426.1963	343, 287, 269, 211, 167	-	-
33	28.65	290, 390	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	410.1705	392, 364, 313, 295, 285, 267, 257, 240, 228, 213, 200, 188	-	-
34	28.76	-	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	427.2212	385, 343, 277, 252, 217, 193, 175, 167	-	-
35	28.95	284	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	209.1278	-	-	-
36	29.10	284	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	394.1745	366, 338, 297, 269, 241	392.1612	-
37	29.38	284	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	394.1752 <sup>f</sup>	366, 338, 297, 269, 241	410.1714	-
38	29.76	-	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	382.1755	358, 251, 236, 221	380.1619	-
39	30.07	-	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	394.1756	350, 310, 269, 259, 231, 213, 199	-	-
40	30.13	270	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	364.1655	290, 267, 239, 222, 182, 167	-	-
41	30.16	-	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	555.2699	397, 354, 217, 181	553.2786	-
42	30.42	282	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	405.1899	387, 359, 323, 271, 253, 229, 183, 165	403.1753	-
43	30.61	293, 431	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	392.1600 <sup>f</sup>	337, 313, 267, 251, 197, 179	-	-
44	30.65	269	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	463.2310	445, 427, 409, 331, 285, 245, 207, 177	461.2171	-
45	30.65	-	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	265.1439	219, 203, 173, 268, 159	263.1289	-
46	30.83	279	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	267.1725	249, 203, 185, 175, 159, 147	265.1446	219, 189, 161
47	30.97	290	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	378.1790 <sup>f</sup>	197, 215, 226, 253, 264, 281, 310, 348	394.1763	-
48	31.01	-	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	348.1704 <sup>f</sup>	320, 251, 223, 196, 185, 167, 157	364.1665	-
49	31.18	272, 295	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	394.1744	350, 297, 259, 231, 213, 198, 174	392.1598	-

50	31.23	270	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	461.2156	417, 399, 315, 245, 207, 177	459.2007	-
51	31.28	-	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	441.1986	-	-	-
52	31.32	-	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	408.1893	390, 251, 236	-	-
53	31.46	267, 345	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	463.0870	385, 353, 325, 273, 246, 207, 162	461.0724	-
54	31.49	280	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	352.2019	312, 296, 273, 252, 198, 183, 168, 156	-	-
55	31.74	285	C <sub>31</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	596.3086	568, 457, 356, 317, 280, 231, 259, 181, 169	-	-
56	31.89	274, 298	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	380.1947	324, 255, 226, 212, 199, 184	-	-
57	32.08	283	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	488.2171	446, 428, 339, 280, 239, 229, 208, 191, 165	-	-
58	32.13	267, 345	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	431.0600 <sup>M</sup>	415, 413, 399	461.0721	-
59	32.14	-	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	425.2058	383, 341, 250, 217, 191, 175	-	-
60	32.37	275	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	412.1854	394, 356, 336, 310, 282, 259, 213, 173	-	-
61	32.42	-	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	489.2372	471, 447, 429, 311, 263, 238, 207, 193, 167	-	-
62	32.48	-	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	348.1698	-	-	-
63	32.48	277	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	445.2216	427, 409, 331, 273, 245, 207, 177	-	-
64	32.68	276	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	352.2014	296, 284, 268, 240, 198, 170	-	-
65	32.81	-	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.2220	368, 340, 322, 310, 294, 271, 243, 215, 197, 160	-	-
66	32.89	-	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	423.1899	381, 339, 248, 173	-	-
67	32.97	282	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	179.1539	-	-	-
68	33.07	275	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	439.1861	380, 338, 308, 280, 247, 165	437.1705	378, 214, 172
69	33.19	278	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	477.2460	459, 441, 409, 391, 345, 318, 245, 207, 177	-	-
70	33.29	-	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	509.2747	450, 340, 322, 294, 283, 271, 243, 215, 160	-	-
71	33.33	-	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.2316	340, 322, 294, 271, 243, 215, 197, 160	-	-
72	33.50	272	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	423.1865	363, 189, 165	-	-
73	33.58	269	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	445.2198	369, 331, 273, 245, 207, 177	-	-
74	33.90	-	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	503.2177	446, 382, 341, 279, 238, 191, 175, 165	-	-
75	34.06	-	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	510.2231	322, 279, 271, 243, 225, 201	-	-
76	34.45	-	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	398.1712	313, 295, 267, 252, 239, 224, 209	396.1581	-
77	34.56	-	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	335.2181 <sup>N</sup>	219, 199, 183, 171	311.2223	-
78	34.60	269	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	447.2362	329, 273, 247, 207, 177	445.2219	-

79	34.64	273	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	503.2249	444, 382, 340, 238, 207, 177, 165, 149	-	-
80	34.67	-	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	410.1712	313, 295, 267, 239, 224	-	-
81	34.73	-	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	487.2217	469, 445, 366, 335, 279, 238, 191, 165	-	-
82	34.84	-	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	660.3290	412, 394, 366, 315, 287	-	-
83	35.09	-	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	510.2213 <sup>f</sup>	381, 320, 292, 252, 227, 157	526.217	-
84	35.09	-	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	478.2324	376, 336, 322, 269, 243, 215, 211, 197	-	-
85	35.38	276, 295	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	494.2282 <sup>f</sup>	352, 255, 227, 199	510.2234	-
86	35.59	284	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2375 <sup>f</sup>	411, 356, 327, 282, 231, 214, 148	478.2321	-
87	35.81	265	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	429.2259	354, 329, 273, 245, 207, 177, 149	-	-
88	35.93	286	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	485.2076	380, 322, 218, 165	-	-
89	36.21	289	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	446.2426 <sup>f</sup>	362, 226, 212, 160	-	-
90	36.34	284	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	478.2325 <sup>f</sup>	432, 364, 279, 240, 224, 212, 198	-	-
91	36.41	277, 296	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2375 <sup>f</sup>	320, 268, 240, 226, 212, 186	-	-
92	36.55	284, 430	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	548.1909 <sup>f</sup>	531, 513, 464, 433, 421, 407, 393, 375, 365, 335, 279	564.187	-
93	36.55	-	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	642.3179	394, 348, 269, 297, 251	-	-
94	36.58	290	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	462.2389 <sup>f</sup>	394, 327, 310, 269, 240, 214, 200, 174, 158	-	-
95	36.68	284	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	478.2869	337, 306, 191	476.2777	-
96	36.77	-	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	443.2418 <sup>f</sup>	329, 273, 245, 207, 177, 149	-	-
97	36.83	-	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	548.1909 <sup>f</sup>	531, 513, 439, 421, 393, 363, 335, 325, 305, 283, 278	-	-
98	37.02	287	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	478.2900	337, 306	476.2744	-
99	37.05	-	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	448.2574	396, 380, 281, 255, 226, 199	-	-
100	37.25	-	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>7</sub> P	520.3381	337, 244, 152	-	-
101	37.32	-	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	415.2484	359, 261, 207, 177	-	-
102	37.42	-	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>9</sub>	552.4114	439, 394, 326, 281, 227, 213, 199, 185	-	-
103	37.57	-	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	462.2378	-	-	-
104	37.74	-	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	454.2941	313, 282	452.2788	-
105	37.93	-	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	446.2434	378, 363, 350, 311, 294, 281, 253, 243, 212	-	-
106	38.04	-	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	413.2400	354, 261, 207, 177	-	-

107	38.07	-	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P	498.3781	236	-	-
108	38.13	-	C <sub>30</sub> H <sub>55</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	566.4266	340, 295, 267, 227, 199	-	-
109	38.28	-	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>7</sub> P	480.3082	449, 339, 308	478.2944	-
110	38.40	-	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	547.1949 <sup>F</sup>	477, 435, 365, 313, 267, 221, 184	563.1918	-
111	38.45	-	C <sub>28</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>6</sub>	498.3711	480, 236	-	-
112	38.72	-	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>	550.2062 <sup>F</sup>	515, 431, 409, 351, 313, 275, 257	566.2027	-
113	39.35	-	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>6</sub>	474.3750	313, 236	-	-
114	39.43	-	C <sub>28</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>6</sub>	500.3936	236	-	-
115	39.83	-	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	517.3159	454, 357, 233, 203, 187	515.3009	-
116	39.85	-	C <sub>28</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>6</sub>	500.3881	482, 339, 236	-	-
117	41.05	-	C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	377.2712	-	-	-
118	41.15	-	C <sub>23</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	379.3334	-	-	-
119	42.28	-	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	303.2285 <sup>N</sup>	234	-	-
120	42.29	-	C <sub>46</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>7</sub>	760.6030	653, 600, 498, 480, 436, 236	-	-

MF: Molecular Formula; RT: retention time; -: confirmed by authentic standard; \*\*: determined by considering errors and mSigma less than 8 ppm and 30, respectively. <sup>F</sup>: [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; <sup>N</sup>: [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>P</sup>: [M+H-HCOOH]<sup>+</sup>; <sup>M</sup>: [M+H-CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>.

**Table S2.** Presence or absence of compounds in the extracts of broth and biomass of *Penicillium* sp. strain 5MP2F4 by HPLC-DAD-MS analysis.

Peak	RT	CEb-CZAb	CEb-SAB	CEb-MEB	CEb-PDB	CEb-YPD	CEm-CZA	CEm-SAB	CEm-MEB	CEm-PDB	CEm-YPD
1	2.60	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-
2	3.89	X	X	X	X	X	-	X	X	-	-
3	11.17	X	X	-	X	X	-	-	-	-	-
4	11.68	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
5	12.00	X	-	X	X	X	-	-	-	X	X
6	12.90	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-
7	13.79	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-
8	15.36	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
9	15.65	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-
10	16.33	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X
11	16.64	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
12	17.16	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X
13	17.26	X	X	X	X	X	-	X	X	-	-
14	18.54	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
15	19.35	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-
16	21.56	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-
17	21.74	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-
18	22.18	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-
19	23.48	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
20	23.78	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-
21	24.64	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
22	25.67	-	X	X	X	X	-	X	-	X	X
23	26.21	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
24	26.24	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
25	26.82	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
26	26.99	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
27	27.07	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	27.11	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-
29	27.15	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
30	27.22	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
31	27.36	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
32	28.58	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
33	28.66	-	X	-	X	X	-	-	X	X	X
34	28.76	-	-	-	X	X	-	-	-	X	X
35	28.95	-	-	-	X	X	-	-	X	X	-

36	29.10	X	-	-	X	X	-	X	-	X	-
37	29.38	X	X	-	X	X	-	X	X	X	X
38	29.76	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X
39	30.08	-	-	-	X	X	-	X	-	-	-
40	30.14	-	-	-	X	X	-	-	-	X	X
41	30.16	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X
42	30.43	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	30.62	-	-	-	X	X	-	X	-	-	X
44	30.66	X	-	-	X	X	-	-	X	X	X
45	30.66	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	30.83	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
47	30.97	-	X	X	-	X	-	X	X	X	X
48	31.01	-	X	X	-	X	-	X	X	X	X
49	31.19	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X
50	31.23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
51	31.29	X	-	-	X	X	-	-	X	X	-
52	31.32	X	-	-	X	X	-	X	-	X	-
53	31.46	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
54	31.49	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-
55	31.74	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
56	31.89	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X
57	32.08	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-
58	32.13	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
59	32.14	X	-	X	X	X	-	-	X	X	-
60	32.37	-	-	-	X	X	-	X	-	X	X
61	32.43	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X
62	32.48	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
63	32.48	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X
64	32.69	-	-	-	X	X	-	X	X	X	X
65	32.82	-	X	-	-	-	-	X	X	X	X
66	32.90	X	-	-	X	X	-	-	X	X	X
67	32.97	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-
68	33.08	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X
69	33.19	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X
70	33.29	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X
71	33.34	-	X	X	X	X	-	X	X	-	X
72	33.50	-	-	-	X	X	-	-	X	X	-
73	33.58	X	-	X	X	X	-	-	X	X	X
74	33.91	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-
75	34.07	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
76	34.45	-	-	-	-	X	-	X	-	-	X

77	34.56	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
78	34.61	-	-	-	X	-	-	-	X	X	X
79	34.65	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-
80	34.68	-	-	-	-	X	-	X	-	X	X
81	34.74	X	-	-	X	X	X	-	X	X	X
82	34.84	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-
83	35.09	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
84	35.09	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
85	35.39	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
86	35.59	-	-	-	-	X	-	X	X	X	X
87	35.82	-	-	-	X	-	-	-	X	X	X
88	35.94	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X
89	36.21	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
90	36.35	-	-	-	-	X	-	X	X	X	X
91	36.41	-	-	-	-	X	-	X	X	X	X
92	36.55	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
93	36.55	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
94	36.58	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
95	36.68	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
96	36.78	-	-	-	X	-	-	-	X	X	X
97	36.83	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-
98	37.02	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
99	37.05	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
100	37.26	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
101	37.33	-	-	-	-	-	X	-	X	X	X
102	37.43	-	X	X	X	-	-	X	X	-	-
103	37.57	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
104	37.75	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
105	37.93	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
106	38.04	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X
107	38.07	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-
108	38.13	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X
109	38.29	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
110	38.40	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
111	38.46	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
112	38.73	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X
113	39.36	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
114	39.44	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
115	39.83	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
116	39.86	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
117	41.06	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X

---

118	41.15	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
119	42.29	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
120	42.30	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-

### References

1. Han, J.; Liu, M.; Jenkins, I.D.; Liu, X.; Zhang, L.; Quinn, R.J.; Feng, Y. Genome-inspired chemical exploration of marine fungus *Aspergillus fumigatus* MF071. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 352.

## *Capítulo 5*

## 6. Capítulo 5

Viridicatum toxina A, uma tetraciclina rara e bioativa, é eficientemente obtida de *Penicillium* sp. através de extração acelerada por solvente (EAS).

O conteúdo deste capítulo é composto pelo artigo intitulado “*Viridicatumtoxim A, a rare and bioactive tetracycline, is efficiently obtained from Penicillium sp by Accelerated extraction solvent (ASE)*”, a ser submetido para publicação no periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências.

*Viridicatumtoxim A, a rare and bioactive tetracycline, is efficiently obtained from  
Penicillium sp. by Accelerated extraction solvent (ASE)*

Fernanda Motta Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Caroline de Moura Costa<sup>1</sup>, Júlio Menta de Almeida<sup>1</sup>,  
Lucas Haidar Martorano<sup>4</sup>, Heron Fernades Torquato<sup>2</sup>, Lia Carolina Soares Medeiros<sup>5</sup>,  
Flávia Roberta Brust<sup>6</sup>, Fernando Martins dos Santos Junior<sup>4</sup>, Edgar Julian Paredes-  
Gamero<sup>2</sup>, Alexandre José Macedo<sup>6</sup>, Gecele Matos Paggi<sup>3</sup>, Denise Brentan Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil;

<sup>3</sup>Laboratório de Ecologia e Biologia Evolutiva (LEBio), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil;

<sup>5</sup>Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Curitiba, Brazil;

<sup>6</sup>Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding Authour:** Denise Brentan Silva<sup>1\*</sup>, Federal University of Mato Grosso do Sul, Center for Biological and Health Sciences at UFMS, CA Central of Campo Grande, 79002970 - Campo Grande, MS - Brazil - PO Box: 549, Phone: (67) 33457366, [denise.brentan@ufms.br](mailto:denise.brentan@ufms.br)

**Professional address and ORCID of all authors:**

Fernanda Motta Ribeiro da Silva<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, <https://orcid.org/0000-0002-9244-333X>

Caroline de Moura Costa<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, <https://orcid.org/0000-0003-0821-6335>

Júlio Menta de Almeida<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-0626-5109>

Lucas Haidar Martorano<sup>4</sup>. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil.

Heron Fernandes Torquato<sup>2</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil.

Lia Carolina Soares Medeiros<sup>5</sup>, Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ. Rua Professor Algacyr Munhoz Mader - 3775, Bloco C. Cidade Industrial, 81350010 - Curitiba, PR - Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-9390-9157>

Flávia Roberta Brust<sup>6</sup>. Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves, 4500, nº43431 - Campus do Vale - CEP 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-2365-6403>

Fernando Martins dos Santos Junior<sup>4</sup>. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

Edgar Julian Paredes-Gamero<sup>2</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-3686-8402>

Alexandre José Macedo<sup>6</sup>. Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves, 4500, nº43431 - Campus do Vale - CEP 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-8951-4029>

Gecele Matos Paggi<sup>3</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-2572-8471>

Denise Brentan Silva<sup>1\*</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, +55 67 3345-7366. <https://orcid.org/0000-0003-0872-2756>

**Running title:** Viridicatumtoxim A can be obtained by Accelerated extraction solvent (ASE)

**Academy Section to which the content of the work belongs:** Microbiologia

**Abstract**

Endophytic fungi are an important source of bioactive metabolites with different and complex scaffolds and a huge biological and pharmacological potential to be explored, such as the viridicatumtoxins that are rare tetracyclines. The aim of this study was to evaluate the extraction from fungal mycelia by accelerated solvent extraction (ASE) compared to conventional procedures, such as ultrasound-assisted extraction (UAE), to isolate viridicatumtoxin A (VRA), and to evaluate its biological properties. Here we studied the endophytic fungi *Penicillium* sp. obtained from leaves of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). The efficiency of ASE was higher than UAE, revealing an increment of 27.1% for the ASE extracts. The optimized extraction by ASE also allowed the isolation of VRA, a rare class of fungal tetracycline-like antibiotic, without further purification steps, and high yields were obtained. VRA was evaluated against amastigotes of *Leishmania infantum* and exhibited an IC<sub>50</sub> value of 0.017  $\mu$ M. VRA also exhibited MIC of 8  $\mu$ g/mL against *Staphylococcus aureus* and inhibition of viability cells up to 90% against leukemia cell lines Kasumi-1 and KG-1 at 100 $\mu$ g/mL.

**Keywords:** endophytic fungi, tetracyclines, antileishmania, biofilm, antibacterial, anticancer.

## INTRODUCTION

Endophytic fungi colonize plant tissues by mutualist relationship, exhibiting beneficial effects for plants (ALAM et al., 2021). These effects are related to resistance and growth plants, such as improved growth, increased stress tolerance, and enhanced resistance to pests and diseases (FADIJI; BABALOLA, 2020). Endophytic fungi have been studied for their potential applications in agriculture and medicine by the production of drug candidates (ADELEKE; BABALOLA, 2021). For example, some endophytic fungi biosynthesize secondary metabolites with antiviral (LACERDA; POLONIO; GOLIAS, 2022), antibacterial (DESHMUKH et al., 2022), or insecticidal properties (KUMAR; KAUSHIK, 2012), as well as potential compounds for the development of drugs or bioproducts. Different metabolites are produced by endophytic fungal strains, such as alkaloids, flavonoids, terpenoids, quinones, and polyketides, which are also important for industrial applications (ALAM et al., 2021).

Natural product chemistry usually aims to isolate novel scaffolds by using the easiest and fastest purification procedures with high yields that facilitate the exploration and application industrial. In the search for fungal bioactive metabolites, several studies applied large-scale culture as a method for the discovery of novel or promising substances, since the bioactive target compounds are commonly accumulated in low contents or the purification process involves many steps that significantly reduces the final yields (HU; YE; ZHANG, 2021). Thus, when the aimed substance is present in traces, several repetitive culture and isolation steps are required. In addition, these classical methods require high time and solvent consumption (GUPTA et al., 2020). These appointments sometimes interfere with the scale-up required for pharmacological and toxicological studies or industrial and commercial applications.

From fungal mycelia, there are scarce studies to optimize the extraction, and usually, maceration is the chosen method (GUPTA et al., 2020; KJER et al., 2010). Microwave-assisted extraction (MAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), accelerated solvent extraction (ASE), and liquid-assisted extraction (ILAE) are extraction techniques with lower solvent and time consumptions than classical methods, promoting the improvement of yields and the possibility of automation (CARO et al., 2015; GUPTA et al., 2020; KAUFMANN; CHRISTEN, 2002). For the ASE extraction, an extractor solvent is submitted to high temperature (above boiling point), high pressure, and a nitrogen atmosphere is applied for extraction that promotes high extraction efficiency. This extraction technique is substantially influenced by temperature, extractor solvent composition, and pressure (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002; MOTTALEB; SARKER, 2012). ASE was firstly applied to extract polyketides red pigments from ascomycetous fungi (LEBEAU et al., 2017). Although ASE is an unusual technique to extract fungal mycelia, its advantages encourage its application for this purpose.

In addition, the selectivity of the extractor solvent in ASE can be adjusted and the maximum yield and/or number of metabolites may be obtained (GUPTA et al., 2020). Subsequently to the extraction, large-scale separation and purification steps are normally performed by classical phytochemical methods, but the compounds are exposed to solvents for a long time, as well as heat, air, light, and pH variation that can induce chemical modifications in the structures or degradations, hampering the good yields from these procedures, and high amounts of solvent residues can be produced (KJER et al., 2010; VIGNESHWARI et al., 2019).

Viridicatumtoxin A (VRA) is a rare tetracycline-like fungal molecule with a fused spirobicyclic ring system. It has already been isolated from *Penicillium viridicatum* (BENDELE et al., 1984), *P. expansum* (DE JESUS et al., 1982), *Paecilomyces* sp.

(SHANG et al., 2015), and *P. brasilianum* (BLADT et al., 2013). VRA showed various biological activities, including antibacterial, cytotoxicity, and antifungal activities (CAPON et al., 2005; LI et al., 2014; ZHENG et al., 2008). However, it is important to note that the enlargement of the biological properties from VRA are still required since it is considered a good drug candidate (NEWMAN, 2022).

The aim of this study was to investigate the extraction from fungal mycelia biomass by accelerated solvent extraction (ASE) compared to the conventional procedure UAE using a strain of the endophytic fungi *Penicillium* sp., additionally to optimize the isolation of viridicatumtoxin A (VRA) by ASE, and to evaluate it against *Staphylococcus aureus*, *Leishmania infantum*, and leukemia cancer cells (kasumi and KG-1) to expand the knowledge about its biological properties.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fungal material**

The strain *Penicillium* sp. 5MP2F4 was isolated from leaves of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) collected in biome Pantanal (Brazil) as described by MOTTA RIBEIRO DA SILVA et al., (2023).

### **Fermentation of *Penicillium* sp. 5MP2F4**

The fungus *Penicillium* sp. was initially cultivated on PDA (Potato Dextrose Agar - Infusion broth of 200 g/L potatoes, 20 g/L dextrose, and 15g/L agar) for 7 days at  $28 \pm 2$  °C. Subsequently, the pre-inoculum was prepared on submerged PDB medium (Potato Dextrose Broth – potato infusion obtained from infusion 200 g/L of potatoes) and 20 g/L of dextrose) and cultured under static conditions for 7 days at  $28 \pm 2$  °C.

From the pre-inoculum, the fungus was cultured on submerged PDB medium (10 x 1000 mL Erlenmeyer flasks each containing 350 mL of culture medium, and 15 mL of pre-inoculum) under static conditions, in the absence of light, and for 16 days at 28 °C. After the fermentation, they were filtered to obtain the mycelial fresh biomass (125 g), which was lyophilized to yield the dried mycelial biomass (19 g).

#### **Extraction from mycelial biomass of *Penicillium* sp. 5MP2F4**

##### **Ultrasound-assisted Extraction (UAE)**

The dried mycelial biomass was extracted with ethyl acetate and methanol 1:1 (v/v) added to 1% formic acid by ultrasonic bath for 10 min. The extractor solvent-sample ratio was 0.5 g / 25 mL, and the extraction process was subsequently performed twice. After the extraction, the samples were filtered and concentrated by a rotatory evaporator.

##### **Accelerated solvent extraction (ASE) and isolation of virificatumtoxin A (VRA)**

The dried mycelial biomass (12 g) was extracted by accelerated solvent extraction (ASE) using an extractor Dionex<sup>TM</sup> ASE<sup>TM</sup> 150 (**Figure S1**, Supplementary Material). For the extraction at N<sub>2</sub> atmosphere, the following parameters were applied: (1) temperature of 50 °C, static cycle of 4 min, washing 60%, purging of 100 sec, and three cycles for the initial extraction with hexane and first extraction with ethyl acetate, and (2) temperature of 70 °C, static cycle of 4 min, washing 80%, purging of 40 sec, and three cycles. Then, the mycelia were subsequently extracted with hexane (fraction fr\_1-3), ethyl acetate (fractions fr\_4-9, fr\_10-18, and fr\_19-24), methanol (fractions fr\_25-27, fr\_28-30, and fr\_31-36), and ethanol/water 7:3 v/v (fractions fr\_37-39 and fr\_40-42)

(**Figure S2**). The weight of all fractions is described in **Table S1** (Supplementary Material). The fractions were concentrated by rotary evaporator and the ethanol/water fractions were also dried by freeze-dried.

The fraction fr<sub>31-36</sub>, with the isolated VRA, was solubilized in chloroform-d (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ 7.24) and analyzed by NMR on a Bruker DRX500 spectrometer (<sup>1</sup>H at 500 MHz and <sup>13</sup>C at 125 MHz). Chemical shifts ( $\delta$ ) were expressed in ppm value relative to TMS.

#### **Chemical analyses by liquid chromatography coupled to diode array detector (LC-DAD) and mass spectrometry (LC-DAD-MS)**

The LC-DAD analyses were acquired on a liquid chromatography SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a diode array detector (DAD). A chromatography column ACE 5 C18 (5  $\mu$ m, 100 °A, 250 x 4.6 mm) was used. The flow rate was 1 mL/min and the chromatography column was maintained at room temperature. The mobile phase was composed of acetonitrile (B) and ultrapure water (A) both adding 0.1% (v/v) formic acid. The gradient elution profile was the following: 0–20 min (30-65% of B), 20–32 min (65% of B, isocratic), 32–35 min (65–80% of B), 35–38 min (80-100 % of B), 38-39 min (100-30% of B), and 39-44 min (30% of B, isocratic). The fractions obtained by ASE extraction (20 mg) were diluted in ethyl acetate and extracted by liquid-liquid extraction with ultrapure water. Subsequently, the organic fractions were concentrated, dried, and analyzed by LC-DAD. These fractions were prepared at 2 mg/mL concentration, filtered on PTFE syringe filters (Millex 0.22 mm  $\times$  13 mm, Millipore<sup>®</sup>), and 20  $\mu$ L of each sample was injected into the chromatographic system.

The LC-DAD-MS analyses were acquired on UFLC-20AD Prominence Shimadzu coupled to a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer (MS) with

electrospray ionization source and analyzers quadrupole and time-of-flight (MicroTOF-Q III, Bruker Daltonics). A Kinetex<sup>®</sup> C18 chromatography column (2.6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 150 x 2.1 mm, Phenomenex) was used. The flow rate was 0.3 mL/min and the chromatography column were maintained at 50 °C. The mobile phase was composed of acetonitrile (B) and water (A) both adding 0.1% (v/v) formic acid. The gradient elution profile was the following: 0–2 min (3% of B), 2–25 min (3–25% of B), 25–40 min (25–80% of B), and 40–43 min (80% of B, isocratic). All the samples were analyzed in positive and negative ion modes. For the MS analyses, nitrogen was applied as nebulizer (4 Bar), drying (9 L/min), and collision gas. The capillary voltage was 2,500 kV. The samples were prepared at 1 mg/mL, filtered on PTFE filters (Millex 0.22 mm x 13 mm, Millipore<sup>®</sup>), and 2  $\mu\text{L}$  of each sample was injected into the chromatographic system. The identification of the compounds was performed based on spectral data of UV, MS (accurate mass), and MS/MS compared to data published in the literature and confirmed by injection of authentic standard for the metabolite VRA.

### **Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)**

The fraction fr\_1-3, obtained by ASE using hexane as extractor solvent, was analyzed on gas chromatography Shimadzu QP2010 coupled to a mass spectrometer (GC-MS) with electron ionization source applying 70 eV. The injection of the sample in the system was performed using an autoinjector COA-20i and the chromatographic column was a RTx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). Helium was applied as carrier gas with a pressure of 100 kPa. The injection was performed in split mode (split ratio 1:10) and the injection temperature was set to 250 °C. The temperature program was the following: 60°C for 3 min, 60 to 310 °C increasing 6 °C.min<sup>-1</sup>, and 310 °C for 13 min. A mixture of

C8-C40 alkanes (Sigma Aldrich) was also injected to determine the retention indices. Mass spectra were compared to data in the libraries NIST, WILEY, and FFNSC.

### **Molecular Networking**

A classical molecular networking workflow was created using the online workflow on the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>, accessed on 25 February 2023) (WANG et al., 2016). Initially, mass data obtained were converted to .mzXML format by MsConvert software (ADUSUMILLI; MALLICK, 2017). The converted files were uploaded to the GNPS platform, and blank compounds (relative to solvent analyses) were removed. The data were filtered by removing all MS/MS fragment ions within  $\pm 17$  Da of the precursor ion. MS/MS spectra were window filtered by choosing only the top six fragment ions in the  $\pm 50$  Da window throughout the spectrum. For the precursor, ion mass tolerance was set to 0.02 Da, and for the MS/MS fragment ion tolerance was set to 0.04 Da. A molecular network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and at least five matched peaks. The parameters for the library search were set to have a score above 0.7 and at least five matched peaks to assist in the metabolite annotation (WANG et al., 2016). The molecular network job on GNPS can be found at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4061cb74bfc04ffb9b0d0864f5b34964> (accessed on 26 February 2023, positive mode) and <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=3ad24b97213b4876b46ed0a00550b739> (accessed on 26 February 2023, negative mode).

## **Biological assays**

### **Parasites, bacteria, and cells culture conditions**

Promastigotes of *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) were maintained in M199 medium supplemented with 10% FBS at 28 °C. THP-1 cells (ATCC TIB-202) were maintained at 37 °C in a humidified incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. For differentiation into macrophages, THP-1 cells were cultured in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) at 100 nM for 48 hours.

Cultures of promastigotes in the stationary phase of growth were added to THP-1-derived macrophage cultures at a multiplicity of infection (MOI) of 25:1. After 24 hours, the non-internalized parasites were washed, and the infected cultures were incubated at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> to obtain the amastigotes.

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 stored in skim milk and 10% glycerol was grown overnight in Muller-Hinton Agar at 37 °C. A bacterial suspension (approximately 1.5×10<sup>8</sup> CFU/mL) was prepared in saline solution (0.9% NaCl) and used in the assays described below.

### **Antileishmania assays**

Macrophages derived from THP-1 cells (2.5×10<sup>4</sup> cells/well) infected with amastigotes were treated for 24 hours with 150 µg/mL of fraction fr\_4-9 or 50 µg/mL of VRA in technical quintuplicate for initial screening. They also evaluated at six different concentrations to obtain the IC<sub>50</sub>. All experiments were performed by automatic counting in the Operetta CLS High Content Analysis System equipment.

For analysis in Operetta, the cells after treatment were washed with PBS 1x, fixed with cold 100% methanol and, after washing with ultrapure water, they were stained with Hoechst 33342 according to adapted methodology by BORGES et al., (2023), CEOLE et al., (2018), and TIRADO et al., (2020). IC<sub>50</sub> calculation was performed from the infectivity indices described in CEOLE et al., (2018).

### **Cytotoxicity assay**

Cytotoxicity assays were performed with macrophages derived from THP-1 cells (ATCC TIB-202) seeded in 96-well plates ( $2 \times 10^4$  cells/well) in RPMI medium supplemented with 10% FBS and maintained at 37 °C, in a CO<sub>2</sub> atmosphere. After 48 hours the cells were incubated with different concentrations of active compounds for 24 hours. The evaluation of cytotoxic activity was performed by colorimetric assay with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (BORGES et al., 2023; CEOLE et al., 2018). The calculation of the CC<sub>50</sub> value was performed from the percentage of average inhibition, in relation to the untreated control, obtained through technical quadruplicate according to CEOLE et al., (2018). And the CC<sub>50</sub> values found were used to calculate the selectivity index.

### **Antibacterial and antibiofilm evaluation**

The evaluation of the antibiofilm (minimum biofilm inhibitory concentration - MBIC) and antibacterial (minimum inhibitory concentration - MIC) activities were determined according to TRENTIN et al. (2011) with some modifications. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as biofilm/bacterial growth control, and gentamicin (20 µg/mL) was used as an inhibition control. VRA was dissolved in a stock solution with

DMSO and evaluated in a final concentration ranging from 128 to 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the wells. For the experiment, a 96-well microtiter plate was used and in each well were pipetted: 4  $\mu\text{L}$  of VRA or control (DMSO or gentamicin), 76  $\mu\text{L}$  of sterile water, 40  $\mu\text{L}$  of Brain Heart Infusion (BHI) and 80  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension. The plates were incubated for 24 hours at 37 °C. MIC was defined as the lowest concentration of the compound with no visible bacterial growth in the well.

For biofilm evaluation, the planktonic cells were removed, and the wells were rinsed three times with saline solution, then the plate was incubated at 60 °C for 1 h to fix the formed biofilm, later the biomass was stained with crystal violet (0.4% for 15 min at room temperature). Finally, the plate was rinsed with water, the biofilm was resuspended with ethanol for 30 min, and the absorbance (570 nm) was measured.

### **Evaluation cellular viability**

Leukemia lineages KG-1 and Kasumi-1 were cultivated in RPMI medium at 105 cells. $\text{mL}^{-1}$ . The media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U. $\text{mL}^{-1}$  penicillin and 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  of streptomycin (Gibco, Brazil) at 37 °C in an atmosphere containing 5.0 %  $\text{CO}_2$ . Cells were washed with PBS and incubated with a VRA and fraction fr 4-9, prepared in the respective media, from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After 24 h, 100  $\mu\text{L}$  of MTT solution (0.5 mg. $\text{mL}^{-1}$  diluted in culture medium) was added. Following 4 h of incubation, the formazan crystals were resuspended with 100  $\mu\text{L}$  of dimethylsulfoxide (DMSO) and read at 630 nm. At least three independent experiments were performed in triplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

The fungal mycelia of *Penicillium* sp. 5MP2F4 was dried by lyophilization and extracted by conventional ultrasound-assisted extraction (UAE, extractor solvent: ethyl acetate with formic acid 0.1% v/v) and accelerated solvent extraction (ASE, increasing the polarity of extractor solvent - hexane to ethanol/water) (**Figure S2-3, Table S1**). The ASE method presented higher extraction efficiency than UAE (**Figure S3**), demonstrating a better exhaustive extraction by ASE and an increment of 27.1% in yield. In the ASE methods, the extractor solvents were heated (e.g. 50-70 °C), pressurized, and an inert atmosphere of nitrogen was applied that avoids chemical degradations of constituents and assists the extraction of heat-labile compounds. The mass transfer in ASE is especially high with the improvement of extraction kinetics and it also reduces the solvent consumption and extraction time. In addition, the extraction by ASE has shown high reproducibility in the extractions (CAI et al., 2016; MOTTALEB; SARKER, 2012).

The extraction process by ASE from *Penicillium* sp. 5MP2F4 was initiated with hexane at room temperature, to remove lipophilic compounds. This fraction was analyzed by GC-MS analysis and ergosterol was observed as the main compound (**Figure S4**). Ergosterol is commonly present on the fungal cell wall and responsible for membrane permeability and fluidity, among other functions (YANG et al., 2015). We believe that after the removal of ergosterol at the beginning of the extraction process, the release of the other metabolites can be favored, and so the fractions and extracts obtained were cleaner which can eliminate the subsequent cleanup steps, facilitating the isolation procedures. The additional consecutive rounds of extraction with increased polarity of extractor solvent (ethyl acetate, methanol, and ethanol/water 7:3, **Figure S5**) induced the

recovery of the metabolites and the obtention of enriched fraction and/or purification of compounds, such as VRA (**3**), as illustrated in the chromatograms of **Figure 1**.

The molecular networking was created from LC-MS/MS data of the fraction fr\_4-9 obtained by ASE and its constituents were annotated based on MS<sup>2</sup> data available in the GNPS spectral libraries. These compounds include 17-*O*-demethylaustalide (**1**) (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>), verruculogen (**2**) (C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), and VRA (**3**) (C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>10</sub>) (**Table I**).

The ASE was optimized for the obtention of fractions and isolation of a rare tetracycline, VRA, with a high yield. Thus, we demonstrated the high efficiency of this technique to extract the constituents from a mycelial fungus matrix and, when optimized, it can be easily applied to isolate them, in special for the main compounds. For the obtention of fungal metabolites, hundreds of bottles for cultivation and growth microbial have been applied in the literature, and this approach is considered a large-scale procedure by several authors (Hu et al. 2021). However, an optimized extraction procedure can also be useful to improve the yields of extractions and the subsequent steps of isolation, such as described for the isolation of a diterpene from *Aspergillus nidulans* (BROMANN et al., 2014).

VRA was confirmed by comparison to spectral data published, which exhibited a typical fragmentation pattern for tetracyclines (ZHENG et al., 2008), furthermore, it was annotated according to the GNPS library. The isolated substance VRA was analyzed by LC-DAD-MS and NMR. The NMR spectra (500 MHz, **Figures S6** and **S7**) and spectral data are summarized in **Table S2** (Supporting Information), including the data obtained from <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments. The broad singlets were observed at the downfield shift  $\delta$  17.90 (3-OH), 14.76 (11-OH), and 8.66 (10-OH), which revealed correlations to 165.8 (C-11), 157.8 (C-10), 105.4 (C10a) in the HMBC, and they are compatible to the chemical shifts of hydroxyl groups with hydrogen bond, such as the

signal at  $\delta$  14.76 (3-OH) explained by the interaction (chelation) with the carbonyl group at C-12, similarly to the observed for the flavonoids (SILVA et al., 2013). The signals at  $\delta$  99.05 (br s) and 6.01 (br s) correlated to the carbons at  $\delta$  99.4 (C-2) and 172.6 (C-13) in the HMBC, this last signal is consistent with amide carbonyl. An olefinic hydrogen was observed at 5.48 ppm (br s), linked to carbon 121.3 (C-17), that confirmed the double bond in C17. Three methyl groups were observed at 0.89 (s), 0.44 (s), and 1.50 (s), which are consistent with two aliphatic (C-22 and C-23) and an olefinic methyl groups (C-16). All the NMR data were compatible with the spectral data reported for viridicatumtoxin A (ZHENG et al., 2008).

The tetracyclines viridicatumtoxins are an unusual class of metabolites. They have been described with potent antibiotic and cytotoxic properties, which are aimed for the development of new drugs (CAPON et al., 2005; LI et al., 2014; ZHENG et al., 2008). The isolation methodologies described for viridicatumtoxins are costly in relation to requirements of several steps, time, and organic solvent consumption, and these procedures have shown low yields (SHANG et al. 2015). Thus, here we demonstrated that an alternative procedure by ASE is possible to isolate VRA with a fast and reproducible procedure. The isolated VRA was applied to determine its antileishmanial, antibacterial, antibiofilm, and cytotoxic potentials.

VRA showed antibacterial effects against planktonic cells of *S. aureus* (**Figure 2**) with MIC 8  $\mu$ g/mL, revealing as a classical antibiotic. Our results are consistent with the reported by ZHENG et al. (2008), which demonstrated that VRA is effective against several gram-positive bacteria, such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus epidermidis*, and some gram-negative bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* and *Salmonella typhimurium*).

The fraction fr\_4-9 and VRA were also evaluated against *L. infantum* amastigote and cytotoxic activity on THP-1 cell lines to determine the selective index (SI) (**Table II**). The fraction fr\_4-9 (**Figure 1, Figure S5**) revealed an IC<sub>50</sub> of 18.97 µg/mL, and its composition exhibited the compounds 17-*O*-demethylaustalide (**1**), verruculogen (**2**), and VRA (**3**). The tetracycline VRA showed potent activity with IC<sub>50</sub> of 0.017 µM, which is reported here for the first time against this parasite and inspires continuous studies also like as an antileishmanial drug candidate. Both fraction and VRA also showed low cytotoxicity with a selective index SI>2.

The neglected diseases, such as Visceral Leishmaniasis (VL), represent a serious public health problem that disproportionately impacts the poorest populations. They are caused by several species of the genus *Leishmania*, such as *L. infantum* which is the most relevant etiological agent of this disease, presenting a high mortality rate of more than 90% when left untreated. Treatment, however, is extremely limited. The drug of first choice, pentavalent antimonials, are toxic and require long parenteral treatment periods. Other drugs used are amphotericin B and miltefosine, both of which are expensive. Amphotericin B has many side effects, while miltefosine, the only drug administered orally, has a teratogenic effect, with frequent reports of parasite resistance (BRASIL, 2014; MURACA et al., 2020; WHO, 2010).

Considering the social and economic importance of the leishmaniasis, the emergence of resistant strains that lead to therapeutic failures, and the important limitations of the available drugs, the urgency of the search for new molecules or drug combinations that can offer safe, effective, and affordable treatment options for millions of people in vulnerable situations who are affected by the leishmaniasis is explicit (BORGES et al., 2023; GONÇALVES et al., 2021).

Recently, a systematic review was published with compiled data about the efficacy of fungal metabolites against *Leishmania* agents, which is possible to observe that fungal metabolites are a valuable source to discover new antileishmanial compounds, but they are an underexplored source yet for this activity. Among the most studied fungal genera listed in this review are *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., and *Fusarium* sp., which are together responsible for 30.6% of the works and revealed promising antileishmanial metabolites (DOS SANTO VARJÃO et al., 2022).

In addition, VRA and fraction fr\_4-9 were also evaluated against leukemia cell lines Kasumi-1 and KG-1 at 100 µg/mL, which exhibited inhibition of viability cells up to 90% (**Figure 3**). VRA has shown cytotoxic activity on different human cancer cell lines, such as colon SW620, carcinoma KB3-1, non-small cell lung NCI-H460, breast MDA-MB-231, ovarian OVCAR3, and melanoma MDA-MB-435 with IC<sub>50</sub> of 1 to 11.1 µM (SHANG et al., 2015, OYEKUNLE, 2018).

In conclusion, we demonstrated here the potential of ASE to increase the efficiency and yields for extraction from fungal mycelium of *Penicillium* sp, besides it was a useful technique to obtain cleaner extracts without contaminants or non-interesting compounds. We obtained enriched fractions and the isolation of VRA by ASE was achievable to obtain higher amount of VRA from *Penicillium* sp that encourage further studies for the discovery of natural products with novel scaffolds from fungi. Finally, we determined for VRA, a rare tetracycline with an interesting scaffold for the development of the new drugs, some unknown biological properties, including its potent cytotoxic activity against leukemia cell lines and *L. infantum*, as well as its antibacterial property.

## Supplemental material

**Figure S1.** Photo of Mycelial biomass; (A) before extraction and (B) after the extraction by ASE.

**Figure S2.** Fractions obtained by Accelerate Solvent Extraction (ASE) from fungal mycelial biomass. Fractions: (A) 1 to 3, (B) 4 to 6, (C) 7 to 9, (D) 10 to 12, (E) 13 to 15, (F) 16 to 18, (G) 19 to 21, (H) 22 to 24, (I) 25 to 27, (J) 28 to 30, (K) 31 to 33, (L) 34 to 36, (M) 37 to 39. The fractions were combined according to description on Table S1.

**Figure S3.** Yields (g) of extracts obtained from 12 g of dried fungal mycelia by ultrasound-assisted extraction (USE) and accelerated solvent extraction (ASE) and its fractions by ASE.

**Figure S4.** Total ion chromatogram obtained by GC-MS analysis from the fraction fr\_1-3.

**Figure S5.** Chromatograms at 220 nm from fractions obtained by ASE (A). Peaks (1) 17-*O*-demethylaustalide, (2) verruculogen, and (3) viridicatumtoxin A.

**Figure S6.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of viridicatumtoxin A (3).

**Figure S7.** <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of viridicatumtoxin A (3).

**Table S1.** Fractions obtained from mycelial biomass and extrated by Accelerate Solvent Extraction (ASE).

**Table S2.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for viridicatumtoxin A (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and the correlations observed in the COSY and HMBC spectra.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 313047/2020-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, process number 71/032.390/2022), and Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) for financial support.

### Author contributions

FMRS, CMC, JMA, LHM, HFT, LCSM, FRB, FMSJ, EJPG, AJM, GMP and DBS were responsible for conceptualization, methodology, validation and writing the original draft; FMRS and CMC were responsible for production of extracts and chemical characterization; JMA and LCSM was responsible for anti-*Leishmania* and cytotoxicity assays; HFT and EJPG were responsible for evaluation cellular viability; FMRS was responsible for writing the original draft, editing, and review; DBS was responsible for investigation, conceptualization, project administration & management, and writing the original draft.

### REFERENCES

- ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–16, 1 fev. 2021.
- ADUSUMILLI, R.; MALLICK, P. Data conversion with proteoWizard msConvert. **Methods in Molecular Biology**, v. 1550, p. 339–368, 2017.
- ALAM, B. et al. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 3060, 17 dez. 2021.
- BENDELE, A. M. et al. Viridicatumtoxin mycotoxicosis in mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 22, n. 3, p. 287–291, 1 set. 1984.
- BLADT, T. T. et al. Bio-Activity and Dereplication-Based Discovery of Ophiobolins and Other Fungal Secondary Metabolites Targeting Leukemia Cells. **Molecules** **2013**, Vol. **18**, Pages **14629-14650**, v. 18, n. 12, p. 14629–14650, 26 nov. 2013.
- BORGES, B. S. et al. In vitro anti-*Leishmania* activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1948, 9 jan. 2023.
- BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Brasília-DF 2014 MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica 1ª edição 5ª reimpressão. 2014.
- BROMANN, K. et al. Isolation and purification of ent-pimara-8(14),15-diene from engineered *Aspergillus nidulans* by accelerated solvent extraction combined with HPLC. **Analytical Methods**, v. 6, n. 4, p. 1227–1234, 30 jan. 2014.

- CAI, Z. et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. **Food Chemistry**, v. 197, p. 266–272, 15 abr. 2016.
- CAPON, R. J. et al. Aspergillazines A–E: novel heterocyclic dipeptides from an Australian strain of *Aspergillus unilateralis*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 123–129, 14 dez. 2005.
- CARO, Y. et al. Pigments and Colorants from Filamentous Fungi. **Fungal Metabolites**, p. 1–70, 2015.
- CEOLE, L. F. et al. Synthesis of novel quinine analogs and evaluation of their effects on *Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0184>, v. 10, n. 4, p. 391–408, 30 jan. 2018.
- DE JESUS, A. E. et al. Biosynthesis of viridicatumtoxin, a mycotoxin from *Penicillium expansum*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 902–904, 1 jan. 1982.
- DESHMUKH, S. K. et al. Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. **Journal of Fungi 2022, Vol. 8, Page 164**, v. 8, n. 2, p. 164, 8 fev. 2022.
- DOS SANTOS VARJÃO MT, DUARTE AWF, ROSA LH, ALEXANDRE-MOREIRA MS & DE QUEIROZ AC. 2022. Leishmanicidal activity of fungal bioproducts: A systematic review. *Fungal Biol Rev* 40: 91–113.
- FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 15 maio 2020.
- GONÇALVES, G. et al. Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 1 dez. 2021.
- GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology advances**, v. 39, 1 mar. 2020.
- HU, Z.; YE, Y.; ZHANG, Y. Large-scale culture as a complementary and practical method for discovering natural products with novel skeletons. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 10, p. 1775–1793, 20 out. 2021.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical analysis : PCA**, v. 13, n. 2, p. 105–113, 2002.
- KJER, J. et al. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature protocols**, v. 5, n. 3, p. 479–490, mar. 2010.
- KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 507–522, 20 dez. 2012.
- LACERDA, Í. C. DOS S.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Endophytic Fungi as a Source of Antiviral Compounds – A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. e202100971, 1 jun. 2022.
- LEBEAU, J. et al. Production and New Extraction Method of Polyketide Red Pigments Produced by Ascomycetous Fungi from Terrestrial and Marine Habitats. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, 1 set. 2017.

- LI, G. et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *eupenicillium* sp. LG41. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2335–2341, 30 out. 2014.
- MOTTA RIBEIRO DA SILVA, F. et al. Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. **Metabolites 2023, Vol. 13, Page 236**, v. 13, n. 2, p. 236, 5 fev. 2023.
- MOTTALEB, M. A.; SARKER, S. D. Accelerated solvent extraction for natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 75–87, 2012.
- MURACA, G. et al. Trypanosomatid-Caused Conditions: State of the Art of Therapeutics and Potential Applications of Lipid-Based Nanocarriers. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1077, 26 nov. 2020.
- NEWMAN, D. J. Old and modern antibiotic structures with potential for today's infections. **ADMET & DMPK**, v. 10, n. 2, p. 131, 2022.
- OYEKUNLE, OLALEKAN SAHEED, M.S. **Growth Media Studies Approach to Enhance Production of the Bioactive Fungal Metabolite Viridicatumtoxin A**. Degree Master of Science. Faculty of The Graduate School at The University of North Carolina at Greensboro. Greensboro 2018. Available in: <https://libres.uncg.edu/ir/uncg/listing.aspx?id=23466>, access February 28, 2023.
- SILVA, D. B. et al. Flavanone glycosides from *Bidens gardneri* Bak. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 96, p. 418–422, 2013.
- SHANG, Z. et al. Viridicatumtoxins: Expanding on a Rare Tetracycline Antibiotic Scaffold. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 12501–12508, 25 nov. 2015.
- TIRADO, T. C. et al. Use of the high-content imaging system equipment to evaluate in vitro infection by *Leishmania braziliensis* in response to sand fly *Nyssomyia neivai* saliva. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105540, 1 set. 2020.
- TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 1 set. 2011.
- VIGNESHWARI, A. et al. Host metabolite producing endophytic fungi isolated from *Hypericum perforatum*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217060, 1 maio 2019.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology 2016 34:8**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.
- WHO. **Expert Committee on the Control of the Leishmaniases & World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization.** <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- YANG, H. et al. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. **Nature Communications 2015 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 6 fev. 2015.
- ZHENG, C. J. et al. Viridicatumtoxin B, a new anti-MRSA agent from *Penicillium* sp. FR11. **The Journal of Antibiotics 2008 61:10**, v. 61, n. 10, p. 633–637, out. 2008.

**Tables and figures legends**

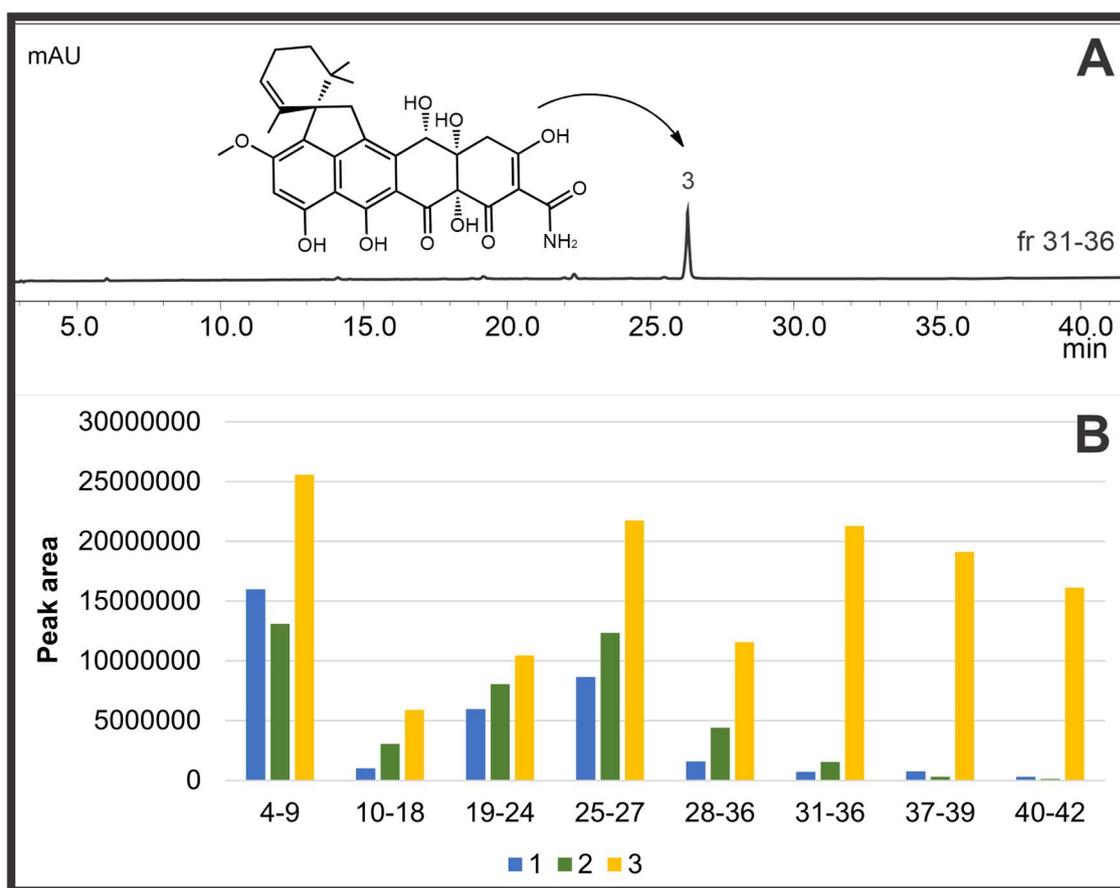
**Figure 1.** Chromatogram at 220 nm from fraction fr 31-36 obtained by ASE (A) and the peak area of the compounds 17-*O*-demethylaustalide (1), verruculogen (2), and viridicatumtoxin A (3) from these fractions (B).

**Figure 2:** Minimum inhibitory concentration (MIC) of *S. aureus* treated with different concentrations of viridicatumtoxin A (0.25-128 µg /mL). CC = growth control (DMSO); CA = activity control (gentamicin 20 µg/mL).

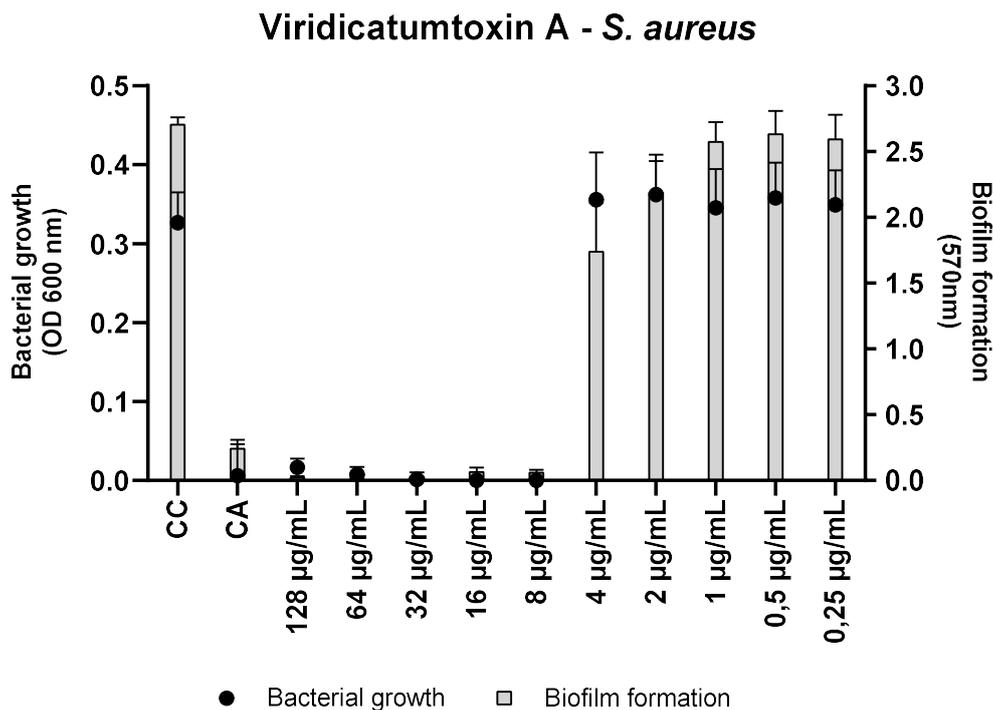
**Figure 3:** Cell proliferation and cytotoxic screening of viridicatumtoxin A (VRA) and fraction fr 4-9. (A) Kasumi-1; (B) KG-1 lineages were stimulated with different VRA and fr 4-9 at 100 µg/mL for 24h.

**Table I.** Annotation of compounds from *Penicillium* sp. by LC-DAD-MS

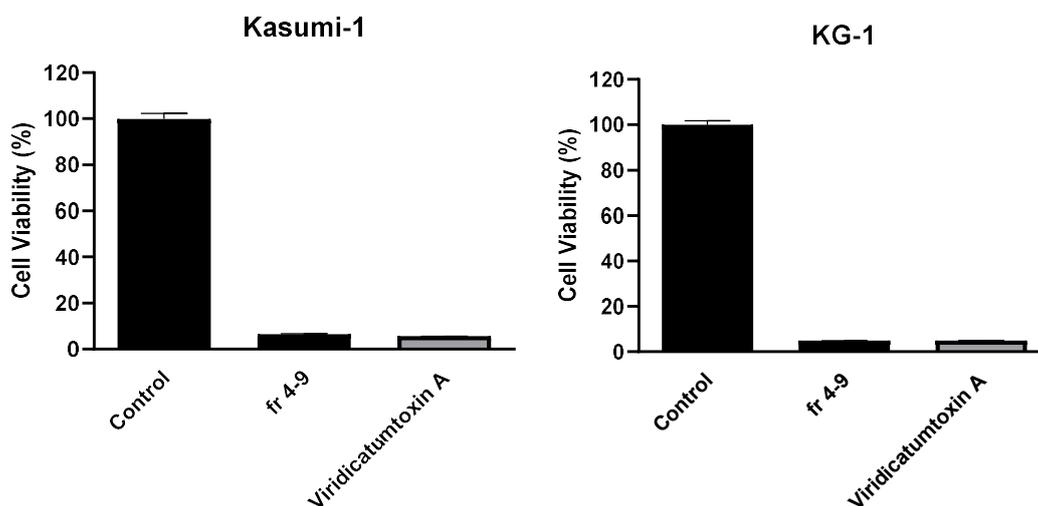
**Table II.** Effect of viridicatumtoxin A and fr 4-9 on amastigote (*L. infantum*) and THP-1 cells, with determination of IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> (SI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>).



**Figure 1.** Chromatogram at 220 nm from fraction fr 31-36 obtained by ASE (A) and the peak area of the compounds 17-*O*-demethylaustalide (1), verrucologen (2), and viridicatumtoxin A (3) from these fractions (B).



**Figure 2:** Minimum inhibitory concentration (MIC) of *S. aureus* treated with different concentrations of viridicatumtoxin A (0.25-128 µg/mL). CC = growth control (DMSO); CA = activity control (gentamicin 20 µg/mL).



**Figure 3:** Cell proliferation and cytotoxic screening of viridicatumtoxin A (VRA) and fraction fr 4-9. (A) Kasumi-1; (B) KG-1 lineages were stimulated with different VRA and fr 4-9 at 100 µg/mL for 24h.

**Table I.** Annotation of compounds from *Penicillium* sp. by LC-DAD-MS

peak	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	Positive (m/z)		Negative (m/z)	
					[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS
1	13.99	17- <i>O</i> -demethylaustalide	269	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	461.2178	417, 207, 177	459.1997	401, 383, 370, 360, 323, 315, 305, 231, 206, 191
2	22.29	Verruculogen	275, 294	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	494.2292*	352, 310, 267, 255, 240, 227, 213, 199, 184	510.2242	255, 210, 195
3	26.30	Viridicatumtoxin A (VRA)	284, 433	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	548.1921*	531, 513, 449, 433, 421, 393, 363, 335, 307	564.1899	502, 485, 461, 441, 419, 405, 385

MF: molecular formula; RT: retention time. \*[M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**Table II.** IC<sub>50</sub> ± SD (μg/mL and/or μM) values on amastigote and cytotoxic activity in THP-1 cell lines of viridicatumtoxin A (VRA) and fraction fr 4-9

Extract / compound	amastigote ( <i>L. infantum</i> ) IC <sub>50</sub> (24h) μg/mL	THP-1 Cells CC <sub>50</sub> (24h)	SI
ViridicatumtoxinA (VRA)	8.87 (0.017 μM)	26.72	2.74
Fraction fr_4-9	18.97	63.87	3.37

SI: selective index (ratio of IC<sub>50</sub> values of extract/fraction/compound against THP-1 cells relative to against *L. infantum* amastigotes)

## **Supplementary material**

### ***Viridicatumtoxim A, a rare and bioactive tetracycline, is efficiently obtained from Penicillium sp by Accelerated extraction solvent (ASE)***

Fernanda Motta Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Caroline de Moura Costa<sup>1</sup>, Júlio Menta de Almeida<sup>1</sup>,  
Lucas Haidar Martorano<sup>4</sup>, Heron Fernandes Torquato<sup>2</sup>, Lia Carolina Soares Medeiros<sup>5</sup>,  
Flávia Roberta Brust<sup>6</sup>, Fernando Martins dos Santos Junior<sup>4</sup>, Edgar Julian Paredes-  
Gamero<sup>2</sup>, Alexandre José Macedo<sup>6</sup>, Gecele Matos Paggi<sup>3</sup>, Denise Brentan Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil;

<sup>3</sup>Laboratório de Ecologia e Biologia Evolutiva (LEBio), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil;

<sup>5</sup>Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Curitiba, Brazil;

<sup>6</sup>Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Professional address and ORCID of all authors:**

Fernanda Motta Ribeiro da Silva<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, <https://orcid.org/0000-0002-9244-333X>

Caroline de Moura Costa<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, <https://orcid.org/0000-0003-0821-6335>

Júlio Menta de Almeida<sup>1</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-0626-5109>

Lucas Haidar Martorano<sup>4</sup>. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil.

Heron Fernandes Torquato<sup>2</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil.

Lia Carolina Soares Medeiros<sup>5</sup>, Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ. Rua Professor Algacyr Munhoz Mader - 3775, Bloco C. Cidade Industrial, 81350010 - Curitiba, PR - Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-9390-9157>

Flávia Roberta Brust<sup>6</sup>. Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves, 4500, nº43431 - Campus do Vale - CEP 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-2365-6403>

Fernando Martins dos Santos Junior<sup>4</sup>. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

Edgar Julian Paredes-Gamero<sup>2</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-3686-8402>

Alexandre José Macedo<sup>6</sup>. Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves, 4500, nº43431 - Campus do Vale - CEP 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-8951-4029>

Gecele Matos Paggi<sup>3</sup>. Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. <https://orcid.org/0000-0003-2572-8471>

Denise Brentan Silva<sup>1\*</sup>. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil, +55 67 3345-7366. <https://orcid.org/0000-0003-0872-2756>

## Summary

**Figure S1.** Photo of Mycelial biomass; (A) before extraction and (B) after the extraction by ASE.

**Figure S2.** Fractions obtained by Accelerate Solvent Extraction (ASE) from fungal mycelial biomass. Fractions: (A) 1 to 3, (B) 4 to 6, (C) 7 to 9, (D) 10 to 12, (E) 13 to 15, (F) 16 to 18, (G) 19 to 21, (H) 22 to 24, (I) 25 to 27, (J) 28 to 30, (K) 31 to 33, (L) 34 to 36, (M) 37 to 39. The fractions were combined according to description on Table S1.

**Figure S3.** Yields (g) of extracts obtained from 12 g of dried fungal mycelia by ultrasound-assisted extraction (USE) and accelerated solvent extraction (ASE) and its fractions by ASE.

**Figure S4.** Total ion chromatogram obtained by GC-MS analysis from the fraction fr\_1-3.

**Figure S5.** Chromatograms at 220 nm from fractions obtained by ASE (A). Peaks (1) 17-*O*-demethylaustalide, (2) verruculogen, and (3)viridicatumtoxin A.

**Figure S6.**  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of viridicatumtoxin A (3).

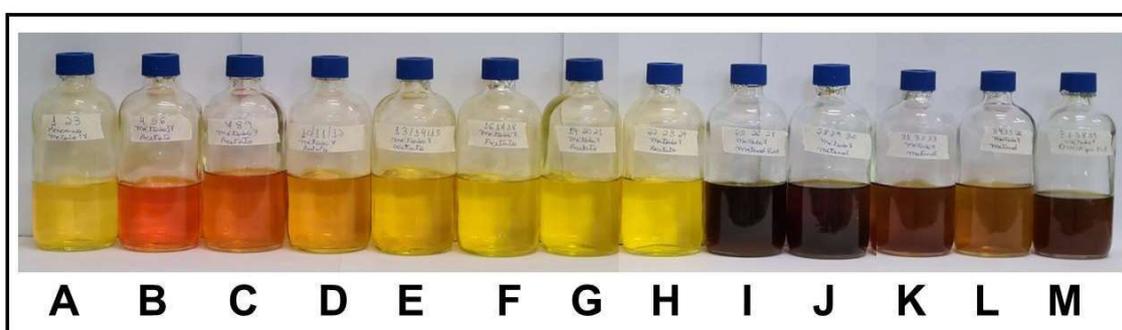
**Figure S7.**  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectrum of viridicatumtoxin A (3).

**Table S1.** Fractions obtained from mycelial biomass and extrated by Accelerate Solvent Extraction (ASE).

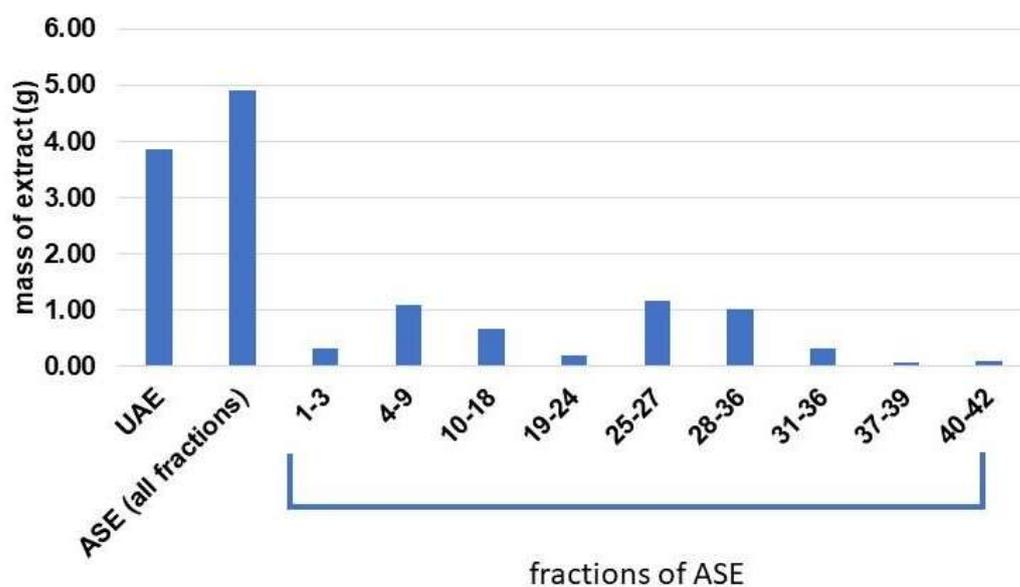
**Table S2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for viridicatumtoxin A (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and the correlations observed in the COSY and HMBC spectra.



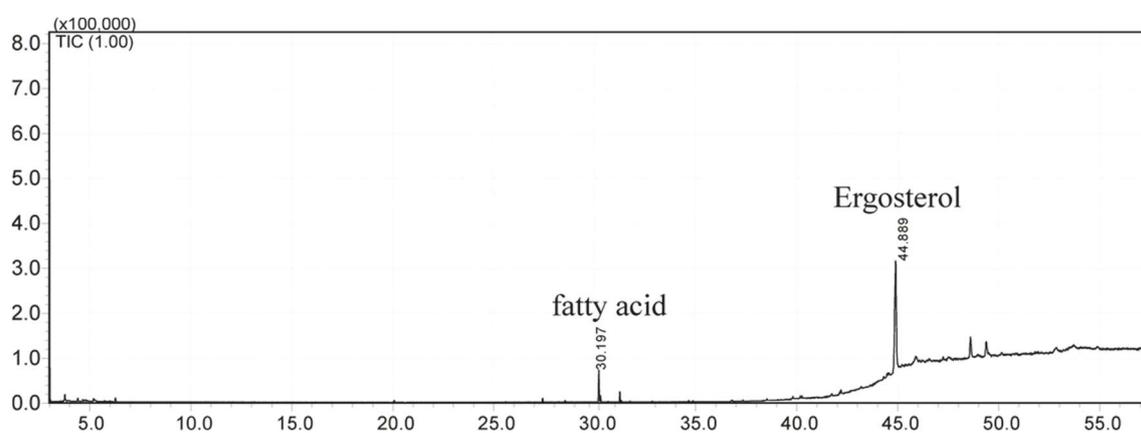
**Figure S1.** Photo of Mycelial biomass; (A) before extraction and (B) after the extraction by ASE.



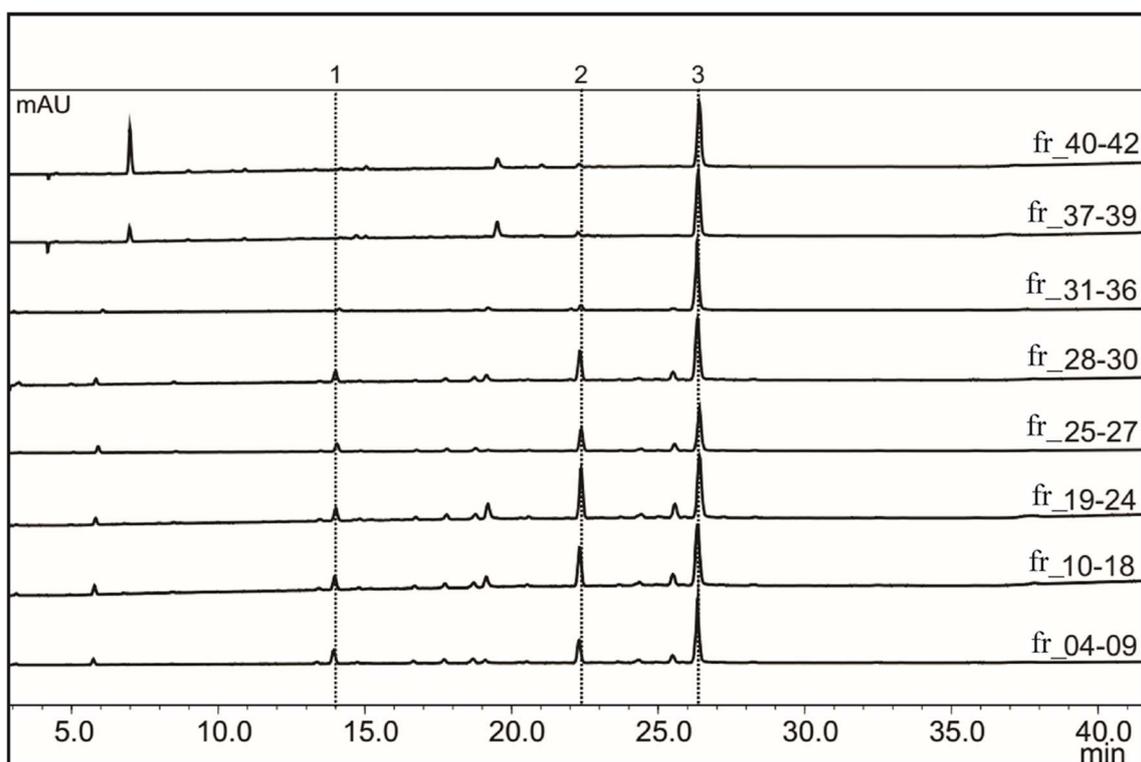
**Figure S2.** Fractions obtained by Accelerate Solvent Extraction (ASE) from fungal mycelial biomass. Fractions: (A) 1 to 3, (B) 4 to 6, (C) 7 to 9, (D) 10 to 12, (E) 13 to 15, (F) 16 to 18, (G) 19 to 21, (H) 22 to 24, (I) 25 to 27, (J) 28 to 30, (K) 31 to 33, (L) 34 to 36, (M) 37 to 39. The fractions were combined according to description on Table S1.



**Figure S3.** Yields (g) of extracts obtained from 12 g of dried fungal mycelia by ultrasound-assisted extraction (USE) and accelerated solvent extraction (ASE) and its fractions by ASE.



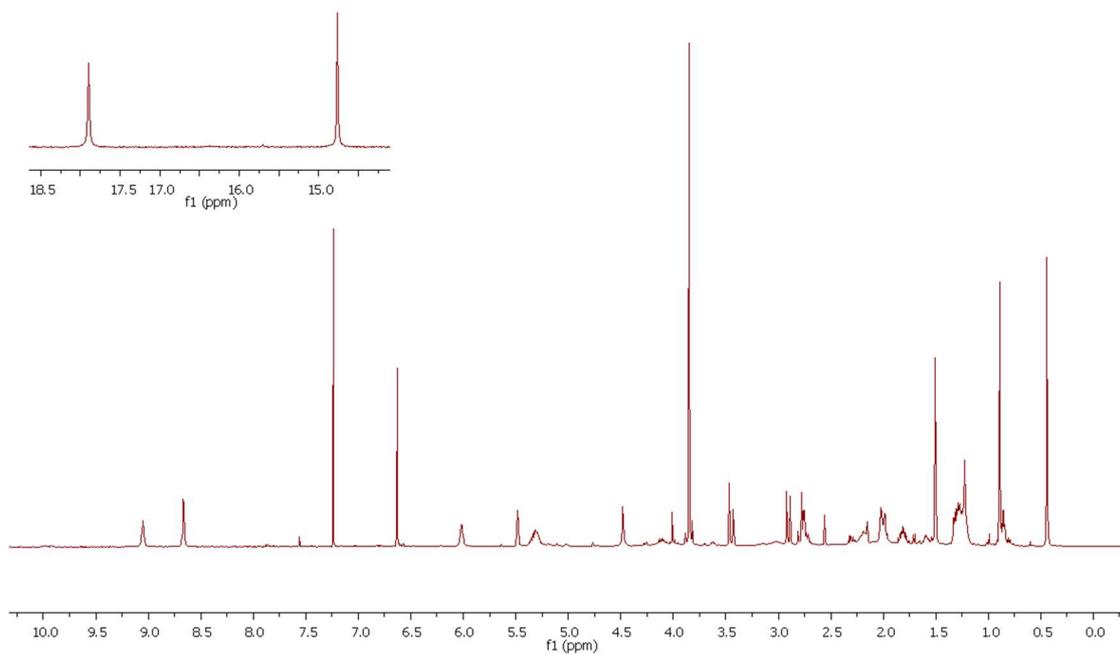
**Figure S4.** Total ion chromatogram obtained by GC-MS analysis from the fraction fr 1-3.



**Figure S5.** Chromatograms at 220 nm from fractions obtained by ASE (A). Peaks (1) 17-*O*-demethylaustalide, (2) verruculogen, and (3) viridicatumtoxin A.

FM2610

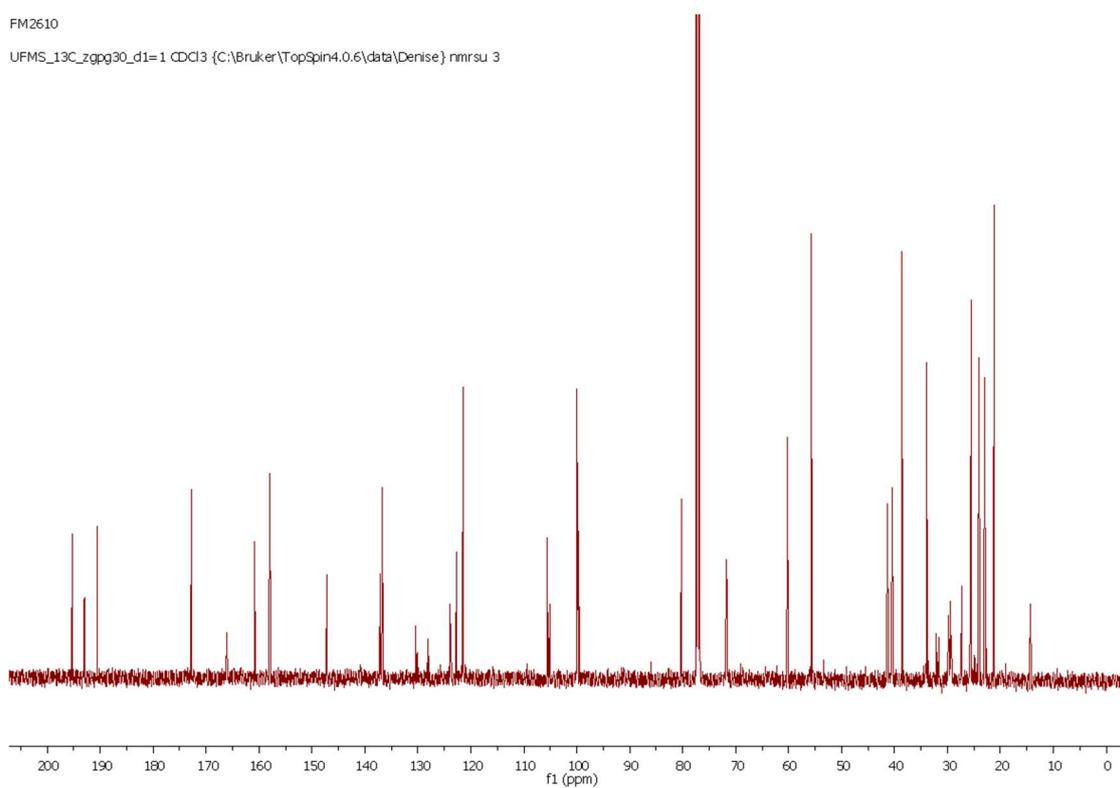
UFMS\_1H\_zg30 CDCl3 {C:\Bruker\TopSpin4.0.6\data\Denise} nmrsu 3



**Figure S6.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of viridicatumtoxin A (**3**)

FM2610

UFMS\_13C\_zgpg30\_d1=1 CDCl3 {C:\Bruker\TopSpin4.0.6\data\Denise} nmrsu 3



**Figure S7.** <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of viridicatumtoxin A (**3**).

**Table S1.** Fractions obtained from mycelial biomass and extracted by Accelerate Solvent Extraction (ASE)

<b>Extrator solvent</b>	<b>Fraction</b>	<b>Extraction mass (g)</b>	<b>Extraction Yield (%)</b>	<b>Method<sup>a</sup></b>
Hexane	fr_1-3	0.303	2.52	1
Ethyl acetate	fr_4-9	1.091	9.09	2
Ethyl acetate	fr_10-18	0.676	5.63	2
Ethyl acetate	fr_19-24	0.182	1.52	2
Methanol	fr_25-27	1.170	9.75	2
Methanol	fr_28-30	1.009	8.41	2
Methanol	fr_31-36	0.322	2.68	2
Ethanol:Water 7:3	fr_37-39	0.074	0.62	2
Ethanol:Water 7:3	fr_40-42	0.095	0.79	2

<sup>a</sup>Methods: (1) temperature of 50 °C, static cycle of 4 min, washing 60%, purging of 100 seconds, and three cycles. Used for hexane and first cycle with ethyl acetate; (2) temperature of 70 °C, static cycle of 4 min, washing 80%, purging of 40 seconds, and three cycles.

**Table S2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for viridicatumtoxin A (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and the correlations observed in the COSY and HMBC spectra.

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	-	190.4	-	-
2	-	99.4	-	-
3	-	192.8	-	-
4	$\alpha$ 2.79, d (19.0) $\beta$ 2.74, d (19.0)	40.3	H-4	C-2, C-3, C-4a, C-12a
4a	-	71.4	-	-
5	4.48, br s	71.5	5-OH	C-1, C-4a, C-4, C-5a, C-6, C-11a, C-12a
5a	-	137.0	-	-
6	-	123.7	-	-
6a	-	147.1	-	-
7	-	122.6	-	-
8	-	160.6	-	-
9	6.63, s	99.8	-	C-7, C-8, C-10, C-10a, C-11, C-15
10	-	157.8	-	-
10a	-	105.4	-	-
11	-	165.8	-	-
11a	-	104.9	-	-
12	-	195.2	-	-
12a	-	80.1	-	-
13	-	172.6	-	-
14	2.90, d (17.5) 3.45, d (17.5)	41.1	H-14	C-5, C-5a, C-6, C-6a, C-7, C-11, C-11a, C-15, C-16, C-20
15	-	60.0	-	-
16	-	136.5	-	-
17	5.48, br s	121.3	H-18, H-21	C-15, C-18, C-19, C-21
18	$\alpha$ 2.02, m $\beta$ 2.19, m	22.8	H-17, H-18, H-19	C-16, C-17, C-19, C-20
19	$\alpha$ 1.81, m $\beta$ 1.30, m	33.8	H-18, H-19	C-15, C-17, C-18, C-20, C-22, C-23
20	-	38.5	-	-
21	1.50, s	21.0	H-17	C-15, C-16, C17
22	0.90, s	23.8	-	C-19, C-20, C-23
23	0.44, s	25.4	-	C-15, C-19, C-20, C-22
8-OCH <sub>3</sub>	3.86, s	55.5	-	C-8
3-OH	17.90, br s	-	-	-
4a-OH	4.05, br s	-	-	-
5-OH	3.05, br s	-	-	-
10-OH	8.66, br s	-	-	C-8, C-9, C-10, C-10a
11-OH	14.76, br s	-	-	C-10a, C-11
12a-OH	5.33, br s	-	-	-
13-NH <sub>2</sub>	9.07, br s 6.01, br s	-	-	C-2, C-13

## *Capítulo 6*

## 7. Capítulo 6 - Conclusões

Esse trabalho investigou o potencial dos fungos endofíticos isolados de *B. balansae*, que ocorrem em afloramentos rochosos do Pantanal-MS, para a produção de produtos naturais bioativos.

Foram estabelecidas 61 culturas de endófitos e seus extratos orgânicos foram avaliados em ensaios antimicrobianos e antibiofilme frente às cepas de *S. aureus*, *K. oxytoca* e *P. aeruginosa*. Diversos isolados apresentaram alto potencial antibacteriano especialmente contra *S. aureus*, sendo que 12 extratos de diferentes isolados apresentaram CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$  frente à *S. aureus*. No entanto, nenhum isolado apresentou capacidade de inibir a formação de biofilme bacteriano, sendo assim todos os extratos ativos avaliados apresentaram uma clássica atividade antibiótica.

Foram obtidos também extratos brutos de cultivo em caldo BD, e os extratos de sobrenadante e micélio demonstraram que alterações simples de cultivo afetam significativamente a potencial capacidade de produção de metabólitos do fungo e, por conseguinte, a atividade biológica do extrato bruto. Os extratos de micélio dos isolados 1IP2F1, 4IP2F1, 5IP2F4 apresentaram CIM de 16  $\mu\text{g/mL}$ , e demonstraram ser potencialmente mais ativos que seus extratos de BDA.

O potencial antileishmania e citotóxico de alguns isolados também foi avaliado, e os isolados 6MP1F4, 6MP1F5 e 6IP2F3 reduziram mais de 90 % a infecção pelo parasita *L. infantum* (amastigota), apresentando índices de infecção menores do que 10%. Além disso, cinco isolados se mostraram promissores por inibir o crescimento celular de células leucêmicas em mais de 90 %. Portanto, os resultados obtidos dos bioensaios foram promissores para a prospecção dos metabólitos bioativos a partir desses isolados.

O isolado 5MP2F4, identificado como *Penicillium* sp., foi cultivado utilizando a estratégia OSMAC. Após análise do perfil químico via CLAE-DAD-EM dos extratos obtidos dos sobrenadantes (EBsob) e dos micélios (EBmic) de cada cultivo, foi obtida uma matriz com 120 metabólitos e suas respectivas intensidades nos cromatogramas. As análises estatísticas apontaram diferenças

qualitativas expressivas de metabólitos entre os extratos provenientes dos sobrenadantes e dos micélios. Todos os extratos obtidos no experimento de OSMAC foram analisados nos ensaios de crescimento bacteriano e inibição da formação de biofilme frente à cepa de *S. aureus*, onde foram observados diferentes níveis de atividade, com valores de MIC entre 16 e 256 µg/mL. A inserção desses dados na matriz com os dados cromatográficos permitiu a indicação de possíveis metabólitos bioativos como os compostos viridicatum toxina A, espirohexalina e pre-viridicatum toxina. Os resultados obtidos aqui demonstraram a importância do uso concomitante de OSMAC e metabolômica na previsão de diferenças entre metabólitos de amostras ativas e inativas, bem como demonstram o impacto da alteração de parâmetros de cultivo sobre a composição química e atividade biológica.

Foi realizado também um estudo de otimização da produção de extratos em altos rendimentos via extração acelerada por solvente (ASE), que possibilitou o isolamento de viridicatum toxina A sem a necessidade de etapas de purificação. O que permitiu a expansão do conhecimento de suas propriedades biológicas. Aqui avaliamos pela primeira vez o seu potencial anti-leishmania e ampliamos o conhecimento de suas propriedades antibióticas e citotóxicas. Esses dados apresentam novas investigações sobre a aplicação desta técnica para obtenção de extratos com melhores rendimentos e maior grau de pureza, o que contribui para o desenvolvimento biotecnológico no isolamento de metabólitos com alto rendimento.

Descrevemos diversas classes de metabólitos, encontradas nos EB dos isolados, dentre elas dicetopiperazinas do tipo brasiliamidas, alcaloides indólicos do tipo dicetopiperazínicos, austalídeos, policetídeos do tipo tetraciclina e xantonas do tipo ergocromo. Assim, mais de 200 potenciais metabólitos, encontrados em apenas duas cepas, foram sumariados e demonstram a vasta e promissora biodiversidade fúngica a ser explorada de endófitos provenientes do Pantanal.

Tomando em conjunto, os resultados aqui descritos sugerem que esta tese cumpriu seus objetivos de estabelecer culturas de fungos endofíticos de *Bromelia balansae*, e ampliar o conhecimento químico acerca dos metabólitos de endófitos de espécies do Pantanal. Essas contribuições podem levar ao

desenvolvimento de novos projetos de pesquisa com os seus isolados e contribuem para a sociedade com o conhecimento científico acerca da biodiversidade brasileira.

## 8. Referências Bibliográficas

ADUSUMILLI, R.; MALLICK, P. Data conversion with proteoWizard msConvert. **Methods in Molecular Biology**, v. 1550, p. 339–368, 2017.

AGRAWAL, S.; SAMANTA, S.; DESHMUKH, S. K. The antidiabetic potential of endophytic fungi: Future prospects as therapeutic agents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, 17 maio 2021.

ALI, H. et al. A Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65328, 12 jun. 2013.

ALVES, D. R. et al. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0196796, 1 jun. 2018.

AMIRZAKARIYA, B. Z.; SHAKERI, A. Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: An updated review (2011–2020). **Phytochemistry**, v. 197, p. 113130, 2022.

ANDERSEN, R. et al. Secalonic Acids D and F Are Toxic Metabolites of *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 352–353, 1 jan. 1977.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 1 mar. 2018.

ASBMBTODAY, A. H. **Antibiotic resistance is at a crisis point**. Disponível em: <<https://www.asbmb.org/asbmb-today/policy/110721/antibiotic-resistance-is-at-a-crisis-point>>. Acesso em: 9 março 2023.

ARIA, M.; CUCCURULLO, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of Informetrics**, v. 11, n. 4, p. 959–975, 1 nov. 2017.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

BASTOS, M. M. E. et al. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072–2104, 1 nov. 2016.

BERLINCK, R. G. S. et al. A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS DO BRASIL DO SÉCULO XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 3 jul. 2017.

BEZERRA, G. DE A. et al. Endophytic fungi associated with the restinga bromeliads the National Park of Jurubatiba Restinga, Rio de Janeiro - Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7 SE-, p. e971974298, 20 jun. 2020.

BEZERRA, J. D. P.; DA SILVA, L. F.; DE SOUZA-MOTTA, C. M. The Explosion of Brazilian Endophytic Fungal Diversity: Taxonomy and Biotechnological Potentials BT - Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi. Em: SATYANARAYANA, T.; DESHMUKH, S. K.; DESHPANDE, M. V (Eds.). Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 405–433.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 8 jun. 2022.

BORGES, B. S. et al. In vitro anti-Leishmania activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1948, 9 jan. 2023.

BURKNER, G. T. et al. Selenylated Imidazo[1,2-*a*]pyridine Induces Cell Senescence and Oxidative Stress in Chronic Myeloid Leukemia Cells. **Molecules** **2023**, Vol. 28, Page 893, v. 28, n. 2, p. 893, 16 jan. 2023.

BUTLER, M. S. et al. Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. e0199121–e0199121, 15 mar. 2022.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, nov. 2006.

CAMPOS, F. F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 65–74, 16 jan. 2015.

CEOLE, L. F. et al. Synthesis of novel quinine analogs and evaluation of their effects on *Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0184>, v. 10, n. 4, p. 391–408, 30 jan. 2018.

CHAGAS, F. O. et al. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. **Chemical Society reviews**, v. 47, n. 5, p. 1652–1704, mar. 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 2016.

CHITNIS, V. R. et al. Fungal Endophyte-Mediated Crop Improvement: The Way Ahead. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. October, 2020.

COELHO, R. G. et al. Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1277–1280, 2010.

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal biology reviews**, v. 31, n. 2, p. 99, 1 mar. 2017.

DA SILVA BALIN, P. et al. Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, n. December 2017, p. 79–86, 2018.

DALEY, S.; CORDELL, G. A. Biologically Significant and Recently Isolated Alkaloids from Endophytic Fungi. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 871–897, 26 mar. 2021.

DEBNATH, B.; SINGH, W. S.; MANNA, K. A phytopharmacological review on *Ananas comosus*. **Advances in Traditional Medicine**, p. 1–8, 14 mar. 2021.

DE AMORIM, M. R. et al. New Benzaldehyde and Benzopyran Compounds from the Endophytic Fungus *Paraphaeosphaeria* spF03 and Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities. **Planta Medica**, v. 85, n. 11–12, p. 957–964, 2019.

DE CARVALHO, A. C. et al. Chemodiversity and Anti-Leukemia Effect of Metabolites from *Penicillium setosum* CMLD 18. **Metabolites**, v. 13, n. 1, p. 23, 23 dez. 2022.

DE LIMA, M. S. et al. Checklist of the flora in ironstone outcrops at the Urucum Plateau, Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 3, p. e20180708, 1 jul. 2019.

DEEPIKA, V. B.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. **Microbiological Research**, v. 182, p. 125–140, 1 jan. 2016.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 94–112, 1 maio 2015.

DESHMUKH, S. K. et al. Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 164, 8 fev. 2022.

DOMÍNGUEZ, D. C.; CHACÓN, L. M.; WALLACE, D. Anthropogenic activities and the problem of antibiotic resistance in latin america: A water issue. **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 19, p. 1–14, 2021.

DOS SANTOS LACERDA, Í. C.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Endophytic Fungi as a Source of Antiviral Compounds – A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 6, 15 abr. 2022.

ELOFF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Med**, v. 64, n. 08, p. 711–713, 1998.

EL-SAYED, A. S. A. et al. Exploiting the Biosynthetic Potency of Taxol from Fungal Endophytes of Conifers Plants; Genome Mining and Metabolic Manipulation. **Molecules 2020, Vol. 25, Page 3000**, v. 25, n. 13, p. 3000, 30 jun. 2020.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 15 maio 2020.

FAROOQ, S. et al. Discovery of a Secalonic Acid Derivative from *Aspergillus aculeatus*, an Endophyte of *Rosa damascena* Mill., Triggers Apoptosis in MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Cells. **ACS Omega**, v. 5, n. 38, p. 24296–24310, 29 set. 2020.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019.

**Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 mar. 2023.

FURTADO, N. A. J. C. et al. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 10, p. 1279–1286, 1 out. 2007.

GAKUUBI, M. M. et al. Fungal Endophytes: A Promising Frontier for Discovery of Novel Bioactive Compounds. **Journal of Fungi** **2021**, v. 7, n. 10, p. 786, 22 set. 2021.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25, 2018.

GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872–895, 2011.

GOMES, R. R. et al. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, p. 1, 2013.

GUBIANI, J. R. et al. Cytotoxic prenylated indole alkaloid produced by the endophytic fungus *Aspergillus terreus* P63. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 162–167, 2019.

GUO, J.-P. et al. Isolation of Talathermophilins from the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus* YM3-4. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2278–2281, 28 out. 2011.

GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v. 39, 22 outubro 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HILARINO, M. P. A. et al. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 815–821, 2011.

HRIDOY, M. et al. Putative Anticancer Compounds from Plant-Derived Endophytic Fungi: A Review. **Molecules 2022, Vol. 27, Page 296**, v. 27, n. 1, p. 296, 4 jan. 2022.

HYDE, K. D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1–136, 2019.

HZOUNDA FOKOU, J. B. et al. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal natural products from endophytes. **Parasitology Research**, v. 120, n. 3, p. 785–796, 1 mar. 2021.

INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections. **Report to the secretary general of the United Nations**, v. 54, n. 4, p. 1–25, 2019.

IOC/FIOCRUZ, M. M. **Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia.** Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>>.

JAYARAMAN, A.; JAMIL, K. Drug Targets for Cell Cycle Dysregulators in Leukemogenesis: In Silico Docking Studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86310, 15 jan. 2014.

KAWAI, K. I. et al. Studies on Fungal Products. VII. The Structures of Meleagrins and 9-O-p-Bromobenzoylmeleagrins. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 94–98, 25 jan. 1984.

KHATTAB, A. R.; FARAG, M. A. Marine and terrestrial endophytic fungi: a mine of bioactive xanthone compounds, recent progress, limitations, and novel applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 403–430, maio 2022.

KLEINGESINDS, C. K. et al. Impact of tank formation on distribution and cellular organization of trichomes within *Guzmania monostachia* rosette. **Flora. Morphologie, Geobotanik, Oekophysiologie**, v. 243, p. 11–18, 2018.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 507–522, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 27 julho 2012.

LEAL, B. S. S. et al. Insights into the evolutionary dynamics of Neotropical biomes from the phylogeography and paleodistribution modeling of *Bromelia balansae*. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 10, p. 1725–1734, 2018.

LI, S. J. et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316–343, 5 ago. 2018.

LIARZI, O. et al. Use of the Endophytic Fungus *Daldinia cf. concentrica* and Its Volatiles as Bio-Control Agents. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168242, 1 dez. 2016.

LUGHADHA, E. N. et al. Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. **Phytotaxa**, v. 272, n. 1, p. 82–88–82–88, 26 ago. 2016.

MANETTI, L. M.; DEIAPORTE, R. H.; LAVERDE, A. Metabólitos secundários da família bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885–1897, 2009.

MARESCA, M. et al. Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. **Antibiotics 2022, Vol. 11, Page 1604**, v. 11, n. 11, p. 1604, 11 nov. 2022.

MASTELARO DE REZENDE, M.; FERREIRA, A. T.; PAREDES-GAMERO, E. J. Leukemia stem cell immunophenotyping tool for diagnostic, prognosis, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 6, p. 4989–4998, 1 jun. 2020.

MERCURO, N. J.; VEVE, M. P. Clinical Utility of Lefamulin: If Not Now, When? **Current Infectious Disease Reports**, v. 22, n. 9, p. 25, 2020.

MOHD ALI, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. **Food Research International**, v. 137, p. 109675, 2020.

MONTERO, J. C. et al. Inhibition of Src family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: Possible combinations in solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 17, p. 5546–5552, 1 set. 2011.

MULDER, K. C. L. et al. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, Part 1, p. 648–665, 2015.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável \_ As Nações Unidas no Brasil**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 17 maio. 2022.

NEUBAUER, L. et al. Identification and characterization of the ergochrome gene cluster in the plant pathogenic fungus *claviceps purpurea*. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 22 mar. 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NEWMISTER, S. A. et al. Unveiling sequential late-stage methyltransferase reactions in the melegarin/oxaline biosynthetic pathway. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 35, p. 6450–6459, 11 set. 2018.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid

chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1–2, p. 111–136, 2003.

NORILER, S. A. et al. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, pantanal, and Cerrado. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–14, 2018.

NORILER, S. A. et al. Vochysiamides A and B: Two new bioactive carboxamides produced by the new species *Diaporthe vochysiae*. **Fitoterapia**, v. 138, p. 104273, 2019.

ORFALI, R.; PERVEEN, S. New Bioactive Metabolites from the Thermophilic Fungus *Penicillium* sp. Isolated from Ghamiqa Hot Spring in Saudi Arabia. **Journal of Chemistry**, v. 2019.

ORGANIZATION, W. H. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva PP - GenevaWorld Health Organization, 2017.

PAREDES-GAMERO, E. J. et al. Hematopoietic modulators as potential agents for the treatment of leukemia. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 5 E, n. 1, p. 130–140, 1 jan. 2013.

PETERSEN, L. M. et al. Dereplication Guided Discovery of Secondary Metabolites of Mixed Biosynthetic Origin from *Aspergillus aculeatus*. **Molecules** **2014, Vol. 19, Pages 10898-10921**, v. 19, n. 8, p. 10898–10921, 25 jul. 2014.

POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do Pantanal. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal**, 1ª edição, Corumbá, MS: EMBRAPA-SP1, 320 p., 1994.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B. Plantas Úteis À Sobrevivência No Pantanal. **IV Simpósio sobre Recurso Naturais e Sócio-econômico do Pantanal**, p. 1–16, 2004.

PRAJAPATI, J.; GOSWAMI, D.; RAWAL, R. M. Endophytic fungi: A treasure trove of novel anticancer compounds. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 2, p. 100050, 1 jan. 2021.

RADIĆ, N.; ŠTRUKELJ, B. Endophytic fungi -The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1270–1284, 2012.

RAJA, H. A. et al. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 24 mar. 2017.

Rashmi M, Kushveer JS, Sarma VV. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere**, v. 10, n. 1, p. 798–1079, 2019.

RIBEIRO, B. A. et al. Chemical Diversity of Secondary Metabolites Produced by Brazilian Endophytic Fungi. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 33–54, 2021.

ROHR, J. R. et al. Emerging human infectious diseases and the links to global food production. **Nature Sustainability 2019 2:6**, v. 2, n. 6, p. 445–456, 11 jun. 2019.

RUSTAMOVA, N. et al. Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 2, p. 425–448, 2020.

SANTOS, M. A.; Resende, A. A.; Silva, U. C.; Santos, V. L. Fungos endofíticos de sementes de bromélia de campo rupestre e potencial na produção de auxina in vitro. **15º Congresso Nacional de Meio Ambiente**. p. 1–6, 25-28 setembro 2018.

SANTOS, M. et al. Advances in the Role of Dark Septate Endophytes in the Plant Resistance to Abiotic and Biotic Stresses. **Journal of fungi**, v. 7, n. 11, p. 939, 4 nov. 2021.

SAVI, D. C. et al. *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3122, 2018.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, 2019.

SENF, D.; JEREMIAS, I. A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, v. 69, p. 1–10, 1 jan. 2019.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012.

SILVA, L. F. et al. Penicillium and Talaromyces endophytes from Tillandsia catimbauensis, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for l-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 0, 2018.

SILVA, F. M. R. et al. Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. **Metabolites**, v. 13, p. 236, 2023.

SINGH, A. et al. Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: Insights, avenues, and challenges. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–42, 2021.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, n. 2, p. 264–270, 1997.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. A comparison of some preservation techniques for fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 81, n. 3, p. 535–540, 1983.

SOROKINA, M.; STEINBECK, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. **Journal of Cheminformatics 2020 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–51, 3 abr. 2020.

STADLER, M. et al. A polyphasic taxonomy of Daldinia (Xylariaceae). **Studies in Mycology**, v. 77, p. 1–143, 2014.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491, dez. 2003.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 2, 1 jun. 2018.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 1 maio 2021.

SVARSTAD, H.; BUGGE, H. C.; DHILLION, S. S. From Norway to Novartis: Cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. **Biodiversity and Conservation**, v. 9, n. 11, p. 1521–1541, 2000.

TAKAHASI, A.; MEIRELLES, S. T. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 4, p. 515–528, 2014.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448–459, 1 jan. 2001.

THI MINH LE, T. et al. Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16152, 2019.

TIRADO, T. C. et al. Use of the high-content imaging system equipment to evaluate in vitro infection by *Leishmania braziliensis* in response to sand fly *Nyssomyia neivai* saliva. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105540, 1 set. 2020.

TOGHUEO, R. M. K. Anti-leishmanial and Anti-inflammatory Agents from Endophytes: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 5, p. 311, 1 out. 2019.

TOMAS, W. M. et al. Sustainability Agenda for the Pantanal Wetland: Perspectives on a Collaborative Interface for Science, Policy, and Decision-Making. **Tropical Conservation Science**, v. 12, 1 jan. 2019.

TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 1 set. 2011.

UNEP - UN Environment Programme. Antimicrobial resistance: a global threat . Disponível em: <<https://www.unep.org/explore-topics/chemicals-waste/what-we>

do/emerging-issues/antimicrobial-resistance-global-threat>. Acesso em: 3 mar. 2023.

Uzma F, Mohan CD, Hashem A, Konappa NM, Rangappa S, Kamath PV, Singh BP, Mudili V, Gupta VK, Siddaiah CN, Chowdappa S, Alqarawi AA and Abd\_Allah EF. Endophytic Fungi - Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 309, 2018.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VERSIEUX, L. DE M. et al. Check-list of bromeliaceae from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, p. 163–168, 2018.

VISENTIN, M.; ZHAO, R.; GOLDMAN, I. D. The Antifolates. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 629–648, 1 jun. 2012.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology** **2016 34:8**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.

WHO, 2023. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>>. Acesso em: 15 março 2023.

WEZEMAN, T.; BRÄSE, S.; MASTERS, K. S. Xanthone dimers: a compound family which is both common and privileged. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 1, p. 6–28, 10 dez. 2014.

WORLD BANK. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (Final Report). **World Bank Report**, n. 3, p. 1–132, 2017.

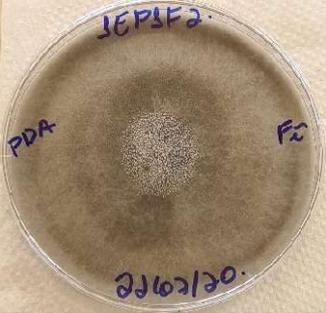
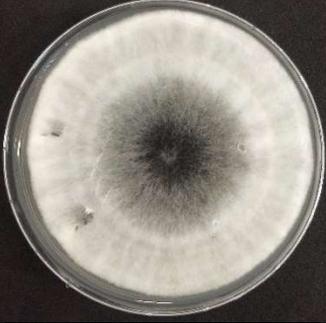
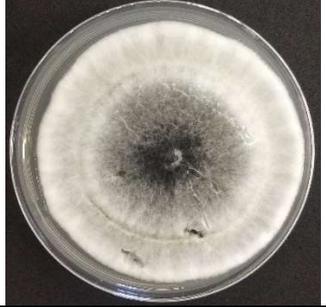
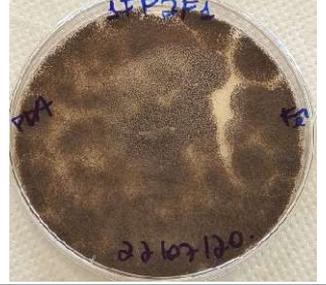
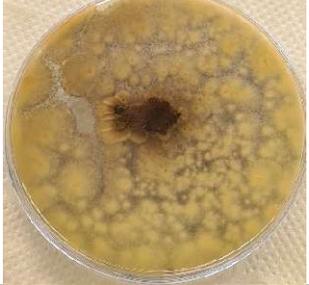
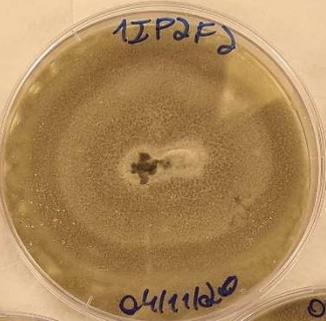
XING, J. et al. Rapid screening for cyclo-dopa and diketopiperazine alkaloids in crude extracts of *Portulaca oleracea* L. using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 9, p. 1415–1422, 15 maio 2008.

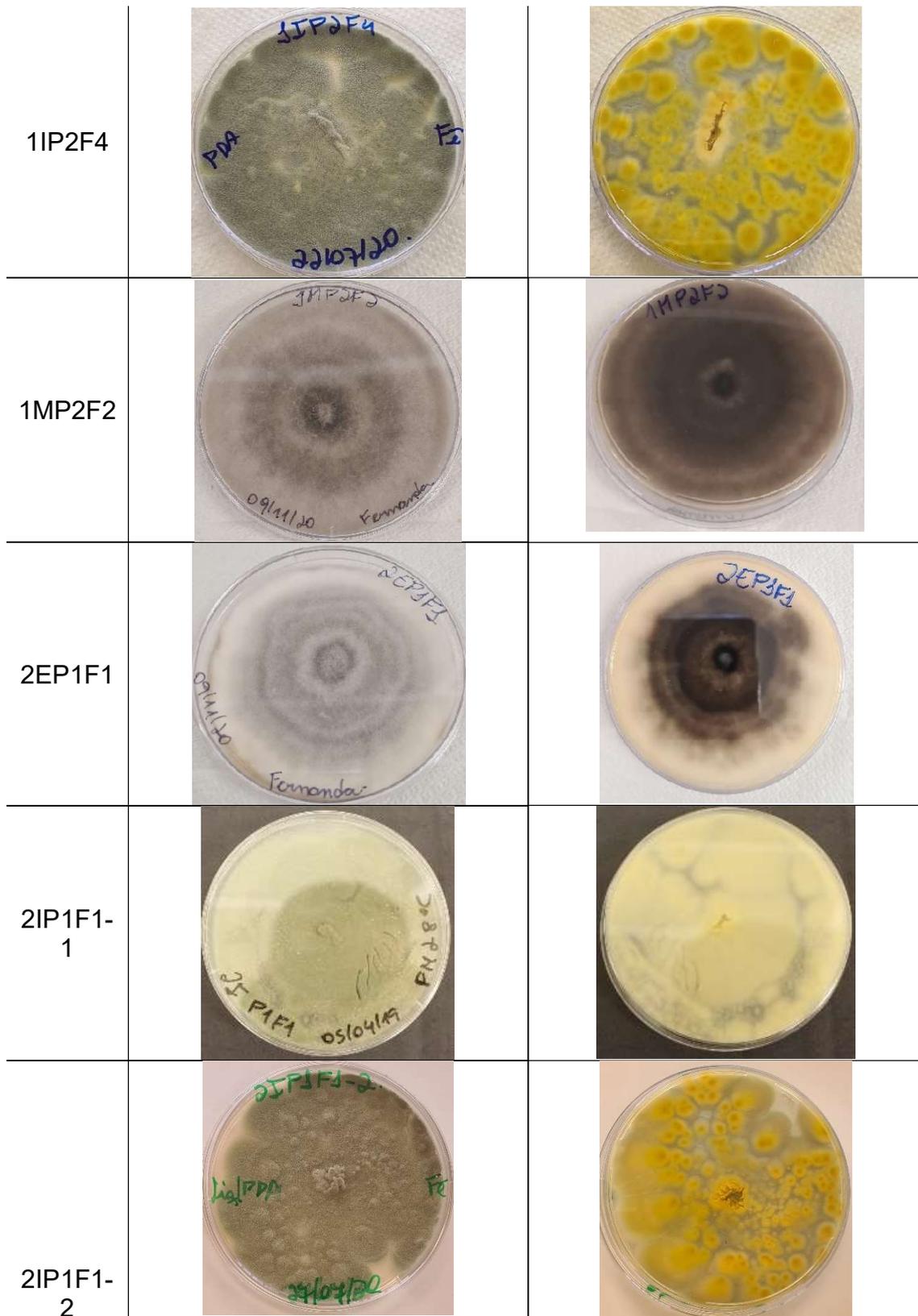
YANG, L. et al. Reactive oxygen species regulate the differentiation of acute promyelocytic leukemia cells through HMGB1-mediated autophagy. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 2, p. 714, 2015.

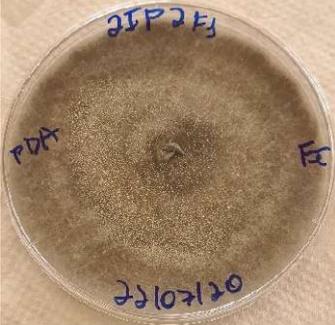
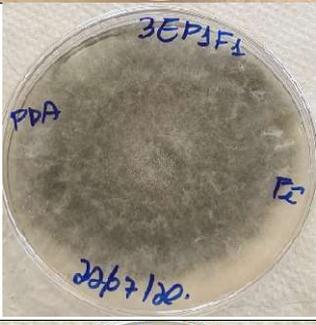
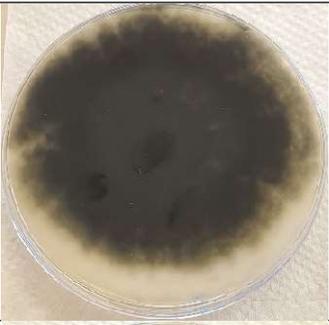
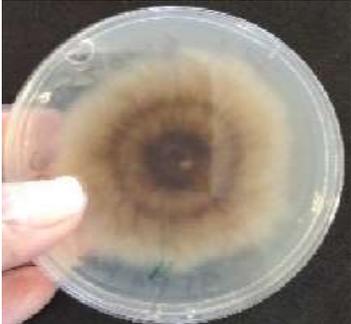
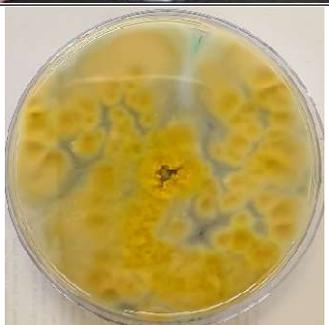
YONG, K. et al. New polyhydroxanthones from the marine-associated fungus *Penicillium* sp. ZZ1750. **Tetrahedron Letters**, v. 81, p. 153354, 28 set. 2021.

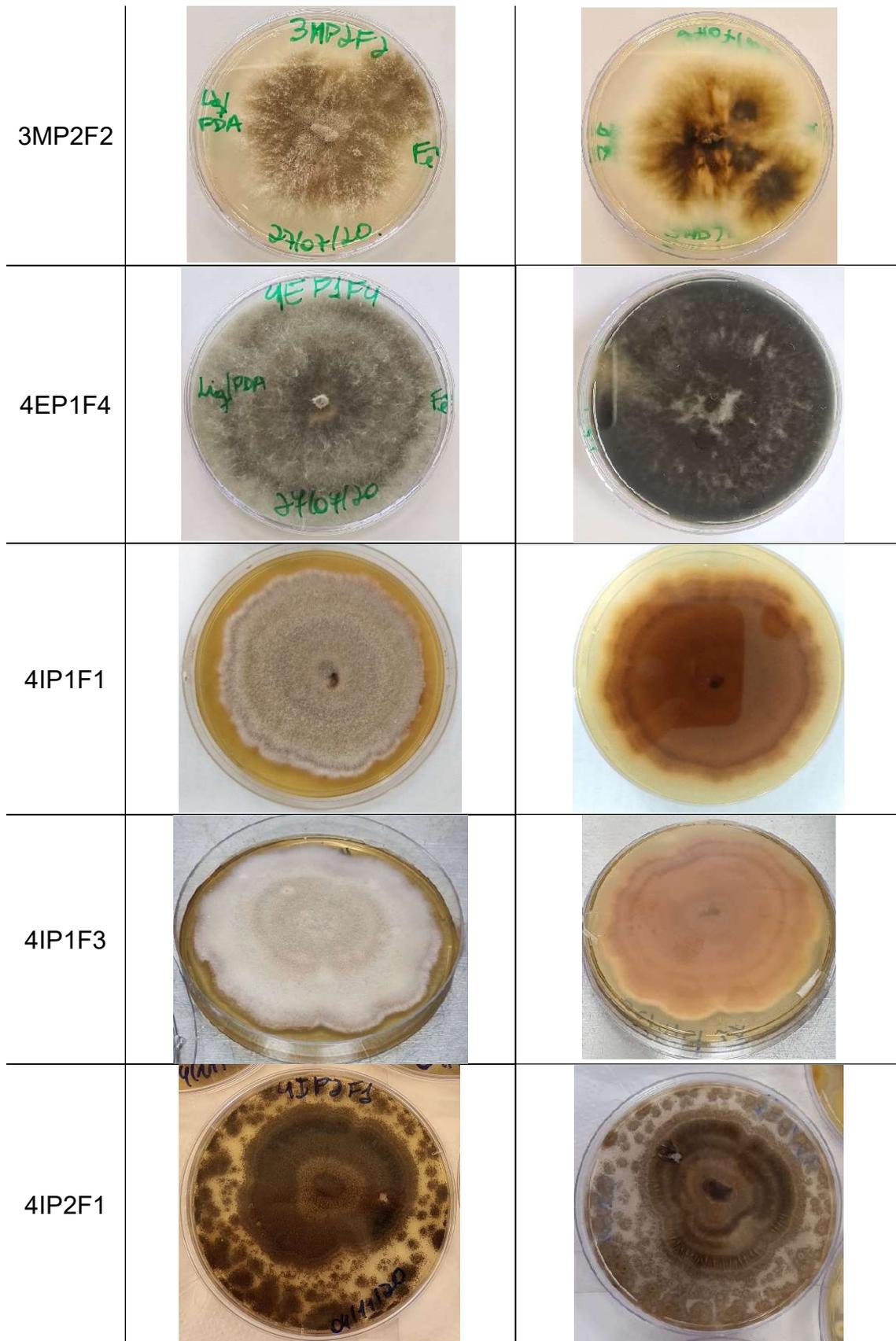
## *9. Anexos*

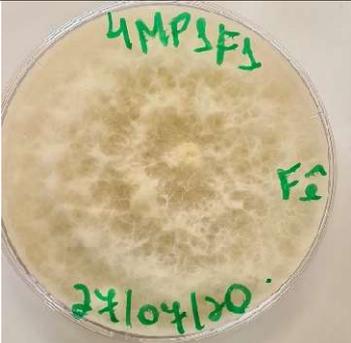
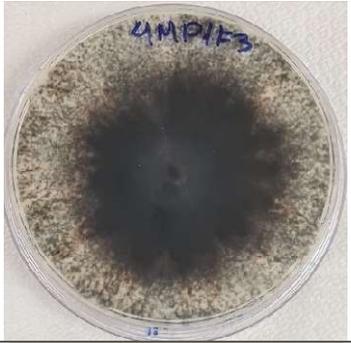
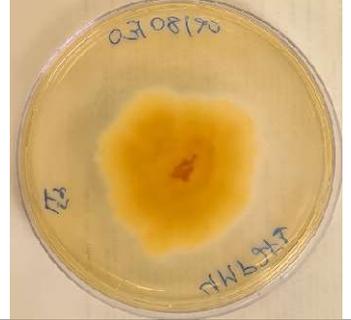
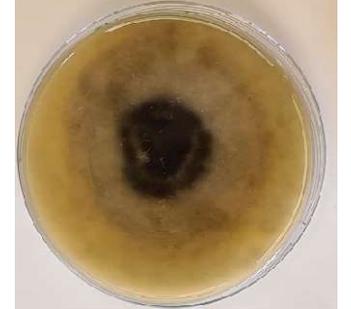
9.1 Fungos endofíticos isolados de *Bromelia balansae*

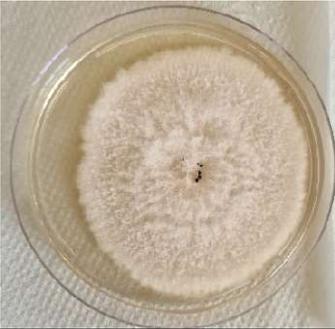
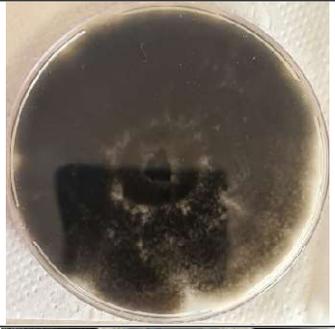
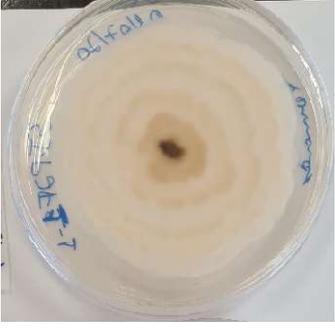
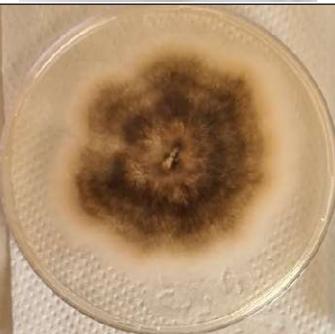
Código Isolado	Placa de BDA frente	Placa de BDA verso
1EP1F2		
1EP2F1		-
1EP2F2		-
1IP2F1		
1IP2F2		

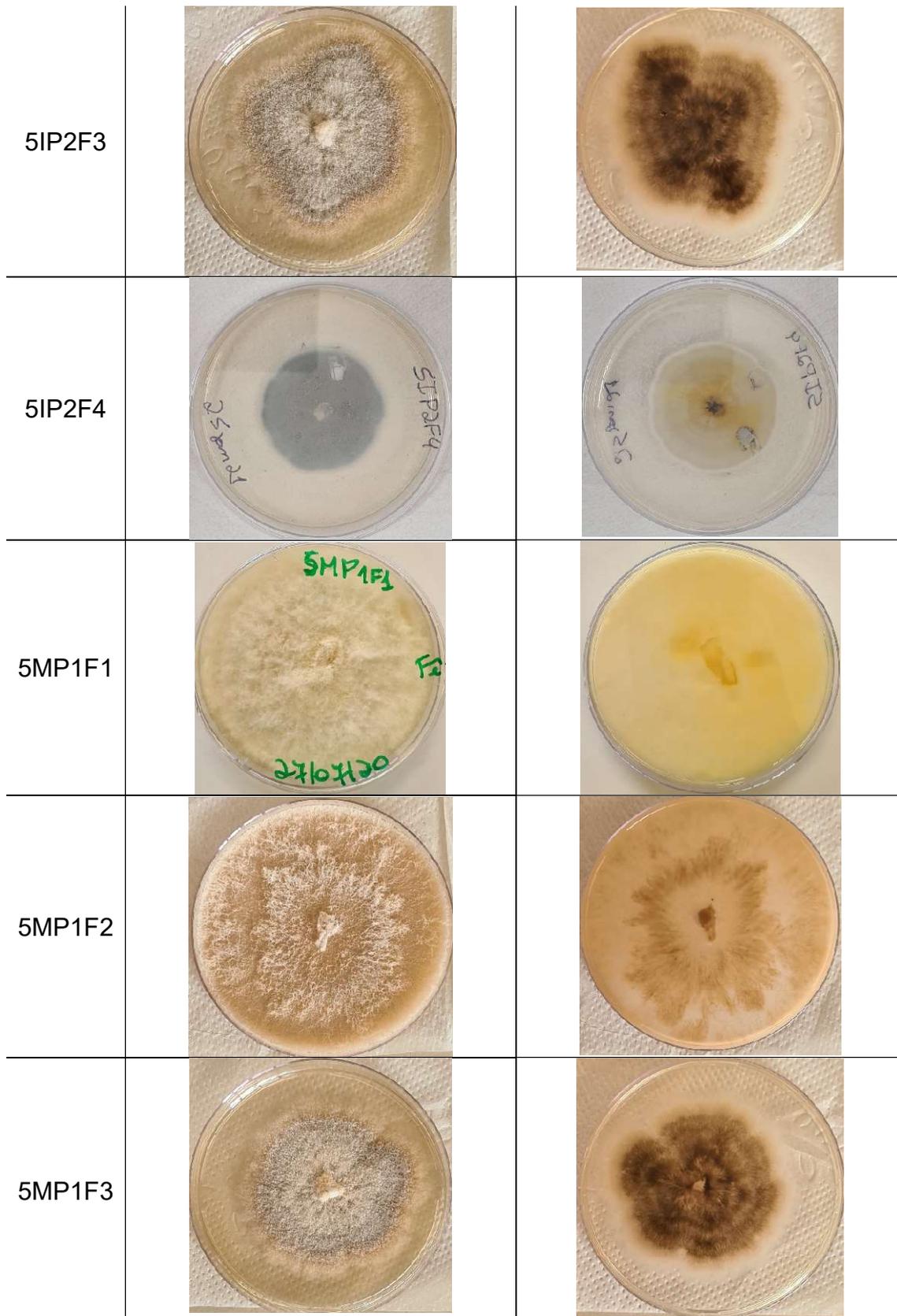


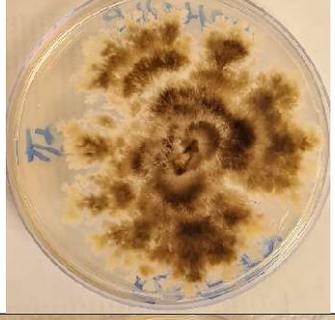
2IP2F1		
3EP1F1		
3IP1F1		
3IP1F2		
3MP2F1		

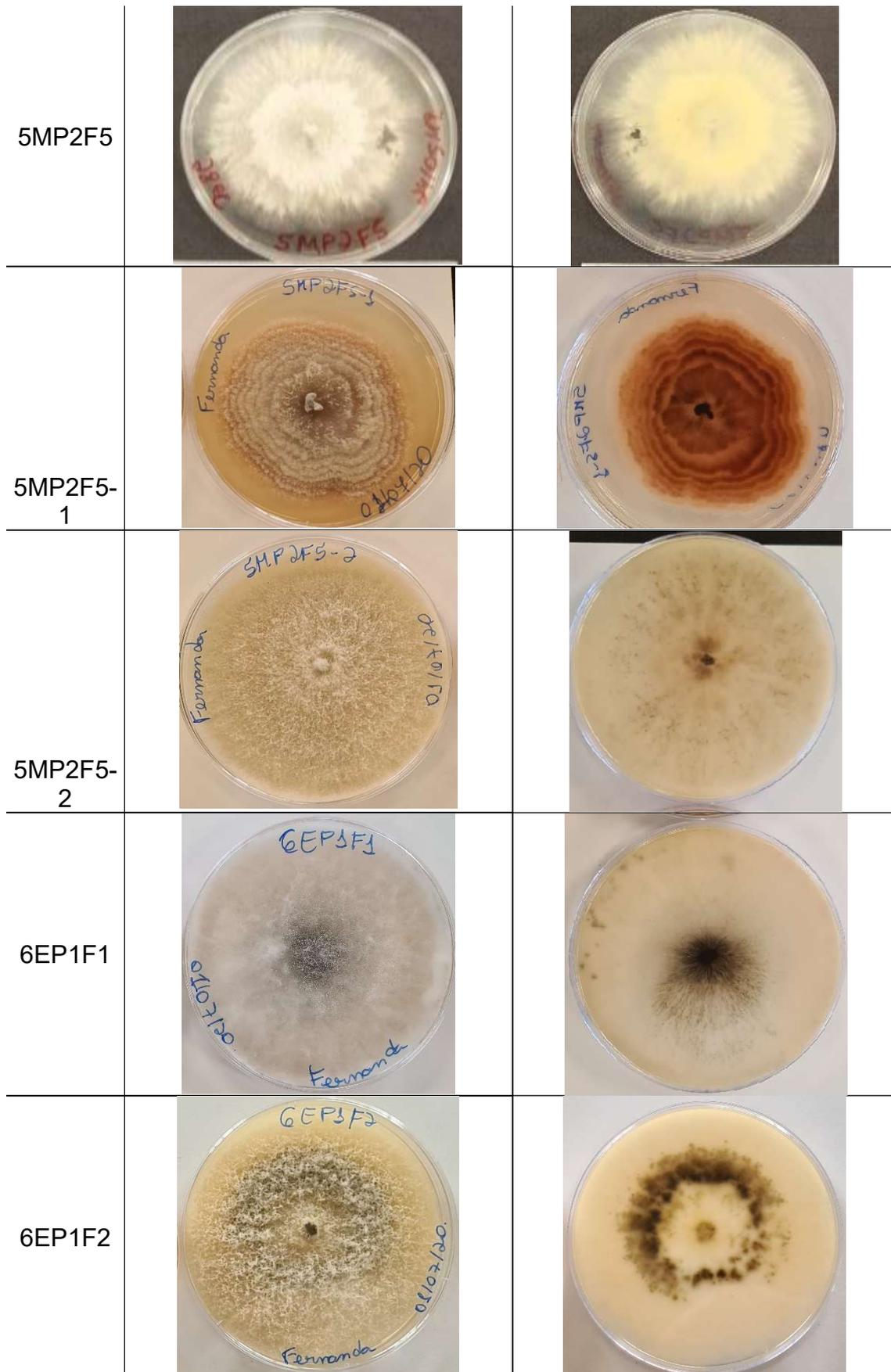


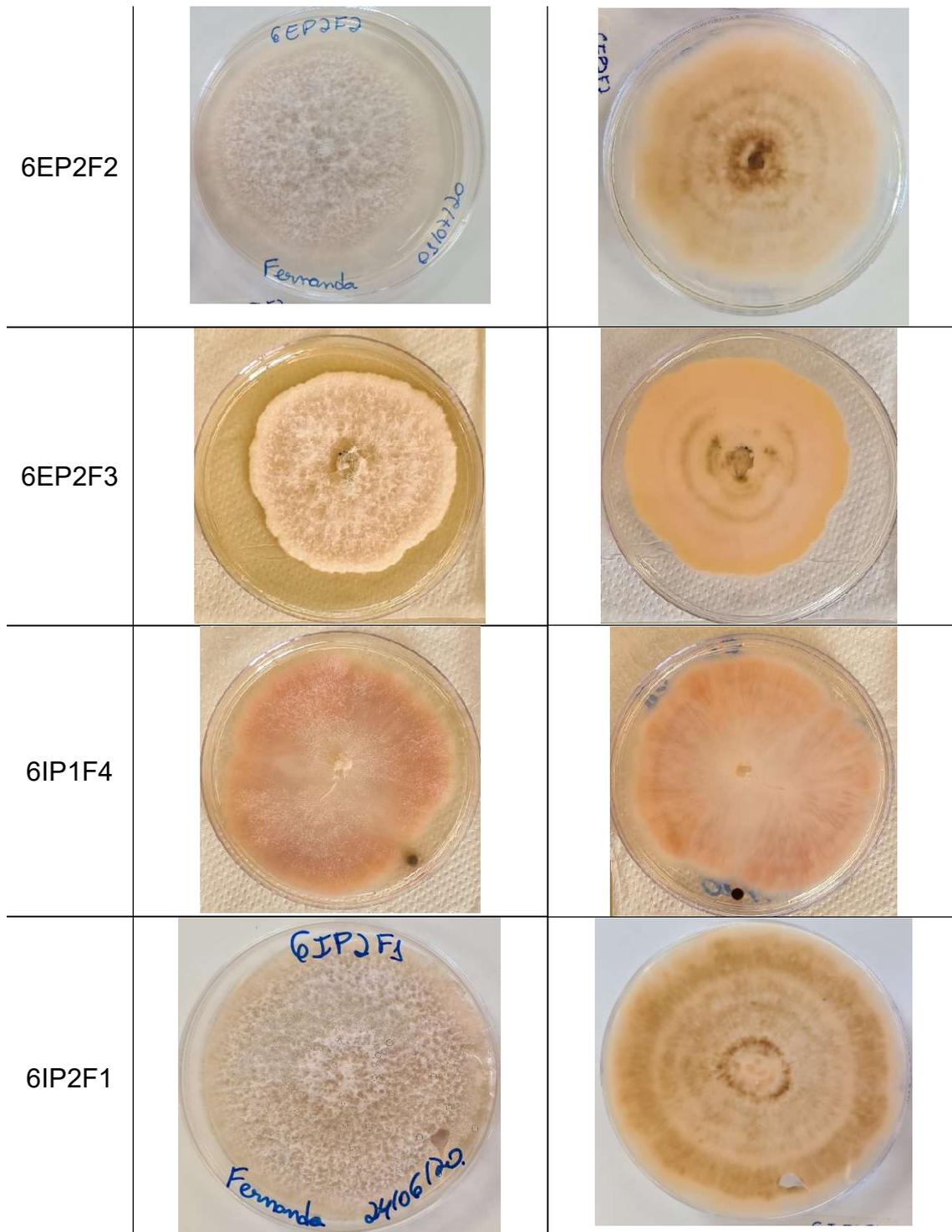
4IP2F2		
4MP1F1		
4MP1F3		
4MP2F1		
4MP2F2		

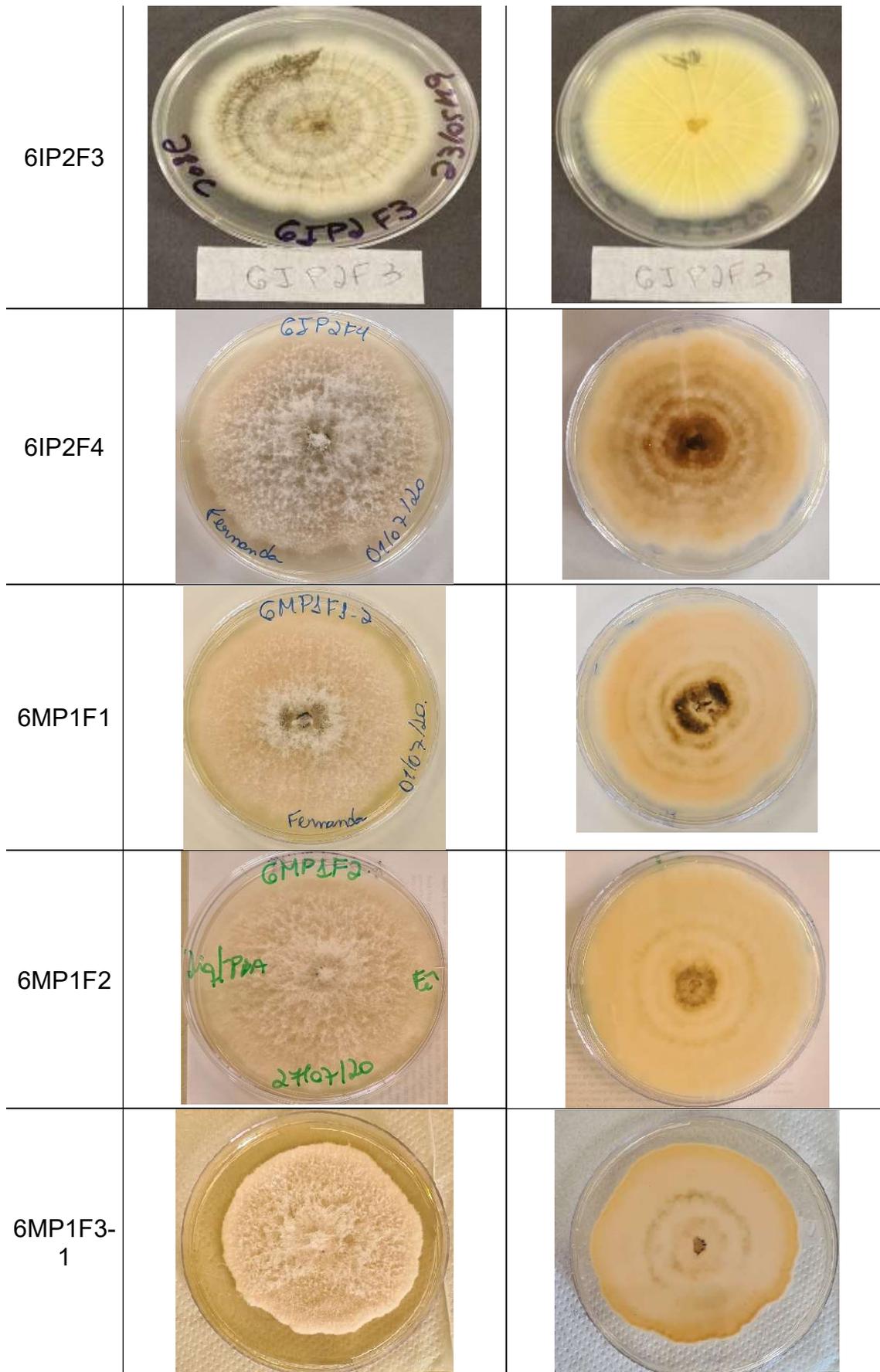
5EP1F1		
5EP2F2		
5IP2F1-1		
5IP2F1-2		
5IP2F2		

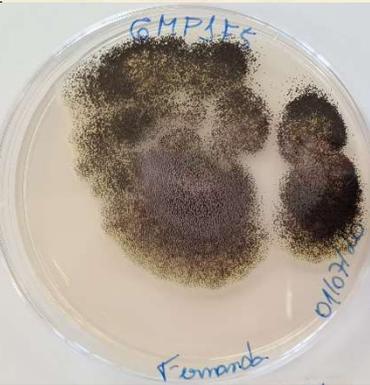
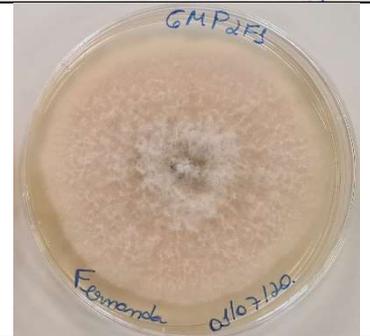
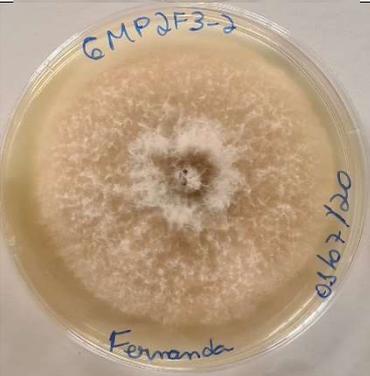
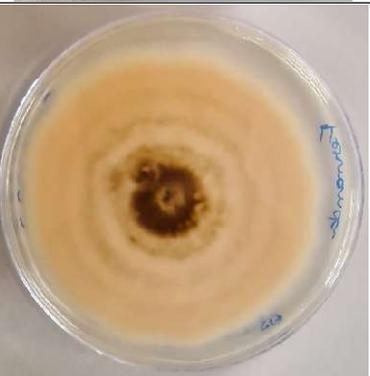
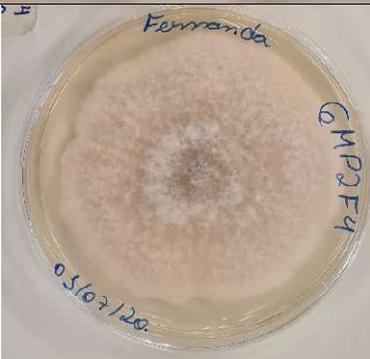


<p>5MP2F1- 1</p>		
<p>5MP2F1- 2</p>		
<p>5MP2F2</p>		
<p>5MP2F3</p>		
<p>5MP2F4</p>		







<p>6MP1F4</p>		
<p>6MP1F5</p>		
<p>6MP2F1</p>		
<p>6MP2F3-2</p>		
<p>6MP2F4</p>		

## 9.2. Licença de reprodução do capítulo 4



**Figura 9.2.1** - Resumo da licença de reprodução do capítulo 4 pela CC BY 4.0.

A cópia da licença completa está disponível em:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (Acessado em 6 de março de 2023)

## Copyrights

### Copyright and Licensing

For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, meaning that anyone may download and read the paper for free. In addition, the article may be reused and quoted provided that the original published version is cited. These conditions allow for maximum use and exposure of the work, while ensuring that the authors receive proper credit.

In exceptional circumstances articles may be licensed differently. If you have specific condition (such as one linked to funding) that does not allow this license, please mention this to the editorial office of the journal at submission. Exceptions will be granted at the discretion of the publisher.

**Figura 9.2.2** - Licença de reprodução do capítulo 4 pela *Metabolites*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/authors/rights> (Acessado em 6 de março de 2023)