



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



FARMÁCIA

LARISSA DE MORAIS PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS A
PARTIR DO FUNGO ENDOFÍTICO *Penicillium cataractarum* 5IP2F4**

CAMPO GRANDE - MS
2025

LARISSA DE MORAIS PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS A PARTIR DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Penicillium cataractarum* 5IP2F4

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Brentan da Silva

CAMPO GRANDE – MS
2025

LARISSA DE MORAIS PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS A PARTIR DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Penicillium cataractarum* 5IP2F4

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Denise Brentan da Silva

Campo Grande, 04 de dezembro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Denise Brentan da Silva (Presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Me. Izadora Bonfim (Membro Titular)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos (Membro Titular)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof.^a Dra. Simone Schneider Webber (Membro Suplente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido minha rocha e minha direção. Foi Ele quem guiou cada uma das minhas escolhas, mostrando com amor e sabedoria que tudo acontece conforme Seus planos.

À minha família, especialmente aos meus pais, Adinei e Valéria, que com tanta luta me sustentaram, me incentivaram e acreditaram em mim quando eu mesma duvidava. Amo profundamente cada um de vocês, e não existem palavras capazes de expressar a gratidão que eu sinto por todo o amor que me deram. Como família, incluo também meus amigos e as famílias desses amigos, que mesmo sem compartilhar meu sangue, acolheram e acreditaram naquela menina de 17 anos, cheia de sonhos e quase nenhuma experiência. Obrigada por caminharem ao meu lado em cada um desses cinco anos. Essa conquista também é de vocês.

Ao amor, que me manteve de pé, oferecendo amparo, paciência e companhia, e me animando nos meus dias mais turbulentos. Obrigada por ter sido porto seguro quando eu mais precisei.

Às amigas que passaram na minha vida durante esse período, deixando marcas, aprendizados e memórias que levarei para sempre, meu sincero agradecimento. Aqui, tenho um carinho especial pelo grupo PET, que não apenas ampliou minha formação, mas também me presenteou com amigos que levarei para a vida.

Ao destino, por me mostrar que nada é por acaso e que cada encontro, cada desafio e cada desvio têm um propósito maior.

Agradeço ainda à minha orientadora, Prof.^a Dra. Denise Brentan da Silva, por quem tenho profunda admiração. Sem seu apoio, suas correções, sua orientação e sua confiança, nada disso existiria. E a toda equipe do LaPNEM, especialmente às minhas coorientadoras Laís Rodrigues, Caroline e Katyuce, que dividiram comigo dias e noites de experimentos e se tornaram muito mais do que colegas de profissão. Vocês me inspiram e me motivam.

Estendo minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Seja com palavras de incentivo, gestos de apoio, troca de conhecimento ou simples presenças que tornaram a jornada mais leve. Cada contribuição, por menor que parecesse, foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à UFMS e aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fundect pelo apoio institucional e financeiro que tornou este trabalho possível.

E por fim, agradeço a mim mesma pela coragem de não desistir e pela sabedoria de escolher as melhores pessoas do mundo para compartilhar a vida.

RESUMO

Os fungos endofíticos representam uma importante fonte de metabólitos secundários com potencial aplicação farmacológica, destacando-se como promissores na busca por novos compostos antimicrobianos. *Penicillium cataractarum* é uma espécie ainda pouco explorada, mas que mostrou resultados relevantes em estudos preliminares de atividade antibacteriana. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar e otimizar a produção de metabólitos com atividade antibacteriana a partir da cepa endofítica *P. cataractarum* 5IP2F4, isolada de *Bromelia balansae* coletada no Pantanal sul mato-grossense. Para isso aplicou-se a estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds*), variando-se os meios de cultivo líquido a fim de modular as vias biossintéticas e ampliar a diversidade química produzida pela cepa. A avaliação antibacteriana foi realizada por ensaio de microdiluição em caldo e as análises químicas dos extratos foram realizadas por CLAE-DAD-EM e CG-EM. As variações nos meios de cultivo influenciaram significativamente no crescimento micelial e na composição química dos extratos, resultando também em diferenças no rendimento obtido. A análise cinética indicou que o 22º dia corresponde ao ponto de maior acúmulo de metabólitos extracelulares, refletido na intensificação dos picos dos quatro compostos majoritários anotados, todos pertencentes à classe das dicetopiperazinas. Já as análises de CG-EM revelaram variações marcantes entre as frações hexânicas obtidas dos extratos brutos das biomassas miceliais (EBmic), com predominância de ergosterol nos cultivos em PDB e YPD, enquanto o meio CZA favoreceu a produção de ésteres de ácidos graxos insaturados, especialmente linoleato e oleato de metila. Quanto à inibição do crescimento bacteriano, apesar de nenhum dos extratos apresentar atividade significativa frente a *Escherichia coli* (ATCC 14458), o extrato do sobrenadante do cultivo em Czapek (EBsob - CZA) foi capaz de inibir 68% do crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 na concentração de 1 mg/mL. Os resultados obtidos reforçam que *P. cataractarum* 5IP2F4 possui um metaboloma versátil e fortemente dependente das condições de cultivo, confirmando a importância do OSMAC como ferramenta para ativação de vias biossintéticas e ampliação da diversidade química acessível. Assim, este estudo contribui para o conhecimento sobre o potencial biossintético de *P. cataractarum* e destaca sua relevância como fonte alternativa de metabólitos com atividade antibacteriana, sobretudo frente a patógenos de importância em saúde pública.

Palavras-chave: *Penicillium cataractarum*; fungos endofíticos; OSMAC; cinética; antibacterianos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are an important source of secondary metabolites with potential pharmacological applications, standing out as promising candidates in the search for new antimicrobial compounds. *Penicillium cataractarum* is a species that remains poorly explored but it has shown relevant results in preliminary antibacterial studies. In this context, the present work aimed to investigate and optimize the production of antibacterial metabolites from the endophytic strain *P. cataractarum* 5IP2F4, isolated from *Bromelia balansae* collected in the s Pantanal of Mato Grosso do Sul (Brazil). The OSMAC (One Strain Many Compounds) strategy was applied by varying liquid culture media in order to modulate biosynthetic pathways and expand the chemical diversity produced by the strain. Antibacterial activity was assessed by broth microdilution assays, and chemical analyses of the extracts were performed using HPLC-DAD-MS and GC-MS. Variations among the culture media significantly influenced mycelial growth and the chemical profile of the extracts, resulting in differences in extract yields. Kinetic analysis indicated that day 22 corresponded to the point of highest accumulation of extracellular metabolites, reflected by the intensification of the four major annotated compounds, all classified as diketopiperazines. GC-MS analysis revealed marked variation among the media, with ergosterol predominating in the hexane fractions from mycelial extracts obtained in PDB and YPD cultures, while CZA medium favored the production of unsaturated fatty acid esters, especially methyl linoleate and methyl oleate. Regarding antibacterial inhibition, although none of the extracts displayed significant activity against *Escherichia coli* (ATCC 14458), the supernatant extract obtained from Czapek medium (EBsob-CZA) inhibited 68% of *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 growth at 1 mg/mL. The findings reinforce that *P. cataractarum* 5IP2F4 possesses a versatile metabolome strongly dependent on culture conditions, confirming the importance of the OSMAC strategy as a tool for activating biosynthetic pathways and expanding accessible chemical diversity. Overall, this study contributes to the understanding of the biosynthetic potential of *P. cataractarum* and highlights its relevance as an alternative source of metabolites with antibacterial activity, particularly against pathogens of public health importance.

Keywords: *Penicillium cataractarum*; endophytic fungi; OSMAC; kinetic; antibacterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de antibacterianos derivados de produtos naturais

Figura 2 - Estruturas químicas de compostos bioativos descritos no gênero *Penicillium*.

Figura 3 - Vista superior (A) e inferior (B) da cepa fúngica isolada *P. cataractarum* 5IP2F4 cultivada em meio batata-dextrose e ágar (BDA). Na vista superior, observa-se um fungo filamentososo de coloração verde acinzentada com grande esporulação. Já na vista inferior, a cepa apresenta coloração branca.

Figura 4 - Estruturas dos compostos anotados e monitorados na análise cinética.

Figura 5 - Gráfico da cinética de liberação de metabólitos do dia 05 ao 28 de crescimento fúngico, com a variação da intensidade das dicetopiperazinas 1-4 ao longo do período de cultivo.

Figura 6 - *Penicillium cataractarum* 5IP2F4 cultivado nos meios de cultivo caldo batata dextrose (PDB) (A), levedura peptona dextrose (YPD) (B) e caldo Czapek Dox (CZA) (C).

Figura 7 - Massa micelial obtidas no cultivo em meio líquido de caldo batata dextrose (PDB), levedura peptona dextrose (YPD) e o caldo Czapek Dox (CZA).

Figura 8 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio CZA (EBmic-Hx-CZA) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Figura 9 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio PDB (EBmic-Hx-PDB) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Figura 10 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio YPD (EBmic-Hx-YPD) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Figura 11 - Viabilidade celular frente a *S. aureus* com os extratos brutos de sobrenadante (EBsob) (A) e da biomassa micelial (EBmic-Me) (B) obtidos a partir do cultivo nos meios de cultura PDB, YPD e CZA. Genta=gentamicina (controle positivo).

Figura 12 - Viabilidade celular frente a *E. coli* com os extratos brutos de sobrenadante (EBsob) (A) e da biomassa micelial (EBmic-Me) (B) obtidos a partir do cultivo nos meios de cultura PDB, YPD e CZA. Genta = gentamicina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa e rendimentos dos extratos brutos de sobrenadante (EBsob) e da biomassa micelial (EBmic).

Tabela 2 - Compostos anotados a partir da análise do sobrenadante por CLAE-DAD-EM.

Tabela 3 - Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio Czapek (EBmic-Hx-CZA) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Tabela 4 - Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio PDB (EBmic-Hx-PDB) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Tabela 5 - Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio YPD (EBmic-Hx-YPD) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Meio batata dextrose e ágar.

BHI - Brain Heart Infusion.

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides.

B.O.D - Biochemical Oxygen Demand – Demanda Biológica de Oxigênio.

CG - Cromatografia em fase gasosa.

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.

CZA - Meio caldo Czapek Dox.

DAD - Detector de arranjo de diodos.

Dr. - Doutor.

Dra. - Doutora.

EBmic - Extrato bruto do micélio.

EBmic - CZA - Extrato bruto do micélio do cultivo em meio caldo Czapek Dox.

EBmic - Hx - Fração hexânica do extrato bruto do micélio.

EBmic - Me - Fração hidrometanólica do extrato bruto do micélio.

EBmic - PDB - Extrato bruto do micélio do cultivo em meio caldo batata dextrose

EBmic - YPD - Extrato bruto do micélio do cultivo em meio de extrato de levedura peptona dextrose.

EBsob - Extrato bruto do sobrenadante.

EBsob - CZA - Extrato bruto do sobrenadante do cultivo em meio caldo Czapek Dox.

EBsob - PDB - Extrato bruto do sobrenadante do cultivo em meio caldo batata dextrose.

EBsob - YPD - Extrato bruto do sobrenadante do cultivo em meio de extrato de levedura peptona dextrose.

EF1 - Translation Elongation Factor 1-alpha.

EM - Espectrometria de massas.

ETPs - Epipolítiodioxopiperazinas.

FM - Fórmula molecular

GenBank - Genetic Sequence Database.

GLASS - Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System.

IES - Ionização por eletrospray.

IR - Índice de retenção.

ITS - Internal Transcribed Spacer - Espaçador Transcrito Interno.

LAPNEM - Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas

MEB - Meio de extrato de malte

MIC - Concentração inibitória mínima.

MIN - Minutos

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MTT - Brometo de tiazolil azul tetrazólio

NI - Não identificado

OMS - Organização Mundial da Saúde

OSMAC - *One Strain Many Compounds*

PDB - Meio caldo batata dextrose

PN - Produtos naturais

Prof. - Professor

Prof.^a - Professora

Q-TOF - analisador quadruplo e tempo de voo em sequência

RAM - Resistência antimicrobiana

rDNA - DNA ribossomal

TEF-1 α - *Translation Elongation Factor 1- α* - Fator de alongamento da tradução 1- α

TIC - Cromatograma de íons totais.

TR - Tempo de retenção

YPD -Meio caldo de extrato de levedura peptona dextrose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ANTIBACTERIANOS: PANORAMA ATUAL E A BUSCA POR NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	15
2.2 PRODUTOS NATURAIS E MICRORGANISMOS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	16
2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS: RELEVÂNCIA ECOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA .	17
2.4 ANÁLISE CINÉTICA E ESTRATÉGIA <i>One Strain Many Compounds</i> (OSMAC)....	18
2.5 GÊNERO <i>Penicillium</i>	19
2.5.1 <i>Penicillium cataractarum</i>	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO	24
4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO 5IP2F4	24
4.3 PREPARAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO PARA ANÁLISE CINÉTICA.....	24
4.4 ESTRATÉGIA DE CULTIVO <i>ONE STRAIN MANY COMPOUNDS</i> (OSMAC)	25
4.5 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO	25
4.6 ANÁLISES QUÍMICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ARRANJO DE DIÓDOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-DAD-EM)	26
4.7 ANÁLISES QUÍMICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	26
4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. ANÁLISE CINÉTICA DA SECREÇÃO DE METABÓLITOS	28

5.2. RENDIMENTO DOS CULTIVOS E EXTRATOS.....	30
5.3 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA A GÁS (CG).....	33
5.4 TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	37
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS	40
ANEXO 1.....	45

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas constituem um dos principais desafios da saúde pública atual, sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade em diferentes contextos clínicos. Esse cenário tem se agravado nos últimos anos devido ao aumento da resistência bacteriana, o que compromete a eficácia dos tratamentos disponíveis e limita as opções terapêuticas (Organização Mundial da Saúde, 2022; Privalsky *et al.*, 2021). A crescente ineficácia dos antibacterianos convencionais, causada principalmente pelo uso indiscriminado e pela rápida adaptação dos microrganismos a esses recursos terapêuticos, tem impulsionado a busca por novas moléculas bioativas com potencial terapêutico (Theuretzbacher *et al.*, 2020; Atanasov *et al.*, 2021). Nesse cenário, os produtos naturais têm se destacado historicamente como uma fonte relevante de compostos farmacologicamente ativos, desempenhando um papel central no desenvolvimento de antibióticos desde a descoberta da penicilina (Newman; Cragg, 2020; Tiwari; Bae, 2022).

A biodiversidade brasileira, especialmente em ecossistemas singulares como o Pantanal Sul-mato-grossense, oferece um potencial biotecnológico ainda pouco explorado. As condições ambientais extremas desse bioma favorecem a adaptação de seus organismos que, para sobreviverem aos estresses bióticos e abióticos, desenvolvem sofisticados mecanismos bioquímicos, refletidos na produção de metabólitos secundários com funções ecológicas e bioativas (Coertjens; Mascarenhas; Batistote, 2025; Marengo *et al.*, 2021). Entre esses organismos, os fungos endofíticos se destacam como fontes promissoras de compostos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas, evidenciando sua relevância tanto para a biotecnologia quanto para a descoberta de novos fármacos (Specian *et al.*, 2014; Senanayake *et al.*, 2020).

Diante do avanço da resistência antimicrobiana e da escassez de novos antibacterianos no mercado, torna-se urgente a investigação de alternativas sustentáveis e inovadoras. Neste contexto, o gênero *Penicillium* se destaca por sua elevada capacidade biossintética, tendo sido responsável por avanços históricos na medicina, como a descoberta da penicilina (Zhang *et al.*, 2022). Contudo, espécies menos estudadas, como *Penicillium cataractarum*, especialmente quando associadas a hospedeiros de biomas únicos como o Pantanal, podem representar fontes alternativas de metabólitos bioativos com ação antimicrobiana (Wu *et al.*, 2018; Karthika, 2022; Coertjens; Mascarenhas; Batistote, 2024).

Diante desse panorama, este trabalho tem como objetivo otimizar a produção de metabólitos com potencial antibacteriano pelo fungo endofítico *Penicillium cataractarum*

5IP2F4, isolado de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae), com aplicação da análise cinética de secreção de compostos extracelulares e a estratégia *One Strain Many Compounds* (OSMAC) como ferramentas para maximizar a produção e a diversidade de metabólitos secundários.

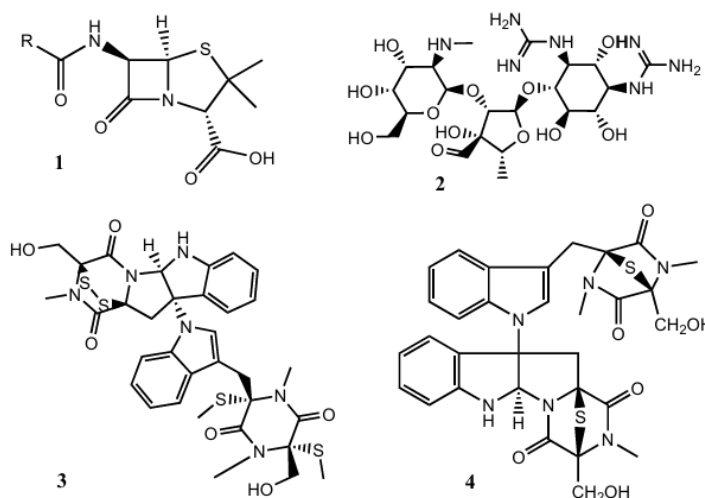
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTIBACTERIANOS: PANORAMA ATUAL E A BUSCA POR NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

As infecções bacterianas permanecem entre as principais causas de morbimortalidade global, impactando sistemas de saúde e gerando custos elevados, especialmente em países de média e baixa renda (Murray *et al.*, 2022). A lista de patógenos bacterianos prioritários da Organização Mundial da Saúde mostra que patógenos de alta prevalência, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, são responsáveis por milhões de casos anuais, reforçando a necessidade urgente de terapias mais eficazes e acessíveis (OMS, 2024).

Apesar da relevância clínica dessas infecções, o desenvolvimento de novos antibacterianos permanece limitado, com poucas classes inovadoras introduzidas nas últimas décadas (Theuretzbacher *et al.*, 2020). Relatórios recentes da OMS indicam que o número de substâncias em investigação clínica reduziu de 97 em 2023 para 90 em 2025; dentre essas, cerca de 83% correspondem a modificações de agentes já existentes, e apenas 15 compostos apresentam estrutura e mecanismos de ação inéditos (OMS, 2025). Esse cenário evidencia que, mesmo diante de iniciativas globais de incentivo à inovação, a ampliação das alternativas terapêuticas disponíveis continua insuficiente.

Entre os fármacos derivados de produtos naturais, os antibacterianos se destacam por seu impacto histórico na medicina moderna e por seu papel na preservação da saúde humana e importância contínua diante da crescente ameaça da Resistência Antimicrobiana (RAM). A penicilina **(1)** e a estreptomicina **(2)** (**Figura 1**) são exemplos clássicos de PN com ação antibacteriana que revolucionaram a prática clínica, em contrapartida, investigações mais recentes envolvendo metabólitos produzidos por fungos endofíticos revelaram compostos de interesse nesta área. A quetocoquina **C (3)** e as quetominas **(4)** (**Figura 1**), pertencentes à classe das epipolítiodioxopiperazinas (ETPs), têm demonstrado resultados promissores frente a cepas patogênicas humanas, embora ainda em fase de pesquisa (Eshboev *et al.*, 2024). Apesar desses avanços, a descoberta de novos antibacterianos têm diminuído cada vez mais, enquanto o número de bactérias resistentes cresce substancialmente, configurando um dos maiores desafios enfrentados pela pesquisa farmacêutica atual (Privalsky *et al.*, 2021).

Figura 1: Estrutura de antibacterianos derivados de produtos naturais.

Dados do relatório *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS), publicado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) em 2022, mostram taxas alarmantes de resistência entre patógenos bacterianos no mundo todo. A resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) e à cefalosporina de terceira geração em *Escherichia coli* já supera um terço dos casos reportados, dificultando o tratamento de infecções rotineiras. Como consequência, observa-se maior dependência de antibióticos de última linha para o tratamento eficaz, como os carbapenêmicos, cuja eficácia também vem sendo comprometida em várias regiões do mundo (Tacconelli *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, marcado pela emergência de cepas resistentes e pela escassez de novos antibacterianos, cresce o interesse pela prospecção de compostos naturais com ação antimicrobiana (Atanasov *et al.*, 2021). Entre esses, destacam-se os metabólitos produzidos por microrganismos, especialmente fungos e bactérias, que desempenham papel fundamental na descoberta de novos agentes terapêuticos.

2.2 PRODUTOS NATURAIS E MICRORGANISMOS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os produtos naturais (PN) representam uma das principais fontes de moléculas bioativas empregadas na medicina moderna e na biotecnologia. Estima-se que mais de 60% dos medicamentos atualmente disponíveis tenham origem direta ou indireta nesses compostos, o que evidencia o papel essencial da biodiversidade como recurso para inovação terapêutica (Newman; Cragg, 2020).

A bioprospecção de novas substâncias tem sido impulsionada por abordagens integrativas que combinam genômica, metabolômica e química de produtos naturais, ampliando

a exploração do potencial metabólico de uma vasta variedade de organismos (Atanasov *et al.*, 2021). Entre esses organismos, os microrganismos se destacam como fontes ainda subexploradas de diversidade química, especialmente por possuírem rotas biossintéticas altamente especializadas, responsáveis pela síntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras (Atanasov *et al.*, 2021; Tiwari; Bae, 2022). Como exemplo, a *Saccharopolyspora erythraea* biossintetiza a eritromicina A, um antibiótico poliketídico precursor dos macrolídeos utilizados clinicamente (Pham *et al.*, 2019).

Além da relevância clínica desses metabólitos, a produção microbiana oferece vantagens tecnológicas significativas. Em comparação aos compostos obtidos de plantas ou organismos superiores, os metabólitos microbianos apresentam maior facilidade de escalonamento em biorreatores, a possibilidade de modulação de rotas biossintéticas e de modificação genética para otimização do rendimento (Park *et al.*, 2018; Qin; Dong, 2023).

A ampla funcionalidade dos metabólitos produzidos por microrganismos reforça seu papel como fonte estratégica de substâncias com aplicação farmacológica (Newman; Cragg, 2020; Coertjens; Mascarenhas; Batistote, 2024). Esse cenário tem impulsionado a investigação de grupos microbianos ainda mais específicos, como os fungos endofíticos, considerados especialmente promissores para a descoberta de novos compostos bioativos.

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS: RELEVÂNCIA ECOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA

Os fungos endofíticos são microrganismos simbióticos que colonizam tecidos vegetais sem causar danos aparentes ao hospedeiro, estabelecendo interações altamente especializadas e adaptadas ao ambiente vegetal (Senanayake *et al.*, 2020; Fadiji; Babalola, 2020). Esses organismos estão distribuídos em diferentes partes da planta, como raízes, caules e folhas, sendo reconhecidos por sua notável capacidade de sintetizar diversos metabólitos bioativos como, por exemplo, ácidos fenólicos, alcaloides, quinonas, esteroides, saponinas, taninos e terpenóides (Specian *et al.*, 2014).

A versatilidade metabólica desses fungos está diretamente relacionada às condições e estímulos presentes no ambiente da planta hospedeira. A simbiose entre fungo e planta envolve uma rede complexa de interações químicas e fisiológicas que modulam o metabolismo de ambos os organismos, influenciando a diversidade e o perfil dos metabólitos produzidos. Nesse contexto, os mecanismos de ação dos endófitos podem ocorrer de forma direta, quando o microrganismo biossintetiza substâncias capazes de, por exemplo, inibir o crescimento de patógenos, ou de forma indireta, por meio da modulação das respostas imunológicas da planta

e da indução de vias metabólicas associadas à resistência sistêmica (Fadiji; Babalola, 2020).

Como consequência, os endófitos contribuem para o aumento da resiliência vegetal a estresses bióticos e abióticos, desempenhando papel essencial na proteção contra fitopatógenos, variações climáticas e outros fatores adversos (Zhang *et al.*, 2019; Anand *et al.*, 2023). Paralelamente, os compostos sintetizados por esses fungos têm despertado interesse crescente nas áreas farmacológica e biotecnológica. A griseofulvina, produzida por espécies de *Penicillium* sp., é um exemplo de metabólito com ação antifúngica, antibacteriana e potencial anticancerígeno e antiviral (Aris *et al.*, 2022).

Estudos recentes reforçam esse potencial de fungos endofíticos como produtores de substâncias antibacterianas. Por exemplo, o extrato do endófito *Talaromyces wortmannii* apresenta forte atividade contra bactérias Gram-positivas *Propionibacterium acnes* (MIC 3,9 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (MIC 7,8 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (MIC 7,8 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MIC 15,7 µg/mL), enquanto alcaloides isolados de *Penicillium brocae* exibiram atividade antifúngica e antibacteriana superior aos controles positivos comparados (Caruso *et al.*, 2022).

O conjunto dessas evidências revela que os endófitos constituem uma área promissora para a bioprospecção de substâncias antimicrobianas, posicionando-os como agentes valiosos na descoberta de moléculas com aplicações relevantes em inovação biotecnológica e saúde humana. Contudo, muitas vias biossintéticas permanecem silenciadas em condições padrões de cultivo, o que reforça a importância de estratégias específicas para a indução metabólica, como a abordagem OSMAC (Song *et al.*, 2024).

2.4 ANÁLISE CINÉTICA E ESTRATÉGIA *One Strain Many Compounds* (OSMAC)

Nas últimas décadas, diversas abordagens foram desenvolvidas para melhorar a produção e o rendimento de metabólitos bioativos obtidos de microrganismos. Entre essas estratégias, destaca-se a abordagem OSMAC, que consiste na modulação de fatores ambientais e fisiológicos durante o cultivo, como composição do meio, pH, temperatura, iluminação e agitação, com o objetivo de induzir diferentes vias biossintéticas e ampliar a diversidade química produzida por uma única cepa (Pan *et al.* 2019; Ferreira; Cruz; Hamerski, 2022).

Em fungos endofíticos, a estratégia OSMAC tem se mostrado eficaz na revelação de metabólitos que não seriam naturalmente expressos em condições padrão de cultivo, consolidando-se como uma ferramenta simples e valiosa na prospecção de novas moléculas com atividade antimicrobiana (Pan *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2024).

Além da modulação do meio de cultivo, a análise cinética da produção metabólica

representa outro elemento fundamental para otimizar a produção de compostos bioativos. Essa técnica consiste no monitoramento temporal da produção de metabólitos, permitindo identificar o período de maior acúmulo de compostos de interesse (Crispim, 2015; Singh; Kaur, 2025). A partir da coleta de amostras em diferentes tempos de cultivo, é possível determinar o pico de produção de metabólitos secundários, correlacionar o crescimento fúngico à biossíntese dos compostos e selecionar o tempo ideal para a extração (Chioma; Abu; Agwa, 2021).

Quando associada à estratégia OSMAC, a análise cinética amplia significativamente as possibilidades de exploração do potencial metabólico dos fungos endofíticos, favorecendo tanto a otimização do rendimento quanto a descoberta de novos compostos de interesse farmacológico (David, 2024). Nesse contexto, os resultados proporcionados pelo OSMAC, ao expandir a diversidade química acessada a partir de uma única cepa, tornam especialmente relevante o estudo de gêneros como *Penicillium* sp., cuja versatilidade metabólica tem historicamente contribuído para a identificação de moléculas bioativas.

2.5 GÊNERO *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos, ocupando uma posição de destaque por seu papel histórico na produção de antibióticos e sua elevada capacidade biossintética apresentada por suas espécies. O gênero possui distribuição mundial e está amplamente presente em diversos habitats, como solos, vegetação e produtos alimentícios. A classificação morfológica de espécies de *Penicillium* baseia-se nos padrões de ramificação dos conidióforos, estruturas responsáveis pela formação de esporos (conídios), que apresentam ramificações características nas diferentes espécies (Visagie *et al.*, 2014, 2016; Toghueo; Boyom, 2020; De Carvalho *et al.*, 2021).

Além da ampla diversidade taxonômica de *Penicillium*, atualmente com mais de 300 espécies de *Penicillium* descritas, também é importante destacar que os metabólitos secundários produzidos por essas espécies apresentam uma variedade de atividades biológicas, incluindo antifúngica, citotóxica, anticancerígena e antibacteriana (Toghueo; Boyom, 2020; De Carvalho *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). Compostos como o ácido micofenólico (5) (**Figura 2**), com ação imunossupressora amplamente empregada em terapias pós-transplante, e a lovastatina (6) (**Figura 2**), utilizada no controle de dislipidemias, reforçam o reconhecimento do gênero *Penicillium* como uma fonte promissora de compostos bioativos com aplicações terapêuticas e industriais (Mahmoudian *et al.*, 2021; Sadowska *et al.*, 2023).

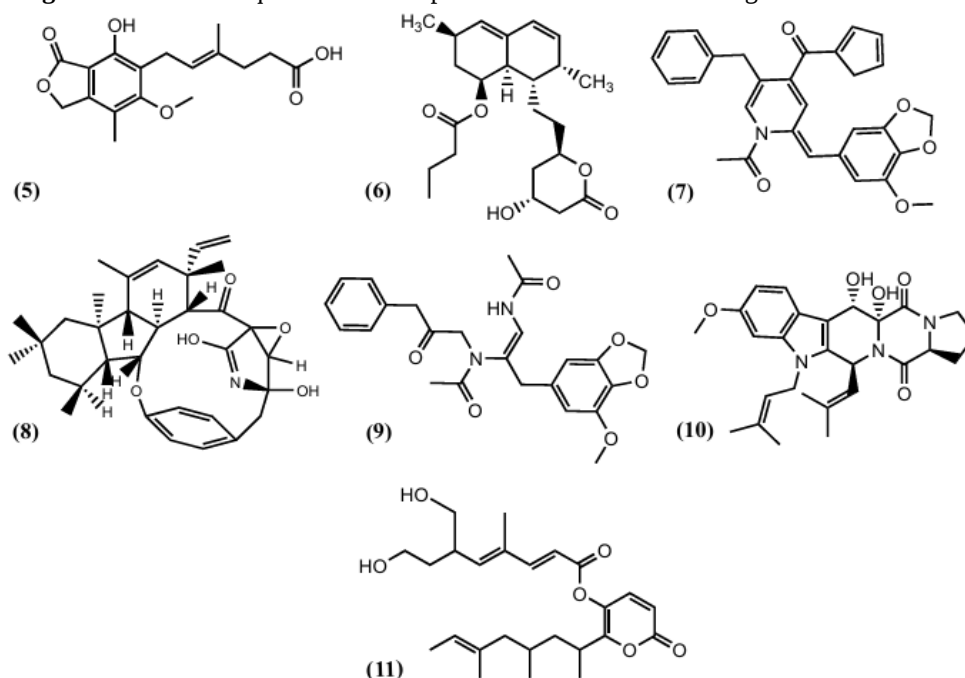
Além dos compostos com aplicações imunossupressoras e hipolipemiantes, diversas espécies de *Penicillium* são reconhecidas pela produção de substâncias bioativas contra

bactérias patogênicas. Como exemplos, podemos citar a brasiliamida J-a **(7)** (**Figura 2**), isolado de cultura sólida de *Penicillium janthinellum* SYPF 7899, a qual apresentou atividade inibitória contra *Bacillus subtilis* (MIC 15 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (MIC 18 µg/mL). Já o composto GKK1032C **(8)** (**Figura 2**), isolado de *Penicillium* sp. CPCC 400817, apresentou potente atividade contra MRSA (MIC 1,6 µg/mL) (Eshboev *et al.*, 2024).

A aplicação da estratégia OSMAC ao fungo endofítico *Penicillium* sp. 5MP2F4 demonstrou que variações simples no meio de cultivo são capazes de modular profundamente seu metaboloma, resultando na produção de 120 metabólitos, os quais foram observados a partir de extratos de biomassa micelial e sobrenadante. Neste trabalho, os meios de cultura líquido como Caldo de Batata Dextrose (PDB), Caldo de Extrato de Malte (MEB) e Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD) favoreceram a biossíntese de compostos com atividade antibacteriana, como os alcaloides brasiliamida A **(9)** e fumitremorgina B **(10)** (**Figura 2**). Os extratos das biomassas miceliais provenientes desses meios exibiram atividade contra *Staphylococcus aureus* com MIC de 16 µg/mL para os extratos obtidos a partir do cultivo nos meios PDB e MEB (Da Silva *et al.*, 2023).

Esses resultados evidenciam não apenas o potencial de estratégias voltadas à ativação de vias biossintéticas latentes, mas também sua relevância para a expansão da diversidade química em espécies de *Penicillium*, incluindo os endofíticos. Em conjunto, os dados também reforçam a importância dessas abordagens para ampliar as perspectivas de descoberta e/ou otimização da produção de novas moléculas bioativas.

Figura 2. Estruturas químicas de compostos bioativos descritos no gênero *Penicillium*.



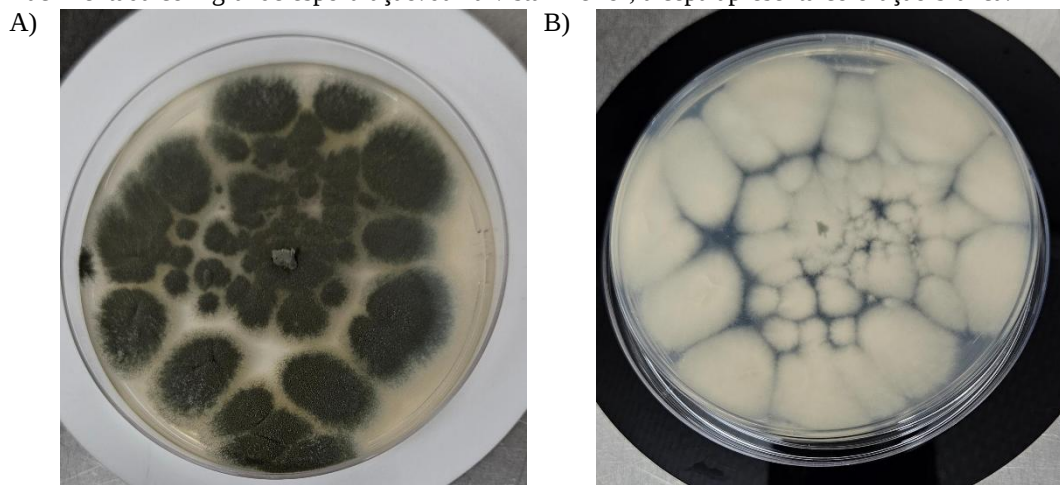
2.5.1 *Penicillium cataractarum*

Penicillium cataractarum é uma espécie do gênero *Penicillium* descrita em 2016 por Visagie, Malloch e Seifert (Visagie *et al.*, 2016). A nomenclatura desta espécie faz referência ao local onde foi originalmente isolada; as Cataratas do Niágara, em Ontário, Canadá (Visagie *et al.*, 2016). Embora ainda pouco abordada na literatura, essa espécie tem sido identificada em ambientes diversos, inclusive como endófito de plantas medicinais (Wu *et al.*, 2018; Karthika, 2022).

P. cataractarum tem sido identificado como um fungo endofítico capaz de produzir diacilglicerol (DAG) por meio de fermentação, demonstrando potencial para aplicações na produção industrial de lipídios (Xu *et al.*, 2023). Embora seu papel ecológico e sua distribuição ainda estejam em processo de elucidação, a espécie integra um grupo de *Penicillium* caracterizado por uma notável versatilidade metabólica. Essa diversidade bioquímica, comum entre espécies endofíticas do gênero, destaca o interesse biotecnológico em *P. cataractarum*, tanto pela capacidade de gerar metabólitos de relevância industrial quanto pelo potencial de revelar novas rotas biossintéticas associadas à sua interação com hospedeiros vegetais (Visagie *et al.*, 2016; Houbraken *et al.*, 2020).

No Brasil, o grupo de pesquisa LAPNEM (Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas - UFMS), tem se dedicado ao estudo dos fungos endofíticos como, por exemplo, de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) coletada no Pantanal sul-mato-grossense, um bioma marcado por elevada biodiversidade e condições ambientais únicas. Entre os isolados obtidos, o *P. cataractarum* 5IP2F4 (**Figura 3**) destacou-se em investigações preliminares por inibir o crescimento bacteriano e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC 43300 (Sanches, 2024), o que motivou sua seleção para estudos mais aprofundados sobre o seu potencial metabólico.

Figura 3: Vista superior (A) e inferior (B) da cepa fúngica isolada *P. cataractarum* 5IP2F4 cultivada em meio batata-dextrose e ágar (BDA). Na vista superior, observa-se um fungo filamentososo de coloração verde acinzentada com grande esporulação. Já na vista inferior, a cepa apresenta coloração branca.



A cepa *P. cataractarum* SYPF 7131, isolada de *Ginkgo biloba*, biossintetizou a rasfonina **(11)** (**Figura 2**), um policetídeo com significativa atividade antibacteriana contra *S. aureus* (MIC 10 µg/mL), comparável à ampicilina (MIC $\approx$ 8 µg/mL), antibiótico amplamente utilizado na prática clínica, além de ação antifúngica frente a *C. albicans* (MIC 20 µg/mL) e propriedades tumorais previamente descritas (Wu *et al.*, 2018). Esses achados demonstram que, apesar de pouco estudada, a espécie apresenta um repertório químico promissor.

Assim, a combinação entre a origem endofítica da cepa 5IP2F4, a singularidade do bioma de onde foi isolada e a evidência de metabólitos bioativos em outras linhagens da mesma espécie fortalece a justificativa para investigar seu potencial metabólico. Nesse contexto, a integração da análise cinética e da estratégia OSMAC torna-se fundamental para explorar vias sintéticas latentes e maximizar a diversidade de compostos produzidos por *P. cataractarum*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de metabólitos secundários visando à potencialização da atividade antibacteriana do fungo endofítico *Penicillium cataractarum* 5IP2F4, empregando estratégias de cultivo baseadas na abordagem OSMAC e análise cinética da secreção metabólica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar fungo endofítico *P. cataractarum* 5IP2F4 em meio líquido e acompanhar seu crescimento ao longo do tempo;
- Analisar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM), a produção de metabólitos por meio da avaliação da cinética de secreção de compostos extracelulares de *P. cataractarum* 5IP2F4;
- Cultivar o fungo *P. cataractarum* 5IP2F4 com modificação de condições de cultivo por meio de estratégia OSMAC;
- Obter os extratos de sobrenadante e da biomassa micelial a partir de cultivos em diferentes meios líquidos da cepa *P. cataractarum* 5IP2F4;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos por meio de ensaios de microdiluição;
- Anotar os compostos presentes nos extratos de *P. cataractarum* 5IP2F4.

4. METODOLOGIA

4.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO

A cepa fúngica *Penicillium cataractarum* 5IP2F4 foi mantida em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) em frascos inclinados e placas de Petri, sob condições assépticas, sendo periodicamente repicada para garantir a viabilidade da cultura. Para os experimentos de produção de metabólitos, o fungo foi cultivado em meio líquido, conforme detalhado na seção 4.3.

4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO 5IP2F4

A cepa fúngica 5IP2F4 foi submetida à identificação molecular. Esse processo foi realizado pela empresa *GoGenetic* (Paraná, Brasil) por meio do sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS, do inglês: Espaçador Transcrito Interno) e do gene *Translation Elongation Factor 1-alfa* (TEF-1alfa, do inglês: Fator de Alongamento da Tradução 1-alfa) do *Ribosomal Deoxyribonucleic Acid* (rDNA, do inglês: Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal). Para esse procedimento, foram utilizados os iniciadores (primers) ITS-1 (sentido *forward*), ITS-4 (sentido *reverse*) e EF1. As sequências obtidas foram então comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank (*Genetic Sequence Database*) utilizando-se a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides*). O laudo de análise está ilustrado no ANEXO I e a cepa foi identificada como *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

4.3 PREPARAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO PARA ANÁLISE CINÉTICA

O cultivo de *P. cataractarum* 5IP2F4 foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de caldo batata dextrose (PBD), em condições estáticas, no escuro e à temperatura de 28 °C, mantidos em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand – Demanda Biológica de Oxigênio) por 29 dias. O cultivo foi realizado em triplicata. Quatro fragmentos miceliais de 5mm, cultivados em BDA foram adicionados ao meio para iniciar o cultivo. Diariamente, foram coletadas amostras de 1mL, em duplicata, do sobrenadante de cada cultivo e congeladas em temperatura entre -18°C e -25°C para análise posterior dos compostos extracelulares por CLAE-DAD-EM, conforme detalhado na seção 4.6. Com base nesses dados, identificou-se o tempo para a finalização do cultivo e a produção dos extratos, considerando o maior rendimento e os compostos anotados.

4.4 ESTRATÉGIA DE CULTIVO *ONE STRAIN MANY COMPOUNDS* (OSMAC)

O cultivo do *P. cataractarum* 5IP2F4 foi realizado em três meios de cultura: caldo batata dextrose (PDB, *Potato Dextrose Broth*), levedura peptona dextrose (YPD, *Yeast Peptone Dextrose*) e o caldo Czapek Dox (CZA). O cultivo foi realizado sob condições estáticas, na ausência de luz, a 28 °C por 22 dias e em quadruplicata para meio. Para a inoculação nestes meios líquidos, quatro fragmentos miceliais de 5mm de diâmetro previamente cultivados em meio sólido de BDA foram adicionados ao meio para iniciar o cultivo. Uma amostra de cada meio, sem inóculo fúngico foi mantida nas mesmas condições como controle (branco).

4.5 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO

Após o período de incubação nos meios líquidos utilizados no OSMAC, o cultivo foi submetido à filtração para separação do micélio e do sobrenadante. Este último foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila contendo 0,5% de ácido fórmico. A fase orgânica obtida foi então concentrada sob pressão reduzida e posteriormente seca, resultando no extrato bruto do sobrenadante (EBsob). A amostra do meio de cultivo sem o inóculo foi processada do mesmo modo, sendo utilizada como controle (branco) para as análises posteriores.

A biomassa micelial separada por filtração foi triturada, liofilizada e submetida à extração com uma mistura de acetato de etila e metanol 1:1 (v/v) com adição de 0,5% de ácido fórmico, na proporção de 10 mL da solução extratora para cada 1 g de biomassa micelial. O processo de extração foi realizado em banho de ultrassom por 10 min, sendo realizado três ciclos com um novo solvente extrator, os quais foram reunidos. Esses extratos foram filtrados, concentrados sob pressão reduzida e posteriormente secos para a obtenção dos extratos brutos da biomassa micelial (EBmic).

Os extratos brutos do micélio (EBmic) obtidos foram posteriormente submetidos a uma etapa de extração líquido-líquido com hexano, com o objetivo de remover compostos lipofílicos presentes na matriz. Cada amostra foi solubilizada em 30 mL de metanol e água 9:1 (v/v), com o auxílio de um banho ultrassom (Elma E 30 H Elmasonic) a 40 °C. Em seguida, procedeu-se à extração líquido-líquido com hexano frio. As fases hexânica e hidrometanólica obtidas foram armazenadas separadamente e secas através de evaporação do solvente, resultando em fração hexânica do extrato bruto de micélio (EBmic-Hx) e fração hidrometanólica do extrato bruto de micélio (EBmic – Me).

4.6 ANÁLISES QUÍMICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-DAD-EM)

As amostras provenientes da análise cinética foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM), utilizando um sistema UFLC (Shimadzu, Tóquio, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics), equipado com ionização por eletrospray (IES) e analisador Q-TOF. As análises foram realizadas utilizando a coluna Kinetex C18 (2,6 μm , 150 x 2,1 mm, Phenomenex).

As amostras do cultivo em meio líquido de PDB foram previamente centrifugadas e filtradas em filtros seringa com membranas PTFE de 0,22 μm (Millipore Millex) e transferidas para vials para injeção automática. As separações cromatográficas foram realizadas a 0,3 mL/min e 50°C. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição empregado foi: 0–2 min (3% B), 2–25 min (3–25% B), 25–40 min (25–80% B) e 40–43 min (80% B). As análises de EM e EM/EM foram realizadas no modo de ionização positivo e para EM/EM aplicou-se o método automático de fragmentação com energia de colisão entre 45 e 65 eV. Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão, de secagem e de nebulização. Os dados brutos foram processados inicialmente no software DataAnalysis, versão 4.2 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

Como padrão interno, foi utilizado o ácido cafeico na concentração 0,025 mg/mL. Os valores obtidos foram utilizados como referência para a normalização das áreas integradas dos picos cromatográficos anotados na amostra.

4.7 ANÁLISES QUÍMICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Os extratos hexânicos obtidos a partir dos extratos brutos das biomassas miceliais (EBmic-Hx) de *P. cataractarum* 5IP2F4 foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Para as análises de CG-EM, um cromatógrafo a gás Shimadzu QP2010 equipado com auto injetor COA-20i e coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) foram utilizados. O gás de arraste foi o Hélio e a temperatura de injeção foi 250°C, seguindo o seguinte gradiente de temperatura: 60–240°C com aumento de 3°C·min⁻¹, 240–310°C com aumento de 5°C·min⁻¹ e manutenção a 310°C por 10 minutos (isotérmico). As amostras foram preparadas a 4 mg/mL e 1 μL foi injetado no sistema cromatográfico utilizando o modo *split* e com proporção de *split*

1:10.

A identificação dos compostos foi realizada por comparações com bibliotecas NIST, WILEY, FFNSC e índices de retenção calculados a partir da injeção de série homóloga de alcanos (C8-C40) comparados com a literatura (Adams, 2007).

4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos extratos brutos dos sobrenadantes (EBsob) hidrometanólicos oriundos dos extratos brutos das biomassas miceliais (EBmic-Me) foi avaliada por meio de ensaio de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços de fundo chato. Cada poço recebeu 100 µL de meio de cultura líquido, contendo os extratos EBmic-Me e EBSob em concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL para a determinação do percentual de inibição do crescimento bacteriano.

Para a análise, foram utilizadas cepas Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 14458) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25904), preservadas e cultivadas em meios de cultura ágar e caldo (Mueller-Hinton ou BHI - Brain Heart Infusion). Foram adicionados 100 µL do inóculo bacteriano, previamente ajustado ao padrão 0,5 da escala de McFarland, às placas. A gentamicina, antibiótico que possui eficácia comprovada, foi utilizada como controle positivo nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL e o controle negativo consistiu no meio de cultura com a adição do inóculo sem tratamentos. Os ensaios foram realizados em triplicata, e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após a incubação, foi adicionada a cada poço uma solução de Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT), seguida de incubação adicional de 2 h a 37 °C. A interpretação dos resultados foi realizada por meio de leitura espectrofotométrica em 540nm (leitor multimodo de imagem celular Cytation 5, Agilent BioTek) e pela mudança visual de cor nos poços, com a presença de coloração roxa indicando viabilidade bacteriana.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE CINÉTICA DA SECREÇÃO DE METABÓLITOS

A análise cinética de secreção de metabólitos secundários foi realizada para determinar o período de maior acúmulo de compostos bioativos produzidos pelo fungo endofítico *P. cataractarum* 5IP2F4 ao longo de 29 dias de cultivo. Esse tipo de análise é fundamental para compreender o comportamento metabólico do microrganismo e identificar o ponto de máxima produção, etapa essencial para a otimização de processos biotecnológicos e definição das condições ideais de cultivo (David, 2024).

Para interpretação dos resultados, alguns compostos foram anotados e selecionados para o monitoramento de sua produção no meio extracelular do cultivo de *P. cataractarum* 5IP2F4, os quais encontram-se descritos na **Tabela 1** e suas estruturas químicas são apresentadas na **Figura 4**. As análises realizadas por CLAE-DAD-EM permitiram a detecção de 51 compostos distintos, dos quais quatro se destacaram pela elevada intensidade dos picos cromatográficos, sendo, portanto, selecionados para acompanhamento temporal.

Os compostos **1-4** foram anotados como dipeptídeos do tipo dicetopiperazinas como ciclo prolil-valina (**1**), ciclo hidroxiprolil-leucina (**2**), ciclo tirosil-prolina (**3**) e ciclo prolil-(iso)leucina (**4**). Os compostos **1**, **2** e **4** não apresentaram absorções nos espectros de UV, caracterizando a ausência de cromóforo, sendo que eles apresentaram íons protonados de m/z 197,1301, 227,1392 e 211,1434, enquanto que para o composto **3** foi observado o íon m/z 261,1256 $[M+H]^+$.

Essas dicetopiperazinas anotadas têm sido descritas para espécies do gênero *Penicillium* (Capon *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Wang, Cui, Li, 2016), porém para a espécie *P. cataractarum* essas estão sendo relatadas pela primeira vez. Essas substâncias são frequentemente associadas a atividades biológicas como ação antimicrobiana e antioxidante, além de atuarem na sinalização química entre microrganismos (Tian *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2023).

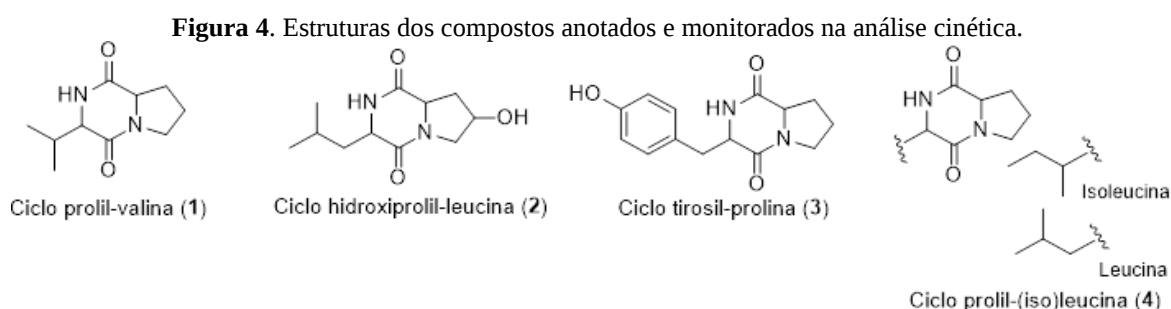


Tabela 1: Compostos anotados a partir das análises dos sobrenadantes por CLAE-DAD-EM.

Pico	TR (min)	Composto	FM	Positivo [M+H] ⁺ (m/z)
1	11,7	Ciclo prolil-valina (ciclo Pro-Val)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	197,1301
2	12,5	Ciclo hidroxiprolil-leucina (ciclo hiPro-Leu)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	227,1392
3	14,4	Ciclo tirosil-prolina (ciclo Tir-Pro)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	261,1256
4	15,4	Ciclo prolil-(iso)leucina (ciclo-Pro-Ile ou Pro-Leu)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	211,1434

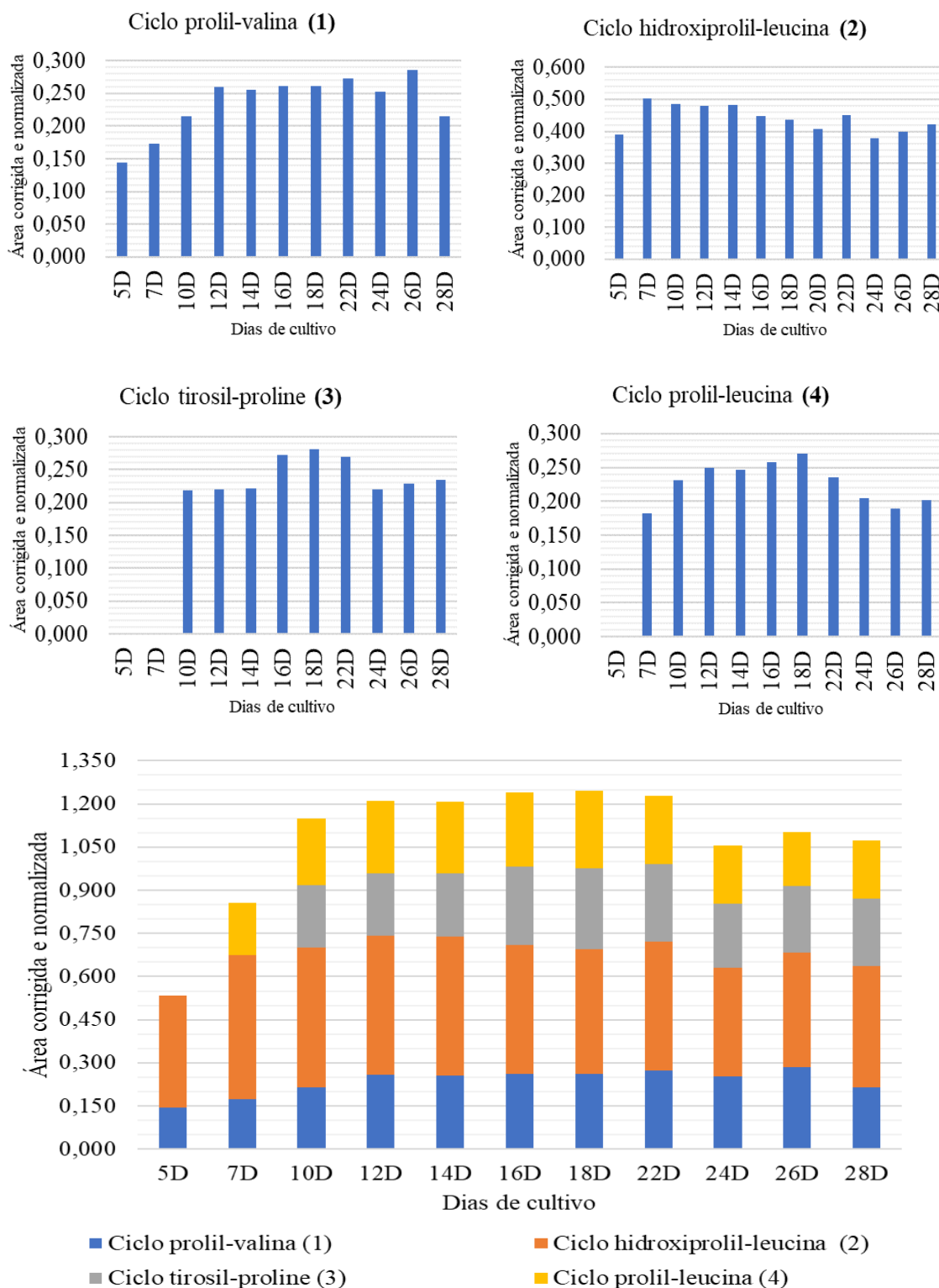
TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular

A **figura 5** apresenta a variação da intensidade das dicetopiperazinas **1-4** ao longo do período de cultivo em meio caldo de batata dextrose (PDB). Essas análises permitiram avaliar a dinâmica de biossíntese e a liberação dos compostos produzidos pelo fungo. Observou-se um acúmulo progressivo de metabólitos extracelulares da produção de metabólitos até o 22º dia (22D), seguida por um declínio nos dias subsequentes, sugerindo que esse período corresponde ao ponto máximo de liberação extracelular das dicetopiperazinas **1-4**. Esse comportamento é consistente com o padrão metabólico de fungos filamentosos, em que a síntese de metabólitos secundários ocorre na transição da fase final de crescimento exponencial e o início da fase estacionária. A queda observada após o 22º dia pode estar associada a diferentes processos fisiológicos, incluindo a degradação enzimática dos próprios metabólitos, comum em cultivos prolongados, alterações no pH e na composição do meio que impactam estabilidade e extração dos compostos, bem como a reaquisição dos metabólitos pelo micélio como fontes alternativas de energia em ambientes de escassez e a regulação negativa das vias biossintéticas, à medida que o sistema retorna a um estado de equilíbrio metabólico (Pan *et al.*, 2019; David, 2024).

As dicetopiperazinas observadas ao longo do cultivo é uma importante determinação, uma vez que essas moléculas estão frequentemente associadas a mecanismos de sinalização química, como *quorum sensing* e interação microbiana (Wang *et al.*, 2023). A persistência desses compostos até o final da fase estacionária sugere que *P. cataractarum* mantém, ao menos parcialmente, suas rotas biossintéticas ativas mesmo após atingir seu limite de crescimento, o que pode indicar um papel ecológico importante desses metabólitos no ambiente natural da espécie.

Portanto, com base nesses resultados, o período correspondente ao dia 22 de cultivo foi identificado como o ponto de maior atividade biossintética, representando o momento ideal para a coleta e posterior otimização da produção de metabólitos secundários através da estratégia OSMAC.

Figura 5: Gráfico da cinética de liberação de metabólitos do dia 05 ao 28 de crescimento fúngico, com a variação da intensidade das dicetopiperazinas 1-4 ao longo do período de cultivo.



5.2. RENDIMENTO DOS CULTIVOS E EXTRATOS

O cultivo do fungo *Penicillium catarractarum* 5IP2F4 foi realizado nos meios PDB, YPD e CZA durante 22 dias a 28 °C. Os mesmos apresentaram variações no aspecto visual e na biomassa do micelial produzidos, demonstrados respectivamente nas **figuras 6 e 7**. É possível

observar que o meio YPD produziu uma maior massa micelial, seguido do caldo PDB, que apresentou um desenvolvimento significativo do micélio. Dos meios utilizados, o cultivo em CZA foi o que apresentou menor crescimento do micélio.

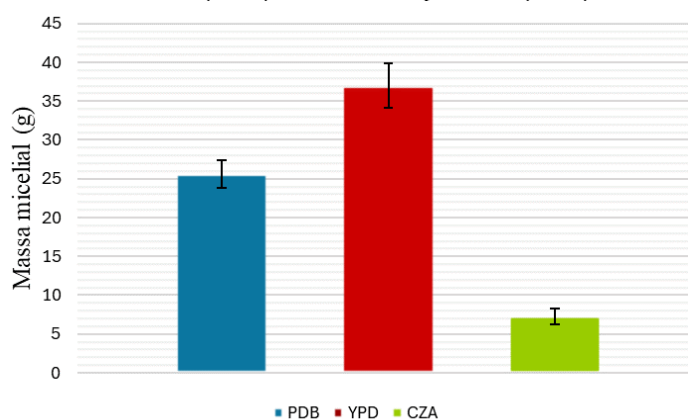
Quanto ao aspecto, tanto o micélio do cultivo em PDB quanto o do cultivo em YPD apresentaram estrutura semirrígida e rugosa, com superfície externa branca e esporulada. Já o meio CZA produziu um micélio mais frágil e gelatinoso.

O elevado crescimento observado no YPD pode ser explicado pela presença de extrato de levedura e peptona, que fornecem uma fonte rica e complexa de nitrogênio, vitaminas e aminoácidos facilmente assimiláveis, favorecendo tanto o crescimento celular quanto a síntese de metabólitos. Em contraste, o meio CZA, menos complexo, forneceu condições nutricionais mais restritas, resultando em menor produção de micélio e um aspecto morfológico distinto, com micélio mais frágil e gelatinoso. Esse comportamento sugere que *P. cataractarum* modula sua estrutura micelial em função da disponibilidade e qualidade dos nutrientes, possivelmente como estratégia de adaptação fisiológica.

Figura 6 – *Penicillium cataractarum* 5IP2F4 cultivado nos meios de cultivo caldo batata dextrose (PDB) (A), levedura peptona dextrose (YPD) (B) e caldo Czapek Dox (CZA) (C).



Figura 7 – Massa micelial obtidas no cultivo em meio líquido de caldo batata dextrose (PDB), levedura peptona dextrose (YPD) e o caldo Czapek Dox (CZA).



Após 22 dias de cultivo nos meios PDB, YPD e CZA, foram realizadas as extrações a partir do micélio e sobrenadante. Os rendimentos dos extratos obtidos estão descritos na **tabela 2**. Assim, o cultivo de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4 em PDB, YPD e CZA evidenciou diferenças marcantes no comportamento fisiológico e no potencial metabólico do fungo em resposta à composição nutricional dos meios utilizados. A disponibilidade e a qualidade das fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes influenciaram diretamente o crescimento micelial, a morfologia do fungo e o rendimento dos extratos obtidos do sobrenadante (EBsob) e da biomassa micelial (EBmic).

Tabela 2 – Massa e rendimentos dos extratos brutos de sobrenadante (EBsob) e da biomassa micelial (EBmic).

Meio	EBsob		EBmic		
	Massa média dos extratos brutos de sobrenadante (mg)	Rendimento (mg/L)	Massa média dos extratos brutos de micélio (mg)	Rendimento % (m/m)	Rendimento (mg/L)
PDB	15,62±3,46	52,07±11,53	292,77±57,23	1,11	975,90
YPD	30,31±3,97	101,05±13,22	456,31±30,47	1,21	1521,03
CZA	19,91±5,71	66,37±19,05	129,14±35,47	1,48	430,46

Ao considerar o rendimento em massa média, o meio YPD (30,31 mg) apresentou maior massa de extrato bruto de sobrenadante (EBsob), seguido pelo meio CZA (19,91 mg) e PDB (15,62 mg). Considerando o rendimento relativo (mg/L) essa classificação se mantém, com o meio PDB (52,07 mg/L) apresentando o menor rendimento quando comparado aos meios CZA (66,37 mg/mL) e YPD (101,05 mg/mL). Essa maior produtividade no meio de cultivo YPD sugere que a abundância de nutrientes solúveis favoreceu a secreção de metabólitos extracelulares. Embora o meio CZA tenha gerado menor biomassa, seu rendimento intermediário de sobrenadante sugere que condições nutricionais mais limitadas podem induzir a secreção de metabólitos associados a estresse nutricional ou competição, característica comum em fungos que ativam vias biossintéticas específicas sob restrição de nitrogênio ou carbono. Ao analisar os rendimentos dos extratos brutos do micélio (EBmic), considerando o rendimento total (mg/L), o YPD ficou em evidência novamente (1.521,03 mg/L), seguido do meio PDB (975,9 mg/L) e do meio CZA (430,46 mg/L). Nota-se que apesar do meio CZA possuir o menor rendimento em massa média de EBmic (129,14 mg), ele apresentou maior rendimento relativo a sua massa 1,48% m/m, indicando também que *P. cataractarum* quando

cultivado sob limitações nutricionais podem concentrar quantidades proporcionalmente maiores de metabólitos no tecido micelial devido a à ativação de vias biossintéticas específicas como resposta ao estresse, um fenômeno frequentemente observado em estratégias OSMAC (Da Silva *et al.*, 2023), conforme citado anteriormente.

As diferenças observadas reforçam que a composição do meio exerce impacto decisivo na expressão metabólica de *P. cataractarum*. O meio YPD maximiza o crescimento e o rendimento absoluto, sendo interessante para produção em escala quando o objetivo é obter grande quantidade de biomassa ou extratos brutos. Por outro lado, meios mais restritivos, como CZA, podem ser úteis para estimular vias biossintéticas específicas, levando à produção proporcionalmente maior de certos metabólitos intracelulares, mesmo com menor biomassa total. Isso é especialmente relevante em estudos de bioprospecção de metabólitos secundários, nos quais a diversidade química pode ser mais importante do que a massa absoluta.

5.3 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA A GÁS (CG)

A partir dos extratos brutos das biomassas miceliais (EBmic) obtidas nos diferentes meios de cultura (PDB, YPD e CZA) utilizados no cultivo de *P. cataractarum*, foram obtidos as suas frações hexânicas por extração líquido-líquido com o intuito de separar os constituintes de natureza apolar. Essas frações hexânicas (EBmic-Hx) foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

As análises por CG-EM das frações hexânicas obtidas nos três meios de cultivo (CZA, PDB e YPD) revelaram diferenças significativas no perfil químico, tanto em identidade quanto em abundância relativa dos metabólitos. A fração hexânica obtida do extrato do micélio cultivado em CZA (EBmic-Hx-CZA) apresentou um perfil químico diversificado, composto majoritariamente por ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos insaturados, além de pequenas quantidades de esteróis e derivados (**Figura 8, Tabela 3**). Os principais compostos anotados foram o linoleato de metila (66,10%), oleato de metila (11,07%), linolato de etila (6,72%), oleato de etila (1,89%) e ergosterol (6,44%). Esse perfil indica que, em condições nutricionais mais restritivas (CZA), o fungo deposita uma quantidade relevante de lipídios insaturados esterificados, possivelmente associados à manutenção de fluidez de membrana e respostas adaptativas ao meio (Harayama; Antonny, 2023).

No cultivo em PDB, a fração hexânica do extrato da biomassa micelial (EBmic-Hx-PDB) exibiu uma mudança expressiva na composição com predominância quase absoluta de ergosterol, principal esterol de membrana dos fungos, o qual foi detectado em 85,83% (**Figura**

9, Tabela 4). Além dele, outros constituintes foram detectados em menores porcentagens relativas como linoleato de metila (5,23%), oleato de metila (5,83%) e os ésteres etílicos de linoleico e oleico (1,84% e 1,27%). Esses resultados mostram que o cultivo em meio PDB favorece fortemente a biossíntese de esteróis, refletindo um metabolismo voltado para o fortalecimento da membrana micelial.

Assim como no cultivo em meio PDB, o cultivo em meio YPD resultou na predominância de esteróis, especialmente ergosterol (92,58%), sendo também detectado em menores porcentagens relativas os ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos insaturados (1,12–1,80%), incluindo o linoleato de metila (1,80%), oleato de metila (1,52%) e oleato de etila (1,12%) (**Figura 10, Tabela 5**). A alta proporção de ergosterol em PDB e YPD reflete o metabolismo primário ativo, elevada taxa de divisão celular, necessidade de manutenção de integridade de membrana.

Portanto, os resultados obtidos demonstram de maneira clara que o meio de cultivo exerce impacto decisivo sobre o perfil lipídico apolar produzido pelo micélio de *P. cataractarum* 5IP2F4. A composição dos extratos hexânicos variou não apenas em abundância relativa, mas também no tipo de metabólitos priorizados em cada condição nutricional. O cultivo em meio CZA, um meio pobre em nutrientes, promoveu a maior diversidade de compostos apolares, incluindo ácidos graxos esterificados e derivados de esteróis. Esse comportamento sugere que o estresse nutricional pode induzir rotas alternativas de metabolismo lipídico, levando à acumulação de ésteres como forma de armazenamento ou modificação da estrutura de membrana para adaptação ambiental. Enquanto os meios mais ricos como PDB e YPD, favoreceram fortemente a produção de ergosterol, o que é fisiologicamente coerente, já que esses meios estimulam crescimento acelerado e aumentam a demanda por síntese de membranas. A presença majoritária de ergosterol indica um metabolismo voltado para proliferação micelial, o que se alinha com os maiores rendimentos de biomassa registrados nesses meios.

A predominância de compostos insaturados no cultivo em meio CZA pode estar associada a ajustes na fluidez de membrana para tolerância ao estresse, armazenamento de lipídios em condições de limitação de nutrientes, possível ativação de rotas secundárias de metabolização de ácidos graxos. A proporção de ácidos graxos insaturados nas membranas é um fator-chave para manter a fluidez e integridade da membrana sob condições adversas, sendo regulada por enzimas como as desaturases, cuja expressão aumenta em resposta ao estresse permitindo que a membrana permaneça funcional e flexível (Peng; Chen, 2024; Campanella; Rosa; Malavazi, 2025; Yu *et al.*, 2025).

Figura 8. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio CZA (EBmic-Hx-CZA) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

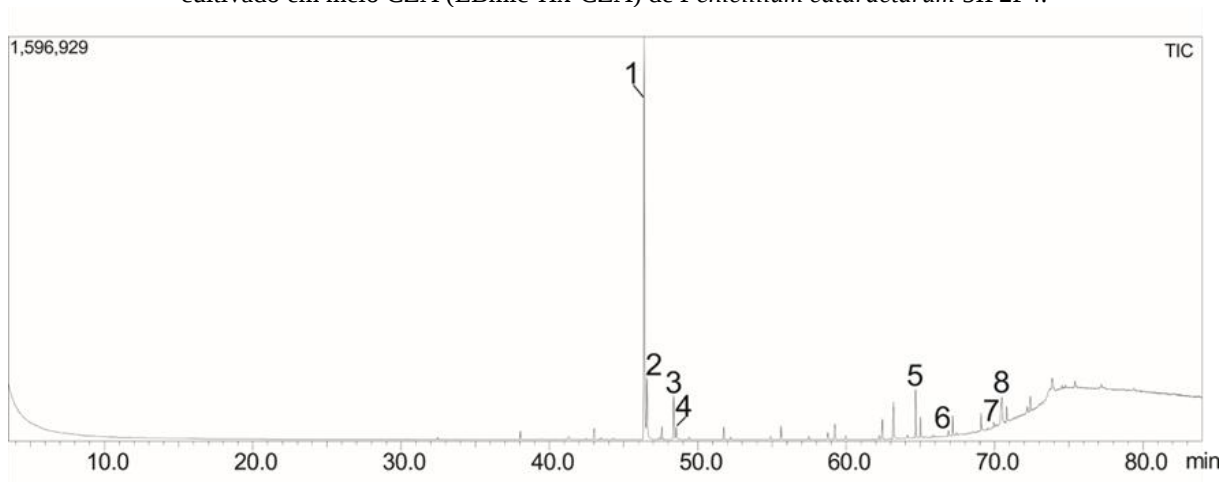


Tabela 3. Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio Czapek (EBmic-Hx-CZA) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Pico	TR (min)	IR	Composto	% relativa
1	46,38	2096	Octadecadienoato de metila (linoleato de metila)	66,10
2	46,57	2102	Octadecenoato de metila (oleato de metila)	11,07
3	48,37	2164	Octadecadienoato de etila (linolato de etila)	6,72
4	48,54	2170	Octadecenoato de etila (oleato de etila)	1,89
5	64,68	2779	NI	6,33
6	66,89	2858	NI (derivado do ergosterol)	0,69
7	69,95	2964	NI (derivado do ergosterol)	0,77
8	70,49	3018	Ergosterol	6,44

TR: Tempo de retenção; IR: índice de retenção; NI: não identificado.

Figura 9. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio PDB (EBmic-Hx-PDB) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

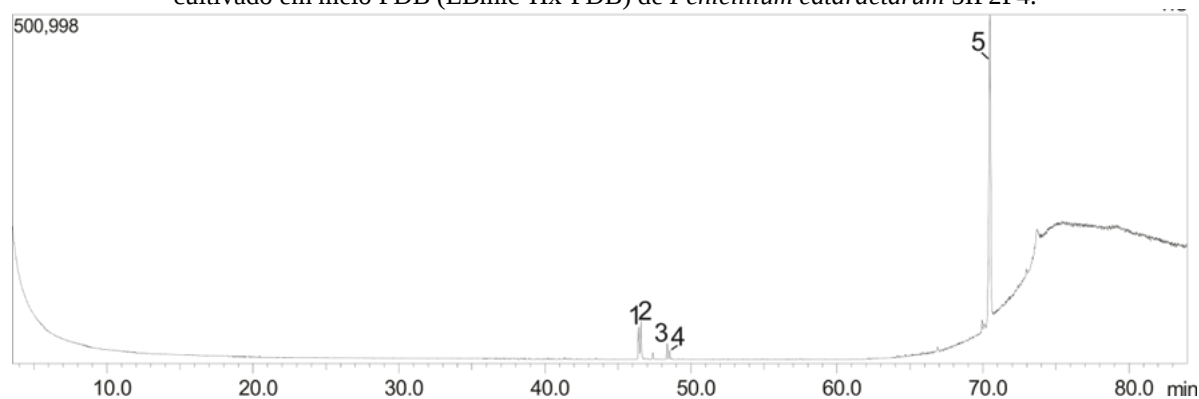


Tabela 4. Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio PDB (EBmic-Hx-PDB) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Pico	TR (min)	IR	Composto	% relativa
1	46,41	2097	Octadecadienoato de metila (linoleato de metila)	5,23
2	46,58	2102	Octadecenoato de metila (oleato de metila)	5,83
3	48,37	2164	Octadecadienoato de etila (linolato de etila)	1,84
4	48,54	2170	Octadecenoato de etila (oleato de etila)	1,27
5	70,49	3018	Ergosterol	85,83

TR: Tempo de retenção; IR: índice de retenção; NI: não identificado.

Figura 10. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio YPD (EBmic-Hx-YPD) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

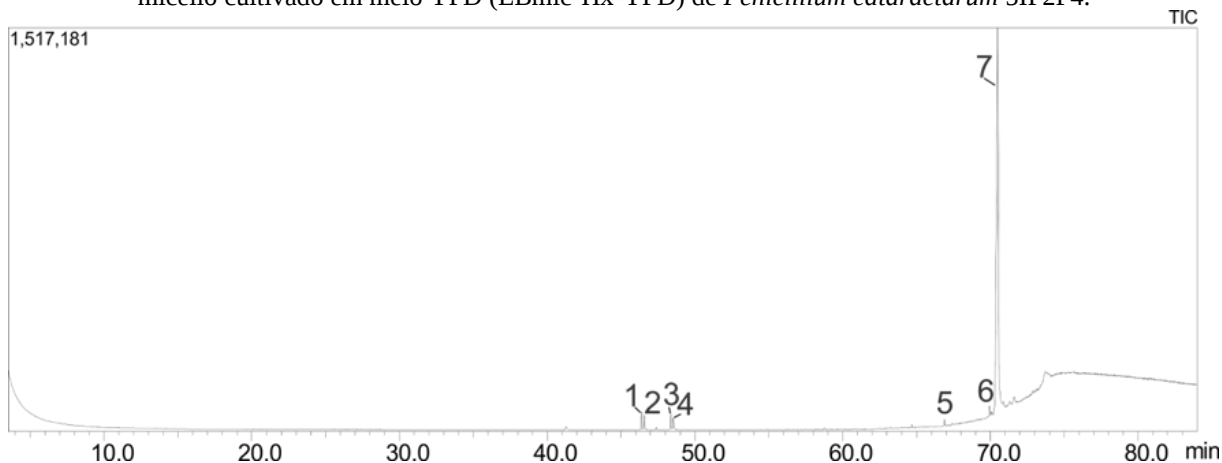


Tabela 5. Compostos anotados a partir da fração hexânica do extrato bruto de micélio cultivado em meio YPD (EBmic-Hx-YPD) de *Penicillium cataractarum* 5IP2F4.

Pico	TR (min)	IR	Composto	% relativa
1	46,39	2096	Octadecadienoato de metila (linoleato de metila)	1,80
2	46,57	2102	Octadecenoato de metila (oleato de metila)	1,52
3	48,37	2164	Octadecadienoato de etila (linolato de etila)	1,53
4	48,53	2170	Octadecenoato de etila (oleato de etila)	1,12
5	66,89	2858	NI (derivado do ergosterol)	0,53
6	69,94	2963	NI (derivado do ergosterol)	0,91
7	70,49	3018	Ergosterol	92,58

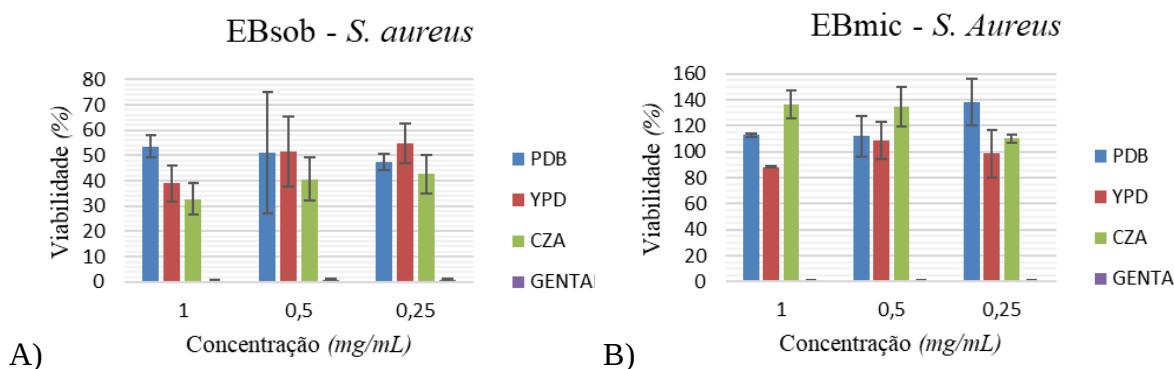
TR: Tempo de retenção; IR: índice de retenção; NI: não identificado.

5.4 TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos extratos brutos miceliais (fração hidrometanólica) e de sobrenadantes obtidos nos diferentes meios de cultivo (PDB, YPD e CZA) foi avaliada frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 (Gram-positiva) e *Escherichia coli* ATCC 14458 (Gram-negativa), por meio do ensaio de microdiluição em caldo. As amostras foram testadas em triplicata nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL, utilizando gentamicina como controle positivo.

Os resultados de viabilidade celular para *S. aureus* estão apresentados na **figura 11**. Observa-se que parte dos extratos apresentaram algum nível de redução do crescimento bacteriano, com diferenças associadas ao tipo de meio e à origem do extrato (micélio ou sobrenadante). Entre os extratos de sobrenadante (EBsob) (**figura 11A**), aqueles obtidos a partir dos cultivos em meio CZA e YPD demonstraram maiores efeitos de inibição do crescimento bacteriano frente a *S. aureus* de 68 e 62% na concentração de 1mg/mL quando comparado aos resultados obtidos para EBsob-PDB que apresentou inibição do crescimento bacteriano de 46%.

Figura 11: Viabilidade celular frente a *S. aureus* com os extratos brutos de sobrenadante (EBsob) (A) e da biomassa micelial (EBmic-Me) (B) obtidos a partir do cultivo nos meios de cultura PDB, YPD e CZA. Genta=gentamicina (controle positivo)

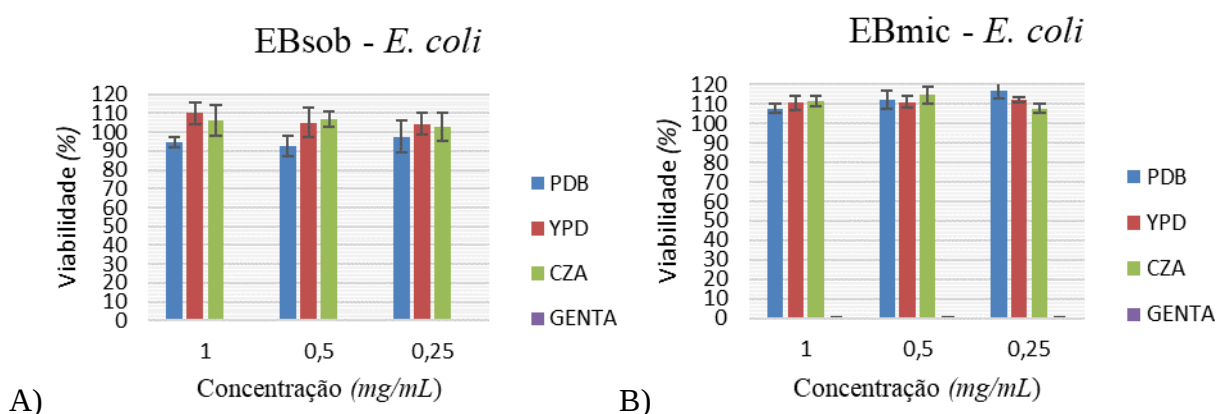


Entre os extratos miceliais (EBmic-Me) avaliados frente a *Staphylococcus aureus*, não foi observada atividade antibacteriana significativa para nenhuma das concentrações avaliadas (**figura 11B**). Embora pequenas variações entre os meios possam ser observadas, o crescimento bacteriano permaneceu acima de 90% em todas as amostras, indicando ausência de efeito inibitório relevante. Em contraste, o controle positivo (gentamicina) promoveu total inibição do crescimento, evidenciando a diferença de potência entre os extratos e o antibiótico de referência.

Essa baixa atividade pode estar relacionada à limitada difusibilidade ou solubilidade dos compostos intracelulares extraídos do micélio, os quais, mesmo presentes, podem não interagir de forma eficiente com as células bacterianas. Já a maior atividade observada nos extratos de sobrenadante sugere que parte dos metabólitos bioativos é secretada para o meio de cultivo, o que favorece sua disponibilidade e interação com o microrganismo-alvo.

Os extratos brutos miceliais (fração hidrometanólica) e de sobrenadantes obtidos nos diferentes meios de cultivo (PDB, YPD e CZA) foram também avaliados frente a *E. coli*, porém nenhuma amostra mostrou atividade de inibição do crescimento bacteriano nas concentrações avaliadas (1, 0,5 e 0,25 mg/ml) (**Figura 12**).

Figura 12: Viabilidade celular frente a *E. coli* com os extratos brutos de sobrenadante (EBsob) (A) e da biomassa micelial (EBmic-Me) (B) obtidos a partir do cultivo nos meios de cultura PDB, YPD e CZA. Genta = gentamicina.



Através dos gráficos, é possível observar que nenhum dos extratos, sejam miceliais ou de sobrenadante, apresentaram atividade antibacteriana significativa. Em todas as concentrações testadas, observou-se alta viabilidade bacteriana, com valores próximos entre os diferentes meios de cultivo, indicando ausência de inibição expressiva quando comparados ao controle positivo (gentamicina), que promoveu total inibição do crescimento.

A ausência de efeito inibitório contra *E. coli* pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles, a natureza estrutural da bactéria. As bactérias Gram-negativas possuem membrana externa rica em polissacarídeos, que atua como uma barreira estrutural altamente seletiva, restringindo a entrada de substâncias e reduzindo a suscetibilidade a novos compostos (Zhou *et al.*, 2023).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, *Penicillium cataractarum* 5IP2F4 demonstrou capacidade metabólica relevante, evidenciada tanto pelo acúmulo de dicetopiperazinas inéditas para a espécie quanto pela variação no perfil químico em função das condições de cultivo. A análise cinética permitiu identificar o 22º dia como o ponto de maior acúmulo de metabólitos extracelulares, indicando esse período como ideal para coleta em abordagens voltadas à otimização biossintética.

A aplicação da estratégia OSMAC mostrou-se eficiente para modular o metaboloma da cepa, visto que alterações no meio de cultivo impactaram de maneira expressiva o conjunto de metabólitos produzidos. Os meios avaliados influenciaram tanto o crescimento micelial quanto a diversidade química dos metabólitos, com diferenças refletidas na produção de dicetopiperazinas e metabólitos lipofílicos, além da mudança no efeito antibacteriano observado. Esses resultados reforçam que condições nutricionais distintas podem ativar vias biossintéticas específicas e revelar metabólitos que não seriam detectados em condições padronizadas de cultivo.

De maneira geral, os resultados obtidos demonstram que *P. cataractarum* 5IP2F4 apresenta um potencial metabólico expressivo e ainda pouco explorado, especialmente considerando a produção de moléculas bioativas e a plasticidade metabólica observada frente às variações ambientais. Assim, a integração entre OSMAC e técnicas analíticas avançadas configura um caminho promissor para aprofundar a caracterização química dessa espécie e ampliar o acesso a metabólitos secundários com possível relevância farmacológica. Este estudo contribui, portanto, para o entendimento das capacidades biossintéticas de *P. cataractarum* 5IP2F4 e reforça o valor biotecnológico dos fungos endofíticos como fontes de novos compostos naturais.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Carol Stream: Allured Publishing Corporation**, 4 ed., 2007.
- ANAND, Uttpal et al. Current scenario and future prospects of endophytic microbes: promising candidates for abiotic and biotic stress management for agricultural and environmental sustainability. **Microbial ecology**, v. 86, n. 3, p. 1455-1486, 2023.
- ARIS, Parisa et al. Griseofulvin: an updated overview of old and current knowledge. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7034, 2022.
- ATANASOV, Atanas G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- CAMPANELLA, Jonatas E. M.; ROSA, Leonardo T.; MALAVAZI, Iran. Fungal $\Delta 9$ -fatty acid desaturase: a unique enzyme at the core of lipid metabolism in *Aspergillus fumigatus* and a promising target for the search for antifungal strategies. **mBio**, p. e00803-24, 2025.
- CAPON, Robert J. et al. Citromycetins and bilains A–C: New aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 11, p. 1746-1752, 2007.
- CARUSO, Daniel J. et al. Exploring the promise of endophytic fungi: a review of novel antimicrobial compounds. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1990, 2022.
- CHIOMA, Dennis M.; ABU, Gideon O.; AGWA, Obioma K. Kinetic modelling of oxalic acid production from cassava whey by *Aspergillus niger*. **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 40, p. 18-26, 2021.
- COERTJENS, Nicole C.; MASCARENHAS, Maria S.; BATISTOTE, Margareth. Fungos endofíticos brasileiros: potencial biotecnológico em evidência. **Diversitas Journal**, [S. l.], v. 9, n. 3, 2024.
- COERTJENS, Nicole C.; MASCARENHAS, Maria S.; BATISTOTE, Margareth. Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos Isolados no Pantanal. **Revista Cereus**, v. 17, n. 1, p. 168-182, 2025.
- CRISPIM, Alexandre C. **Estudo metabolômico do filtrado da cultura do fungo endofítico *Rhizoctonia solani***. Dissertação de mestrado - Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Maceió, 2015.
- DA SILVA, Fernanda M. R. *et al.* Metabolomic strategies to improve chemical information from OSMAC studies of endophytic fungi. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 236, 2023.
- DAVID, Ynae P. **Produção de Ácido Málico via Fermentação Submersa por *Rhizopus oryzae***. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2024
- DE CARVALHO, Ana Calheiros et al. *Penicillium* genus as a source for anti-leukemia

compounds: an overview from 1984 to 2020. **Leukemia & Lymphoma**, v. 62, n. 9, p. 2079-2093, 2021.

ESHBOEV, Farkhod et al. Antimicrobial action mechanisms of natural compounds isolated from endophytic microorganisms. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, p. 271, 2024.

FADIJI, Ayomide E.; BABALOLA, Olubukola O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 2020.

FERREIRA, Raissa R.; CRUZ, Jacqueline S.; HAMERSKI, L. Estratégia OSMAC: Um Método Acessível para a Descoberta de Novas Substâncias Microbianas. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, 2022.

GAMAL, Asmaa et al. Production and bioprocessing of Taxol from *Aspergillus niger*, an endophyte of *Encephalartos whitelockii*, with a plausible biosynthetic stability: antiproliferative activity and cell cycle analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 78, 2024.

HARAYAMA, Takeshi; ANTONNY, Bruno. Beyond fluidity: the role of lipid unsaturation in membrane function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 15, n. 7, p. a041409, 2023.

HOUBRAKEN, Jos et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.

JIA, Jia et al. 2, 5-Diketopiperazines: A review of source, synthesis, bioactivity, structure, and MS fragmentation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1060-1085, 2023.

KARTHIKA, M. Diversity and Extracellular Enzyme Production of Fungal Endophytes from the Genus *Ocimum* L. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 19, n. 4, p. 1113-1122, 2022.

MAHMOUDIAN, Fatemeh et al. Production of mycophenolic acid by a newly isolated indigenous *Penicillium glabrum*. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2420-2428, 2021.

MARENGO, Jose A. et al. Extreme drought in the Brazilian Pantanal in 2019–2020: characterization, causes, and impacts. **Frontiers in Water**, v. 3, p. 639204, 2021.

MURRAY, Christopher J. L. et al. Carga global de resistência antimicrobiana bacteriana em 2019: uma análise sistemática. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon 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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Relatório do Sistema Global de Vigilância de Resistência e Uso de Antimicrobianos – GLASS 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022.

Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702> Acesso em: 24 nov. 2025

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> Acesso em: 24 nov. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Analysis of antibacterial agents in clinical and preclinical development: overview and analysis 2025**. Geneva: World Health Organization, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240113091> Acesso em: 24 nov. 2025.

PAN, Rui et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 294, 2019.

PARK, Seon Y. et al. Metabolic engineering of microorganisms for the production of natural compounds. **Advanced Biosystems**, v. 2, n. 1, p. 1700190, 2018.

PENG, Yuejin; CHEN, Bin. Role of cell membrane homeostasis in the pathogenicity of pathogenic filamentous fungi. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2299183, 2024.

PHAM, Janette V. et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1404, 2019.

PRIVALSKY, Thomas M. et al. Prospects for antibacterial discovery and development. **Journal of the American Chemical Society**, v. 143, n. 50, p. 21127-21142, 2021.

QIN, Dan; DONG, Jinyan. Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2619, 2023.

SADOWSKA, Anna et al. Estatinas—de fungos à farmácia. **Revista internacional de ciências moleculares**, v. 25, n. 1, p. 466, 2023.

SANCHES, Luana B. **Integração de Metabolômica, Redes Moleculares e Co-Cultura para a Produção de Metabólitos Secundários em Fungos Endofíticos: Potenciais aplicações contra Fitopatógenos e Bactérias Patogênicas**. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, UFMS, Campo Grande, 2024.

SENANAYAKE, Indunil. C. et al. Morphological approaches in studying fungi: Collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020.

SINGH, Jagdish; KAUR, Gundeep. Harnessing *Penicillium chrysogenum* for enhanced CMCase yield: breakthrough in wheat husk saccharification. **Biologia**, p. 1-15, 2025.

SONG, Wei et al. New cytotoxic indole derivatives with anti-FADU potential produced by the endophytic fungus *Penicillium oxalicum* 2021CDF-3 through the OSMAC strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1400803, 2024.

SPECIAN, Vânia et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 4, 2014.

TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

THEURETZBACHER, Ursula et al. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 275-285, 2020.

TIAN, Danmei et al. New diketopiperazine alkaloid and polyketides from marine-derived fungus *Penicillium* sp. TW58-16 with antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. **Fitoterapia**, v. 156, p. 105095, 2022.

TIWARI, Pragya; BAE, Hanhong. Endophytic fungi: key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 360, 2022.

TOGHUEO, Rufin M. K.; BOYOM, Fabrice F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, v. 10, n. 3, p. 107, 2020.

VISAGIE, Cobus. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, n. 1, p. 343-371, 2014.

VISAGIE, Cobus. M. et al. Fifteen new species of *Penicillium*. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 36, n. 1, p. 247-280, 2016.

WANG, Cancan et al. Discovery of 2, 5-diketopiperazine alkaloids with quorum sensing inhibitory activity from the marine fungus *Penicillium* sp. ZJUT-34. **Natural Product Research**, v. 38, n. 20, p. 3605-3612, 2024.

WANG, Nan; CUI, Cheng-Bin; LI, Chang-Wei. A new cyclic dipeptide penicimutide: The activated production of cyclic dipeptides by introduction of neomycin-resistance in the marine-derived fungus *Penicillium purpurogenum* G59. **Archives of pharmacal research**, v. 39, n. 6, p. 762-770, 2016.

WU, Ying-Ying et al. An endophytic Fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 265-271, 2018.

XU, Wenqiang et al. Fermentative production of diacylglycerol by endophytic fungi screened from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 399, 2023.

YU, Wenbin et al. AozC, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor, negatively regulates salt tolerance in *Aspergillus oryzae* by controlling fatty acid biosynthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 10, 2025.

ZHANG, Yu et al. Interactions between endophytes and plants: beneficial effect of endophytes to ameliorate biotic and abiotic stresses in plants. **Journal of plant biology**, v. 62,

p. 1-13, 2019.

ZHANG, Xiaoqin *et al.* Structures and bioactivities of secondary metabolites from *Penicillium* genus since 2010. **Fitoterapia**, v. 163, p. 105349, 2022.

ZHOU, Gang *et al.* Outer membrane porins contribute to antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1690, 2023.

ANEXO 1

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

REF: GoG#IDMOL_0275/2024
Data de Emissão: 26/02/2024

INFORMAÇÕES DA AMOSTRA

- Identificação: **SIPZF4**
- Tipo de amostra: **fungo isolado em placa de cultivo**
- N° GoGenetic: **Go020489 – S2187**
- Data de recebimento da amostra: **14/02/2024**

INFORMAÇÕES DO SOLICITANTE

- Cliente: **Denise Brentan da Silva**
- Solicitante: **Denise Brentan da Silva**
- Contato: **denise.brentan@ufms.br**

INFORMAÇÕES DO ENSAIO

- Método: Identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (ITS+TEF)
- Referência: GG-BM029, Confiança: 99%;
- Data de início: **16/02/2024**
- Data de conclusão: **26/02/2024**

RESULTADO

O isolado “SIPZF4” apresenta 99% (557/559 bases de ITS, 598/608 bases de TEF) de identidade com *Penicillium catenulatum*



Reino: **Fungi**
Filo: **Ascomycota**
Classe: **Eurotiomycetes**
Ordem: **Eurotiales**
Família: **Aspergillaceae**
Gênero: **Penicillium**
Espécie: **Penicillium catenulatum**

Árvore de distância filogenética entre a sequência de DNA do isolado (em amarelo) e sequências similares do banco de dados nr do NCBI.

As informações e resultados se aplicam somente à amostra conforme recebida.

Eduardo Balsanelli, PhD
CRBio 83112/07-D

Eduardo Balsanelli
Responsável Técnico - CRBio 83112/07-D
contato@gogenetic.com.br



Rua Imaculada Conceição, 1430. Curitiba, PR – Brasil – CEP 80215-182
+55 41 3024.0660 www.gogenetic.com.br