



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**Caracterização do exometaboloma de fungos dos gêneros *Benjaminiella*,  
*Cokeromyces* e *Mycotypha***

Florianópolis

2020

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**Caracterização do exometaboloma de fungos dos gêneros *Benjaminiella*,  
*Cokeromyces* e *Mycotypha***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biociências.  
Orientador: Prof. Admir José Giachini, Ph.D.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mamede, Ana Carolina Peixoto Baidarian  
Caracterização do exometaboloma de fungos dos gêneros  
Benjaminiella, Cokeromyces e Mycotypha / Ana Carolina  
Peixoto Baidarian Mamede ; orientador, Admir José  
Giachini, 2020.  
81 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fungos. 3.  
Metabolômica. 4. HPLC-MS. I. Giachini, Admir José . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Ana Carolina Peixoto Baidarian Mamede

**Caracterização do exometaboloma de fungos dos gêneros *Benjaminiella*,  
*Cokeromyces* e *Mycotypha***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Michele Debiasi Alberton, Dra.  
Universidade Regional de Blumenau

Prof.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biociências.

---

Prof. Glauber Wagner, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Admir José Giachini, Ph.D.  
Orientador

Florianópolis  
2020

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela educação e pelos valores a mim transmitidos desde a infância, por compreenderem a minha ausência em tantos momentos e pelo amor e cuidado.

À minha irmã, pela amizade, pelos bons momentos e pelo apoio.

Às minhas queridas amigas de Floripa, algumas que não fazem mais parte da minha convivência diária, mas que levo em meu coração, mulheres incríveis e inspiradoras, obrigada por todas as aventuras, pelas risadas, treinos e eventos, por me aguentarem nos meus piores dias e por fazerem parte dos meus melhores.

Aos amigos que a vida fitness me deu, que salvaram os meus dias de ansiedade nesses quatro anos com os melhores treinos, cafés da manhã e conversas no sofá mais legal do mundo. Obrigada especial para a minha dupla preferida e para as divas da Run.

Aos colegas de laboratório, em especial às minhas queridas amigas do quarteto, pela amizade, parceria, apoio, almoços, viagens e por tudo o que vivemos juntas.

Ao professor Marcelo Maraschin, por abrir as portas do LMBV, por todas as conversas e ideias sobre o projeto, por sempre responder minhas dúvidas e por todo o auxílio e apoio que me foi dado desde o início do doutorado.

Às meninas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, pela acolhida, pela ajuda com os softwares e pelas conversas.

Ao meu orientador, professor Admir Giachini, por ter me acolhido no laboratório e colaborado com os meus trabalhos de conclusão de 2011 até hoje.

À banca examinadora por aceitar avaliar e contribuir de forma tão significativa para com este trabalho. Obrigada às professoras Miriam, Michele, Elza e ao professor Marcelo.

Ao professor Cláudio, por sempre estar disposto a ajudar e pela companhia nos almoços.

Ao professor Márcio, pelos cafés e conversas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, por todo o aprendizado desde o Mestrado.

Aos colegas do PPG, pelas ideias trocadas em tantos seminários e disciplinas e pela parceria nos momentos difíceis.

Aos colegas do grupo Bolsistas Capes, pelos perrengues compartilhados e momentos de descontração.

À Elis, por todas as análises de HPLC-MS, por ser tão solícita e preocupada em ajudar, e por todas as conversas e ideias durante os experimentos.

Ao professor Hernán Terenzi, por disponibilizar a infraestrutura do CEBIME para que eu pudesse realizar os meus experimentos.

Ao professor Luciano Campestrini, pelo empréstimo de materiais, por me auxiliar com as técnicas que eu não conhecia e pelas conversas que tanto me esclareceram.

À CAPES, pela bolsa sem a qual não seria possível realizar o doutorado e nem a minha permanência em Florianópolis.

À Universidade Federal de Santa Catarina, lugar que eu amo e onde vivi tantos momentos, conheci tantas pessoas boas, aprendi e cresci profissionalmente. Sou muito grata por ter ingressado em uma universidade pública e gratuita, onde se faz Ciência séria e de qualidade.

*“I am among those who think that science has great beauty.”*

*Marie Curie*

(Eve Curie Labouisse. *Madame Curie: A Biography*, 1937).

## RESUMO

Fungos da ordem Mucorales possuem crescimento rápido e são dimórficos, ou seja, têm a capacidade de se desenvolver em formas miceliais (filamentosas) e leveduriformes, dependendo da composição do meio de cultura. *Mucor* é o principal gênero da ordem e produz metabólitos secundários com diversas aplicações no setor alimentício e na indústria. Além de *Mucor*, outros gêneros de importância são *Cokeromyces* e *Mycotypha*, devido à patogenicidade que exercem em seres humanos e animais, e *Benjaminiella*, que atua como modelo em estudos de dimorfismo e na produção de quitosana. Até o momento não se conhecem estudos que empregam análises metabolômicas para elucidar os metabólitos secundários produzidos por *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar os metabólitos produzidos por esses fungos, de modo a contribuir para o conhecimento sobre o metaboloma desses microrganismos. Para explorar os metabólitos produzidos por esses gêneros, foram cultivadas linhagens de *B. multispora*, *B. poitrasii*, *B. youngii*, *C. recurvatus*, *M. africana* e *M. indica*, *in vitro*, em ambas as formas: micelial e leveduriforme. No entanto, devido às condições de cultivo, o crescimento leveduriforme se sobrepôs e, portanto, foi o escolhido para o desenvolvimento das atividades atreladas a esse estudo. Após o crescimento e extração da biomassa fúngica, foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), com o intuito de identificar o seu exometaboloma. Os resultados desse estudo mostram que, além de conter alguns metabólitos comuns, normalmente encontrados em microrganismos e plantas, os extratos de *M. africana* também apresentavam compostos como verrucarol, brefeldina A e castanospermina, metabólitos secundários com atividades biológicas conhecidas, em virtude de suas propriedades antimicrobianas, antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* produzem substâncias com potencial econômico para setores da indústria farmacêutica e de biotecnologia. No futuro, portanto, a produção em larga escala de biomassa em biorreatores poderia aumentar os níveis de metabólitos com aplicações biotecnológicas em diferentes frentes.

**Palavras-chave:** Fungos, Metabolômica, HPLC-MS.

## ABSTRACT

Mucorales are dimorphic fungi with fast growth and the capacity to develop in both mycelial and yeast-like forms, depending on the culture media composition. *Mucor* is the main genus in Mucorales and produces secondary metabolites with several applications in the food industry. Other important genera are *Cokeromyces* and *Mycotypha*, which have medical importance due to their pathogenicity to humans and animals, and *Benjaminiella*, that serves as a dimorphic model and is used in chitosan production around the globe. To the best of my knowledge, there are no studies using metabolomic analyzes to elucidate the secondary metabolites produced by *Benjaminiella*, *Cokeromyces* and *Mycotypha*. Therefore, the present work aims to study the metabolites produced by these fungi, in order to contribute to the knowledge about the metabolome of these microorganisms. In order to explore the metabolites in culture medium, strains of *B. multispora*, *B. poitrasii*, *B. youngii*, *C. recurvatus*, *M. africana* and *M. indica* were cultivated *in vitro* in both mycelial and yeast-like forms. However, due to the cultivation and extraction conditions, the yeast growth was superior and therefore chosen for this study. After growth, the fungal biomass was extracted, and extracts analyzed through high-performance liquid chromatography techniques coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to identify the fungi exometabolom. The results shows that, apart from common metabolites found in microorganisms and plants, *M. africana* extracts also presented compounds such as verrucarol, brefeldin A and castanospermine, all with known biological activities including antimicrobial, antitumor, antioxidant and anti-inflammatory properties. In addition, *Benjaminiella*, *Cokeromyces* and *Mycotypha* produce substances with economic potential to pharmaceutical and biotechnology industries. In the future, large-scale biomass production in bioreactors could raise the amount of the excreted metabolites with potential biotechnological application.

**Keywords:** Fungi, Metabolomics, HPLC-MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cokeromyces recurvatus</i> . a) cultivo micelial: V - vesícula; P - pedicela; E - esporangiola contendo esporos; b) cultivo leveduriforme. ....	28
Figura 2. <i>Mycotypha indica</i> . a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; Z – zigósporo; b) cultivo leveduriforme.....	29
Figura 3. <i>Mycotypha microspora</i> . a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; V – vesícula; e – esporos; b) cultivo leveduriforme.....	31
Figura 4. <i>Mycotypha africana</i> . a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos; ED – esporos dimórficos; b) cultivo leveduriforme.....	31
Figura 5. <i>Benjaminiella poitrasii</i> . a) cultivo micelial; V: vesícula; E: esporangiola com um esporo; b) cultivo leveduriforme.....	32
Figura 6. <i>Benjaminiella youngii</i> . a) cultivo micelial; P – pedicela; E – esporangiola; V – vesícula; b) cultivo leveduriforme.....	33
Figura 7. <i>Benjaminiella multispora</i> . a) cultivo micelial; P – pedicela; E – esporangiola; V – vesícula; b) cultivo leveduriforme.....	33
Figura 8. Espectro de varredura UV-Vis obtido para todas as espécies em comprimento de onda de 200 a 750 nm. ....	40
Figura 9. Espectro de FTIR de <i>C. recurvatus</i> . ....	42
Figura 10. Espectro de FTIR de <i>M. indica</i> . ....	42
Figura 11. Espectro de FTIR de <i>B. multispora</i> . ....	43
Figura 12. Espectro de FTIR de <i>B. poitrasii</i> . ....	43
Figura 13. Espectro de FTIR de <i>M. africana</i> . ....	44
Figura 14. Espectro de FTIR de <i>B. youngii</i> . ....	44
Figura 15. Cromatograma do extrato do fungo <i>M. africana</i> com detecção por MS no modo negativo. ....	48
Figura 16. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>M. africana</i> com detecção por MS no modo negativo.....	48

Figura 17. Cromatograma do extrato do fungo <i>B. multispora</i> com detecção por MS no modo negativo.....	49
Figura 18. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>B. multispora</i> com detecção por MS no modo negativo.....	49
Figura 19. Cromatograma do extrato do fungo <i>B. youngii</i> com detecção por MS no modo negativo.....	50
Figura 20. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>B. youngii</i> com detecção por MS no modo negativo.....	50
Figura 21. Cromatograma de HPLC-MS do extrato do fungo <i>C. recurvatus</i> com detecção por MS no modo negativo.....	51
Figura 22. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>C. recurvatus</i> com detecção por MS no modo negativo.....	51
Figura 23. Cromatograma do extrato do fungo <i>M. indica</i> com detecção por MS no modo negativo.....	52
Figura 24. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>M. indica</i> no modo negativo.....	52
Figura 25. Cromatograma do extrato do fungo <i>M. africana</i> com detecção por MS no modo positivo.....	53
Figura 26. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de <i>M. africana</i> no modo positivo.....	53
Figura 27. Espectro de massas para compostos de maior intensidade e seus fragmentos.....	54
Figura 28. Espectro de HPLC-MS sem extrato (controle) feito no modo negativo...	55
Figura 29. Estrutura tridimensional do verrucarol.....	59
Figura 30. Estrutura tridimensional da brefeldina A.....	61
Figura 31. Estrutura tridimensional da castanospermina.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos das amostras após procedimento de extração de fase sólida (SPE).....	39
Tabela 2. Bandas obtidas para <i>M. africana</i> em FTIR utilizando pastilha de KBr. ....	41
Tabela 3. Metabólitos com três ou quatro casas decimais de compatibilidade com os bancos de dados após análise de HPLC-MS e MS/MS em <i>M. africana</i> nos modos negativo e positivo. ....	46
Tabela 4. Metabólitos com duas casas decimais de compatibilidade com os bancos de dados após HPLC-MS e MS/MS nos modos negativo e positivo. ....	47
Tabela 5. Lista dos metabólitos sugeridos para cada espécie nos modos negativo e positivo.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

BM – *Benjaminiella multispora*

BP – *Benjaminiella poitrasii*

BY – *Benjaminiella youngii*

°C – Graus Celsius

CEBIME – Centro de Biologia Molecular e Estrutural

HPLC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

cm – Centímetros

CR – *Cokeromyces recurvatus*

ESI – Ionização por electrospray

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

g – Gramas

g L<sup>-1</sup> – Gramas por litro

h – Horas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HCl – Ácido clorídrico

KBr – Brometo de potássio

LMBV – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

µL – Microlitros

MA – *Mycotypha africana*

MeOH – Metanol

MEYE – Meio extrato de malte e extrato de levedura

mg – Miligramas

MI – *Mycotypha indica*

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MM – *Mycotypha multispora*

MS/MS – Espectrometria de massa em tandem

*m/z* – Relação massa/carga

nm – Nanômetros

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

kg – Quilogramas

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – Rotações por minuto

SPE – Extração de Fase Sólida

TR – Tempo de retenção

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

YP – Meio extrato de levedura e peptona

YPG – Meio extrato de levedura, peptona e glucose

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	18
1.1	HIPÓTESE .....	20
1.2	OBJETIVOS .....	20
1.2.1	Objetivo Geral.....	20
1.2.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1	BIOTECNOLOGIA, MICRORGANISMOS E PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS .....	21
2.2	Filo Mucoromycota.....	24
2.2.1	A Ordem Mucorales .....	24
2.2.1.1	Família Mycotyphaceae Benny & R.K. Benj. ....	26
2.2.1.2	Família Thamniaceae Fitzp. ....	27
2.3	Espécies utilizadas no trabalho .....	27
2.3.1	<i>Cokeromyces recurvatus</i> Poitras.....	27
2.3.2	Gênero <i>Mycotypha</i> Fenner.....	29
2.3.2.1	<i>Mycotypha indica</i> P.M. Kirk & Benny .....	29
2.3.2.2	<i>Mycotypha microspora</i> Fenner .....	30
2.3.2.3	<i>Mycotypha africana</i> R.O. Novak & Backus.....	30
2.3.3	Gênero <i>Benjaminiella</i> Arx.....	31
2.3.3.1	<i>Benjaminiella poitrasii</i> (R.K. Benj.) Ars .....	32
2.3.3.2	<i>Benjaminiella youngii</i> P.M. Kirk.....	32
2.3.3.3	<i>Benjaminiella multispora</i> Benny, Samson & M.C. Sriniv. ....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	FUNGOS UTILIZADOS .....	34
3.2	MEIOS DE CULTURA E PREPARO DO INÓCULO .....	34

3.3	SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO DE CULTURA.....	35
3.4	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS .....	35
3.5	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....	36
3.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-MS).....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.	CRESCIMENTO DOS FUNGOS NOS DOIS TIPOS DE CULTIVO .....	38
4.2	ANÁLISE QUÍMICA DOS METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS.....	38
4.3	CROMATIGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
4.3.1	Verrucarol.....	57
4.3.2	Brefeldina A.....	59
4.3.3	Castanospermina.....	61
4.3.4.	Outros metabólitos.....	62
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A Ordem Mucorales Dumort (filo Mucoromycota Doweld) é composta por fungos cosmopolitas que podem ser encontrados em diversos ambientes, especialmente no solo e em fezes de animais. Esses fungos possuem como característica principal o dimorfismo, fator que permite que eles cresçam e se desenvolvam na forma leveduriforme (unicelular) ou na forma micelial (filamentosa), dependendo da disponibilidade de nutrientes presentes durante o cultivo. Alguns gêneros como *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Absidia* atuam como patógenos oportunistas, podendo causar infecções rinocerebrais principalmente em indivíduos imunocomprometidos (CUNHA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Outros servem como modelos para estudos de dimorfismo e de produção de carotenoides, quitosana e enzimas.

Fungos tradicionalmente secretam os metabólitos secundários produzidos para o meio extracelular, uma vez que essas substâncias não são necessariamente essenciais a todas as fases de crescimento e sobrevivência desses organismos. Apesar disso, esses metabólitos desempenham um papel extremamente importante na adaptação dos microrganismos ao meio em que eles se encontram. Entre os diversos exemplos conhecidos, podemos citar alguns como *Mortierella alpina*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium sp.*, *Talaromyces verruculosus* e *Stemphylium lycopersici*, que apresentam pigmentos do tipo antraquinonas, benzoquinonas e corantes de tecidos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes e anticancerígenas (KHANI *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2017). Isso ocorre apesar do fato dos metabólitos conferirem vantagens frente a diversos fatores, os quais serão abordados ao longo deste trabalho. A presença desses metabólitos no meio de cultivo torna este um ambiente quimicamente diverso que, aliado ao crescimento acelerado e com elevada produção de biomassa, faz com que esses microrganismos sejam de grande interesse para a área de produtos naturais, com aplicações biotecnológicas diversas.

Apesar das vantagens já elencadas, estudos que utilizam esses fungos para a caracterização e, posteriormente o uso dos metabólitos e outras substâncias, como enzimas, são escassos. Entre esses, podemos citar a produção de celulasas por *Rhizopus microsporus*, a produção de amilases e inulinases por mucorales isolados de solos de mineração de cobre e a produção de lipídeos microbianos (GALINDO, 2016;

SANTIAGO, SOUZA-MOTTA, 2016; LIMA *et al.*, 2017).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo principal a identificação de metabólitos produzidos por fungos cultivados na forma leveduriforme, a fim de dar início à análise metabolômica de indivíduos pertencentes aos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*. Até o presente, este é o primeiro trabalho que contempla a análise de metabólitos de fungos pertencentes a esses gêneros.

## 1.1 HIPÓTESE

Fungos da Ordem Mucorales produzem diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico.

## 1.2 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese.

### 1.2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização dos extratos do meio fermentativo obtidos de cultivos de fungos leveduriformes dos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar grupamentos químicos de interesse biotecnológico a partir dos extratos de exemplares dos fungos *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* mediante as técnicas de Espectroscopia de varredura UV-Visível, Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Infravermelho.
- Identificar potenciais perfis metabólicos a partir dos resultados obtidos nas análises de Cromatografia líquida de alta eficiência e Espectrometria de massas (HPLC-MS).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOTECNOLOGIA, MICRORGANISMOS E PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS

Produtos naturais, especialmente plantas e microrganismos, desempenham um papel extremamente importante na descoberta de substâncias bioativas e no desenvolvimento de novos fármacos. Aproximadamente um quarto de todos os medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Médica Europeia (EMA) são derivados de plantas, como o paclitaxel e a morfina (PATRIDGE *et al.*, 2016; WANI *et al.*, 1971) e cerca de um terço dos medicamentos aprovados pela FDA nos últimos 20 anos é baseado em produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2012; CARTER, 2011). A descoberta da penicilina a partir de fungos levou à triagem de muitos microrganismos para a busca de possíveis antibióticos, entre eles a tetraciclina de *Streptomyces aureofaciens* e a ciclosporina de *Tolypocladium inflatum* (LI; VEDERAS, 2009; LI; WENG, 2017).

Dessa forma, pesquisas que contemplem a descoberta de novas moléculas bioativas têm adquirido cada vez mais importância, especialmente em se tratando de questões relacionadas à resistência microbiana frente aos fármacos atualmente disponíveis e ao surgimento de novas doenças. Esses estudos, de natureza multidisciplinar, tendem a ser dispendiosos e demandam um longo tempo até chegarem à fase clínica (GUIDO *et al.*, 2010). Além das aplicações na indústria farmacêutica, o uso de produtos naturais, especialmente daqueles obtidos de microrganismos, na indústria química, agrícola e alimentícia contribui significativamente para o desenvolvimento científico e econômico.

Nesse contexto, entre as subáreas inseridas na busca por moléculas de interesse biotecnológico, a química medicinal desempenha um papel central no processo de pesquisa e desenvolvimento de substâncias bioativas, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular, entre outras. Além da descoberta de moléculas com aplicação biotecnológica, a química medicinal engloba também os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade biológica (WERMUTH, 2003; GUIDO *et al.*, 2010).

Entre as tecnologias atualmente disponíveis para a descoberta de novas substâncias estão a genômica, transcriptômica, proteômica, metabonômica e metabolômica, que irão atuar

desde o nível de gene, passando por proteínas englobando até os metabólitos. Entrando especificamente na metabolômica, essa técnica permite a identificação de moléculas de baixo peso molecular (menores que 1000 Da) que participam de reações metabólicas, facilitando uma melhor compreensão das vias bioquímicas (NICHOLSON; LINDON, 2008; YANG *et al.*, 2013; KHAN, 2018). Dessa forma, mediante o uso de técnicas como cromatografia líquida e gasosa, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, a metabolômica se torna uma das principais ferramentas na descoberta de novas substâncias.

Quando se fala em biotecnologia e metabólitos com potencial aplicação biológica, o exemplo mais tradicional que nos vem à mente é a descoberta da penicilina e a grande importância desse episódio na sobrevivência da nossa espécie. Desde então, eventos subsequentes permitiram aprimorar as metodologias de pesquisa e o desenvolvimento de novas técnicas de isolamento, quantificação e caracterização de substâncias, especialmente àquelas oriundas de microrganismos e plantas. Produtos naturais resultantes do metabolismo de microrganismos como, por exemplo, os fungos, apresentam inúmeras descrições e aplicações.

A contribuição de fungos no desenvolvimento da área agrícola e sua relação com plantas é bem conhecida. Bactérias e fungos micorrízicos arbusculares em associação simbiótica com plantas podem atuar como biofertilizantes, promovendo o crescimento vegetal, além de produzirem substâncias que aumentam a fertilidade do solo e protegem a planta contra patógenos (RAKLAMI *et al.*, 2019). Um exemplo é a micotoxina zearalenona, um estrogênio produzido por *Fusarium graminearum*, cujo derivado zearanol é utilizado em criações de bovinos e ovinos para aumentar o crescimento e a eficiência alimentar (NACHMAN; SMITH, 2015). Outra micotoxina, o ácido giberélico, é uma giberelina produzida por *Gibberella fujikuroi* amplamente utilizada como hormônio de crescimento vegetal em processos de produção de mudas micropropagadas (*in vitro*). Além de atuar no crescimento, pode ser usado para acelerar o processo de maltagem da cevada e melhorar a qualidade do malte, além de aumentar o rendimento de vegetais em menor tempo de cultivo (TUDZINSKI, 1999).

A associação simbiótica entre fungos e plantas medicinais é descrita em várias espécies e também favorece a produção de diversos metabólitos que atuam na proteção vegetal frente a diversos agentes externos, como patógenos e alterações ambientais, além de promoverem um melhor desenvolvimento da planta (BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010;

GARCIA *et al.*, 2012; ORLANDELLI *et al.*, 2012; RHODEN *et al.*, 2013). Um notório exemplo é o do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, o primeiro fungo produtor do paclitaxel (taxol), diterpeno com atividade antitumoral presente no extrato bruto de *Taxus brevifolia* Nutt., utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer (WANI *et al.*, 1971; STIERLE *et al.*, 1993; STROBEL *et al.*, 1993). Durante anos a obtenção do taxol era feita a partir da extração das cascas de árvores de *Taxus brevifolia*. Nesse processo eram necessárias cerca de 3000 árvores para se extrair 1 kg de composto, e esse dado levou a restrições ao acesso à planta, que corria risco de extinção (VIEGAS JR. *et al.*, 2006). Como consequência, a busca por fontes alternativas produtoras de taxol e de outros agentes antitumorais levou à descoberta dessa capacidade em fungos endofíticos como *Taxomyces andreanae*, isolado das cascas de *Taxus brevifolia* e *Pestalotiopsis microspora*, isolado das cascas de *Taxus wallichiana* (STIERLE, 1993; DEWICK, 1997).

Exemplos como esse demonstram as vantagens do uso de microrganismos na produção de substâncias bioativas. A possibilidade de cultivo em larga escala incrementa a produção de biomassa, reduz o tempo de crescimento e não promove degradação ambiental, o que se torna uma vantagem em relação aos estudos que utilizam plantas (FLORES-BUSTAMANTE *et al.*, 2010).

Ainda na área da saúde, as estatinas fúngicas como a lovastatina (produzida principalmente por *Aspergillus terreus*) e a pravastatina (produzida por *Penicillium citrinum*) podem ser obtidas também por produção semi-sintética e atuam como agentes hipocolesterolêmicos (MANZONI; ROLLINI, 2002). Devido a grande quantidade de indivíduos que sofrem com problemas decorrentes do colesterol elevado, as estatinas possuem extrema importância médica e fazem parte de um mercado de bilhões de dólares (ENDO, 1985).

Na culinária, o uso de fungos e seus derivados é conhecido desde a antiguidade. O consumo de cogumelos tem se tornado cada vez mais comum, sendo essa uma das mais ricas fontes de proteína. Diversos estudos abordam que os compostos fenólicos presentes em cogumelos como *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* e *Pleurotus ostreatus* apresentam propriedades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, antiteratogênica e hipoglicêmica (BARROS *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009; DORE *et al.*, 2007; FACCIN *et al.*, 2007; GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2010; GUILLAMÓN *et al.*, 2010; HOSSAIN *et al.*, 2003; YOSHINO *et al.*, 2008). Além de

servirem como alimento, países como a China e o Japão utilizam pigmentos avermelhados como a monascorubramina extraída do fungo *Monascus purpureus* no preparo de alimentos como arroz vermelho, vinho, carnes, peixes, dentre outros (JUZLOVA *et al.*, 1996).

Devido a esses e outros inúmeros exemplos conhecidos, a busca por moléculas produzidas por microrganismos é crescente, tendo em vista o número de espécies, especialmente de fungos, que ainda não foram descritas. Dessa forma, o uso de ferramentas da área das ômicas, principalmente da metabolômica, é o maior aliado em trabalhos de bioprospecção, podendo contribuir para a descoberta de moléculas de interesse biotecnológico.

## 2.2 FILO MUCOROMYCOTA

O filo Mucoromycota é formado por espécies fúngicas caracterizadas como bolores de crescimento rápido, os quais participam do processo de degradação de frutas com alto teor de açúcar, como o morango e a nectarina (KIRK, 2001). Seus representantes são fungos microscópicos, que habitam ecossistemas aquáticos e terrestres, possuem parede celular quitinosa e podem crescer rapidamente tanto na forma micelial quanto na forma de células unicelulares, ou também conhecido como leveduriformes (HOFFMANN *et al.*, 2013).

Esses fungos apresentam talo micelial, com hifas geralmente multinucleares e cenocíticas e podem apresentar septos adventícios que promovem a delimitação de células reprodutivas. Quando presente, a reprodução sexuada ocorre via zigósporos globosos, lisos ou ornamentados, que são formados por conjugação gametangial. A reprodução assexuada é feita via clamidósporos ou esporangiósporos (LEE; HEITMAN, 2014).

São microrganismos saprotróficos, que podem exercer associações simbióticas com raízes de plantas, atuar como fitopatógenos ou apresentar interações ecológicas raras com animais, por exemplo, quando associadas a infecções oportunistas (SPATAFORA *et al.*, 2016; TEDERSOO *et al.*, 2018).

### 2.2.1 A ORDEM MUCORALES

Mucorales representa a maior ordem de fungos pertencentes ao filo Mucoromycota, na qual estão inseridas cerca de 240 espécies e 50 gêneros (VOIGT; KIRK, 2014).

Este grupo engloba indivíduos terrestres, com características morfológicas diversificadas, hábito majoritariamente saprofítico, contendo algumas espécies parasitas e patogênicas. Os indivíduos apresentam distribuição cosmopolita, e podem ser encontrados em várias regiões ao redor do globo (HOFFMANN *et al.*, 2013). Seu sistema reprodutivo se diferencia de outras ordens devido à presença de uma estrutura denominada columela, que se projeta do ápice do esporangióforo para o interior do esporângio, delimitando a região onde estão contidos os esporangiósporos anamórficos, responsáveis pela reprodução assexuada. Por sua vez, a reprodução sexuada é realizada por zigósporos, estruturas reprodutivas mais primitivas presentes no filo. Essas estruturas reprodutivas são formadas pelo ácido trispórico, composto volátil, derivado do betacaroteno, que é responsável pelas projeções emitidas pelas hifas. Estas podem ser homotáticas ou heterotáticas, caso sejam do mesmo micélio ou de micélios distintos, respectivamente (VAN DEN ENDE, 1967; GOODAY, 1968; VOIGT; KIRK, 2014).

O cultivo *in vitro* demonstra crescimento acelerado e grande produção de biomassa, caracterizada normalmente por um micélio cenocítico. Com a variação do meio de cultura, algumas espécies apresentam dimorfismo, pois podem alternar seu tipo de crescimento entre o estágio multicelular (filamentoso) e o unicelular (leveduriforme) (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1962).

Fungos Mucorales são importantes contribuintes para a área industrial, uma vez que podem ser utilizados para diversas transformações biológicas, bem como para a produção de aditivos alimentícios e farmacêuticos, como o licopeno e a quitosana (SHAHIDI *et al.*, 1999; GŁADKOWSKI *et al.* 2004, 2011; HOFFMAN *et al.*, 2013). Espécies de *Absidia*, por exemplo, apresentam interesse biotecnológico, pois podem ser utilizadas em biotransformações microbianas, que colaboram para o desenvolvimento farmacêutico e econômico (HOFFMANN, 2010).

Para as espécies *Mucor* spp., *Phycomyces blakesleeanus* e *Blakeslea trispora*, melhorias no cultivo de algumas estirpes promoveram aumento na produção de carotenoides, ubiquinona, ergosterol, ácidos orgânicos, óleos comestíveis, assim como outros produtos de interesse (KAVADIA *et al.*, 2001; MAGNUSON & LASURE, 2004; KUZINA; CERDÁ-OLMEDO, 2007), enquanto espécies de *Cunninghamella* são comumente utilizadas em processos de biorremediação (YAN; VIRARAGHAVAN, 2003; ZAFAR *et al.*, 2007). Na culinária asiática, espécies de *Rhizopus* são utilizadas na produção

de *tempeh*, alimento fermentado à base de arroz (HESSELTINE, 1986; NOUT & KIERS, 2005; ALVAREZ, 2013).

Representantes dessa ordem estão envolvidos com situações que podem comprometer a saúde humana de diversas formas, incluindo a contaminação de alimentos, como cereais estocados, frutas e verduras, e o desenvolvimento de patologias, tanto em vegetais quanto em animais (MARTIN, 1964; WADE; MORRIS, 1982; RAY; RAVI, 2005). Ademais, a termotolerância apresentada por alguns gêneros, como *Cokeromyces*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Cunninghamella*, também está associada a casos médicos e veterinários (DE HOOG *et al.*, 2000; LIU, 2011).

Devido às características previamente relatadas, tal como o alto rendimento de biomassa, as espécies utilizadas no presente trabalho foram obtidas com o interesse na produção de quitosana a partir da biomassa fúngica, projeto desenvolvido em nosso grupo de pesquisa por Cortez (2018). As pesquisas sobre as espécies resultaram em poucos estudos sobre o uso desses microrganismos no campo da Biotecnologia; havia alguns trabalhos sobre a produção de enzimas quitina deacetilases, responsáveis pela transformação de quitina em quitosana, mas nenhum sobre os metabólitos secundários produzidos por esses fungos. Dessa forma, esse trabalho surgiu com o intuito de conhecer melhor os metabólitos secundários produzidos pelos fungos Mucorales dos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*, inseridos em duas famílias: Mycotyphaceae e Thamniaceae, as quais serão brevemente descritas a seguir.

#### 2.2.1.1 FAMÍLIA MYCOTYPHACEAE BENNY & R.K. BENJ.

Estabelecida em 1985, a família Mycotyphaceae inclui, entre outros, o gênero *Mycotypha*. Caracteriza-se pela formação de uma zona circunscrita de deiscência na junção do pedicelo e do denticulo, o que facilita a liberação da esporangiola e do pedicelo. Espécies de *Mycotypha* formam vesículas cilíndricas, férteis, com esporangiola dimórfica e unispórica anexada por denticulos (ÁVILA *et al.*, 2007). Em meios de cultura ricos em nutrientes, o crescimento de células leveduriformes se dá de forma rápida e abundante. Todas as espécies são saprófitas e são isoladas do estrume e do solo (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

### 2.2.1.2 FAMÍLIA THAMNIDIACEAE FITZP.

As espécies pertencentes a essa família produzem esporos únicos ou múltiplos, columela e esporangiola, que surge diretamente do esporangióforo ou das vesículas férteis. Alguns gêneros também produzem esporângios columelados, com parede deliquescente no ápice do principal esporangióforo ou de seus ramos principais. Os zigósporos possuem zigosporângios com paredes ásperas e alguns representantes da família podem produzir esporângio e esporangiola no mesmo esporangióforo.

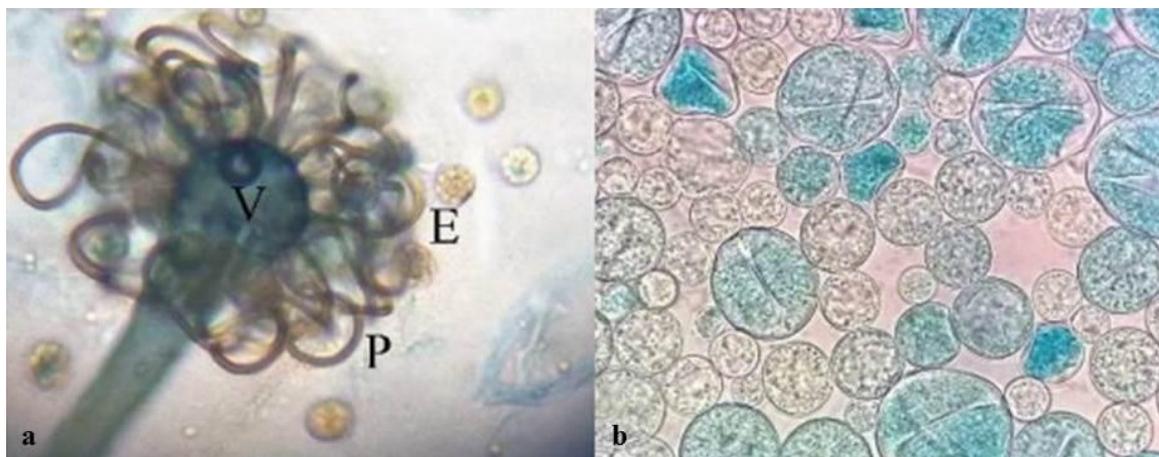
Inclui microrganismos especialmente comuns em estrume e que podem ser isoladas do solo e de alimentos, como carne refrigerada (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Entre elas, *Cokeromyces* é caracterizado por seu crescimento lento, e está associado ao desenvolvimento de doenças, como será abordado posteriormente. Já *Benjaminiella* apresenta alternância de crescimento entre as formas filamentosa e leveduriforme, sendo referência para estudos de dimorfismo e de regulação de genes de quitina sintase (CHITNIS *et al.*, 2002).

## 2.3 ESPÉCIES UTILIZADAS NO TRABALHO

### 2.3.1 *COKEROMYCES RECURVATUS* POITRAS

*Cokeromyces recurvatus* é um fungo dimórfico, pertencente à família Thamniaceae, com distribuição geográfica entre os Estados Unidos e o México (NIELSEN *et al.*, 2005; PARKER *et al.*, 2011). Foi isolado pela primeira vez em 1949, a partir de fezes de coelho, podendo ser encontrado em forma de tapete sobre excrementos de lagartos e roedores. Apresenta células leveduriformes de morfologia esférica e tamanho variável entre 30 e 90  $\mu\text{m}$  (Figura 1). A propriedade de dimorfismo é dependente de variáveis como a composição do meio de cultura, a temperatura de incubação e a disponibilidade de  $\text{O}_2$ . (RIBES *et al.*, 2000).

Figura 1. *Cokeromyces recurvatus*. a) cultivo micelial: V - vesícula; P - pedicela; E - esporangiola contendo esporos; b) cultivo leveduriforme.



Fonte: Cortez (2018).

Existem poucos casos relatados de pacientes infectados com *C. recurvatus*. Porém, entende-se que esse microrganismo atua como patógeno oportunista, contribuindo para a patogênese da inflamação intestinal em pacientes imunocomprometidos. Como exemplo disso, um estudo relatou o primeiro caso de infecção fatal, causada por *C. recurvatus*, em paciente receptor de transplante de medula óssea. Neste caso, o paciente desenvolveu uma pneumonia que o levou a óbito. Por meio de técnicas histoquímicas, o microrganismo presente nas culturas foi identificado como *Coccidioides*, porém técnicas adicionais de diagnóstico concluíram que o patógeno responsável pela infecção era *C. recurvatus* (RYAN *et al.*, 2011). A infecção por essa espécie em paciente recém-transplantado já havia sido relatada por Tsai e colaboradores (1997), em estudo no qual o indivíduo apresentou sintomas de diarreia. Nesse caso, o sucesso do controle da infecção se deu mediante a utilização de nistatina.

Apesar de ser uma condição rara, células leveduriformes da espécie também já foram encontradas em secreções vaginais, urina, fezes, cérvix e trato gastrointestinal (RAMANI *et al.*, 2000; PARKER *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos demonstram também casos veterinários de infecções causadas por *C. recurvatus*. Em 2005, Nielsen e colaboradores relataram um caso no qual um felino apresentando perfuração no jejuno e neoplasia estava infectado com *C. recurvatus*. Parker e colaboradores (2011) noticiaram a presença do mesmo fungo em um cão com perda de peso, falta de apetite, diarreia e vômito.

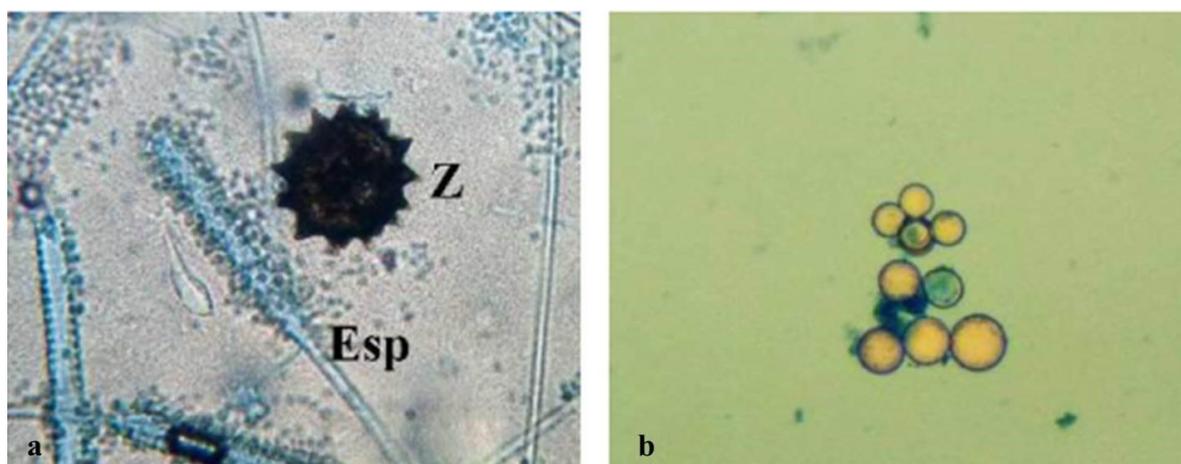
### 2.3.2 GÊNERO *MYCOTYPHA* FENNER

As espécies inseridas neste gênero possuem vesícula fértil cilíndrica com esporangiola unispórica anexada por denticulos (Figura 2a). Os zigósporos possuem suspensores opostos e os esporóforos não septados estão localizados abaixo da vesícula. Eles possuem morfologia ovoide ou cilíndrica e tamanho variável; as hifas são cenocíticas e levemente septadas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

#### 2.3.2.1 *MYCOTYPHA INDICA* P.M. KIRK & BENNY

Os indivíduos dessa espécie apresentam rápido crescimento em meio MEYE (extrato de malte e extrato de levedura), com colônias de diâmetro variável entre 4 e 6 cm. A espécie pode causar zigomicoses em humanos, animais, além de ocorrer como contaminante em carne armazenada (BENJAMIN, 1959). Sua distribuição normalmente ocorre nos trópicos e subtropicais, principalmente nos Estados Unidos, México, China, Índia (BENNY *et al.*, 1985) e Venezuela (ÁVILA *et al.*, 2007). É comumente encontrado em fezes de roedores e de aves.

Figura 2. *Mycotypha indica*. a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; Z – zigósporo; b) cultivo leveduriforme.



Fonte: Cortez (2018).

### 2.3.2.2 *MYCOTYPHA MICROSPORA* FENNER

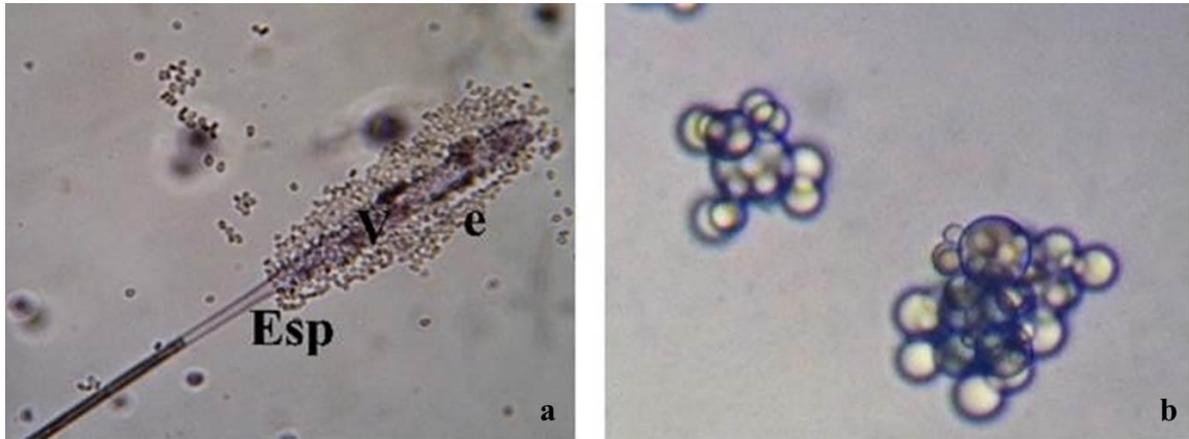
Em cultivo leveduriforme essa espécie apresenta células com paredes finas e crescimento denso. As colônias crescem inicialmente com coloração acinzentada e, após certo tempo, se tornam castanhas. A análise microscópica demonstra que as hifas são cenocíticas e que a espécie produz uma vesícula fértil cilíndrica e septos no ápice e na base do esporóforo, que possui de 3 a 4 mm de altura (Figura 3). Quando madura, e antes da deiscência, tal vesícula é completamente coberta pela esporangiola. Nessa espécie, diferentemente das demais, não são observados zigósporos (BENNY; BENJAMIN, 1976; BENNY *et al.*, 1985).

Lacroix e colaboradores (2007) relataram um caso no qual culturas de *M. microspora* foram isoladas de amostras de fezes de uma criança portadora de leucemia mieloide aguda que, durante o tratamento, apresentou um quadro de diarreia severa. De acordo com os autores, não se sabe se o fungo foi o causador da diarreia. Acredita-se que ele foi adquirido pela criança por meio da alimentação. Após a completa remissão da leucemia, foram feitos três tratamentos para consolidação e não houve qualquer suspeita de infecção fúngica.

### 2.3.2.3 *MYCOTYPHA AFRICANA* R.O. NOVAK & BACKUS

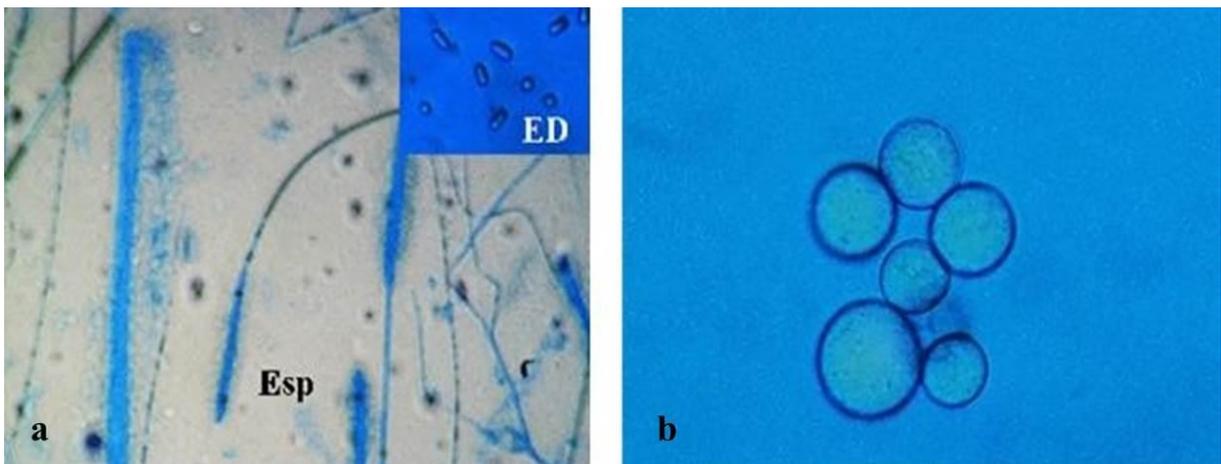
Descoberta em 1963 na região da Rodésia, atualmente conhecida como Zimbábue, essa espécie pertence à classe dos zigomicetos. Trata-se do primeiro organismo da árvore filogenética dos fungos que perdeu seu flagelo na forma esporofítica. Diferencia-se de *M. indica* devido ao formato cilíndrico da esporangiola, contendo extremidades arredondadas (Figura 4a), enquanto *M. indica* possui tal estrutura amplamente elipsoide ou ovoide (ÁVILA *et al.*, 2007).

Figura 3. *Mycotypha microspora*. a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiólas e esporos liberados; V – vesícula; e – esporos; b) cultivo leveduriforme.



Fonte: Cortez (2018).

Figura 4. *Mycotypha africana*. a) cultivo micelial; Esp – esporóforo com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiólas e esporos; ED – esporos dimórficos; b) cultivo leveduriforme.



Fonte: Cortez (2018).

### 2.3.3 GÊNERO *BENJAMINIELLA* ARX

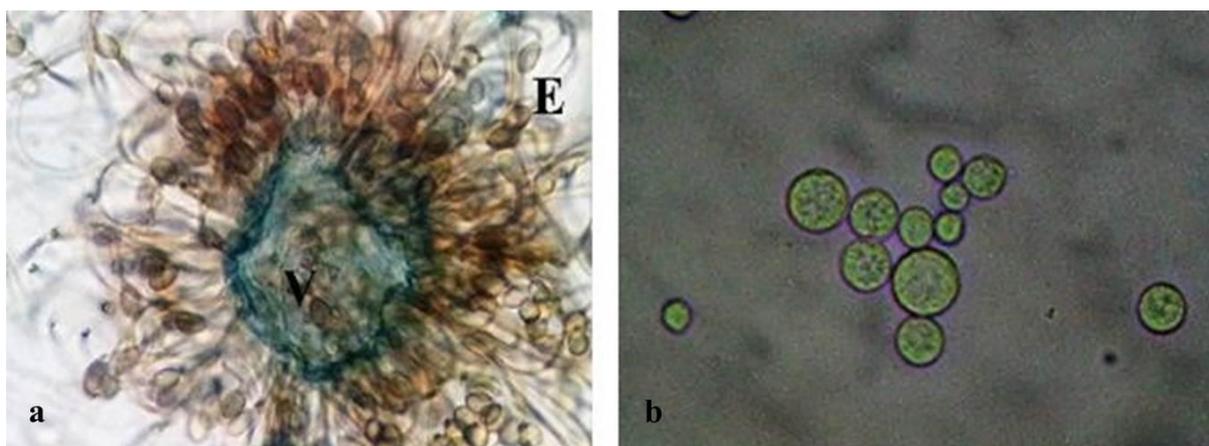
Espécies desse gênero produzem esporangióla em pedicelos relativamente longos, curvos, torcidos e não ramificados, que se formam sobre toda a superfície da vesícula fértil, formada no ápice do esporangióforo ou de seus ramos (Figura 5).

Fungos do gênero *Benjaminiella* são homotáticos, possuem zigospórângio com parede pigmentada e ornamentada e zigósporo com parede hialina (BENNY *et al.*, 1985; KIRK, 1989).

### 2.3.3.1 *BENJAMINIELLA POITRASII* (R.K. BENJ.) ARS

Essa espécie não patogênica foi inicialmente inserida nos gêneros *Cokeromyces* e *Mycotypha*, sendo amplamente utilizada como modelo para estudos de dimorfismo em fungos devido à sua grande capacidade de variar entre uma e outra forma de crescimento, dependendo das condições do meio de cultura (GHORMADE *et al.*, 2000). Análises químicas na parede celular revelaram diferenças nas proporções de quitina e quitosana entre células leveduriformes e células miceliais dessa espécie. Isso sugere que o metabolismo da quitina e a atividade da quitina sintase podem ser reguladas durante o processo de morfogênese em *B. poitrasii* (KHALE; DESHPANDE, 1992; CHITNIS *et al.*, 2002).

Figura 5. *Benjaminiella poitrasii*. a) cultivo micelial; V: vesícula; E: esporangiola com um esporo; b) cultivo leveduriforme.

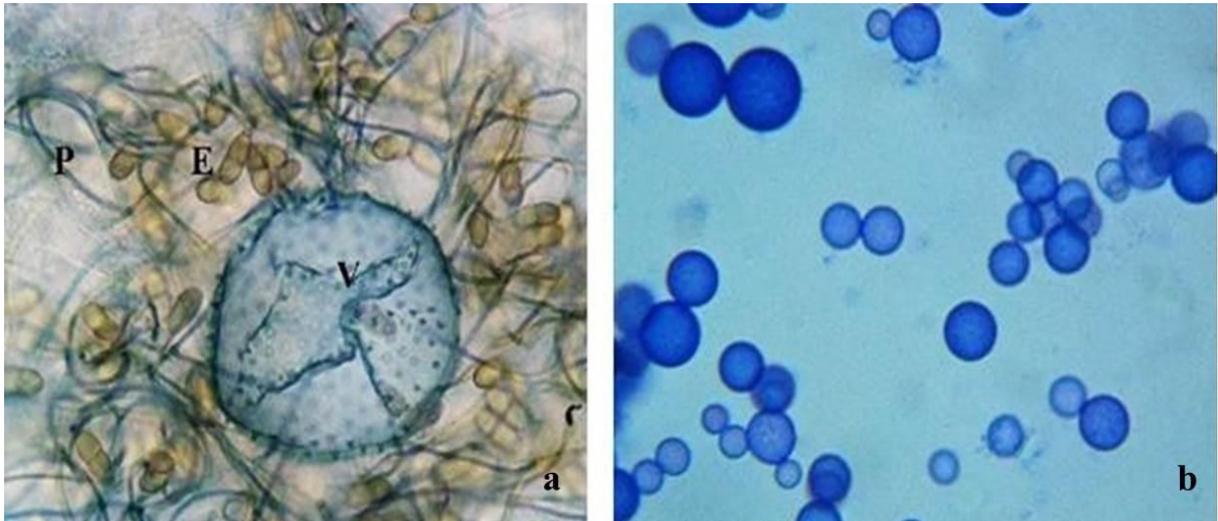


Fonte: Cortez (2018).

### 2.3.3.2 *BENJAMINIELLA YOUNGII* P.M. KIRK

Essa espécie apresenta vesículas férteis lisas e globosas, com pedicelos em tamanhos variáveis e esporangiolas contendo, normalmente, dois esporos (Figura 6). As células leveduriformes são hialinas e globosas, com diâmetro aproximado de 20  $\mu\text{m}$  (SILVA, 1996).

Figura 6. *Benjaminiella youngii*. a) cultivo micelial; P – pedicela; E – esporangiola; V – vesícula; b) cultivo leveduriforme.

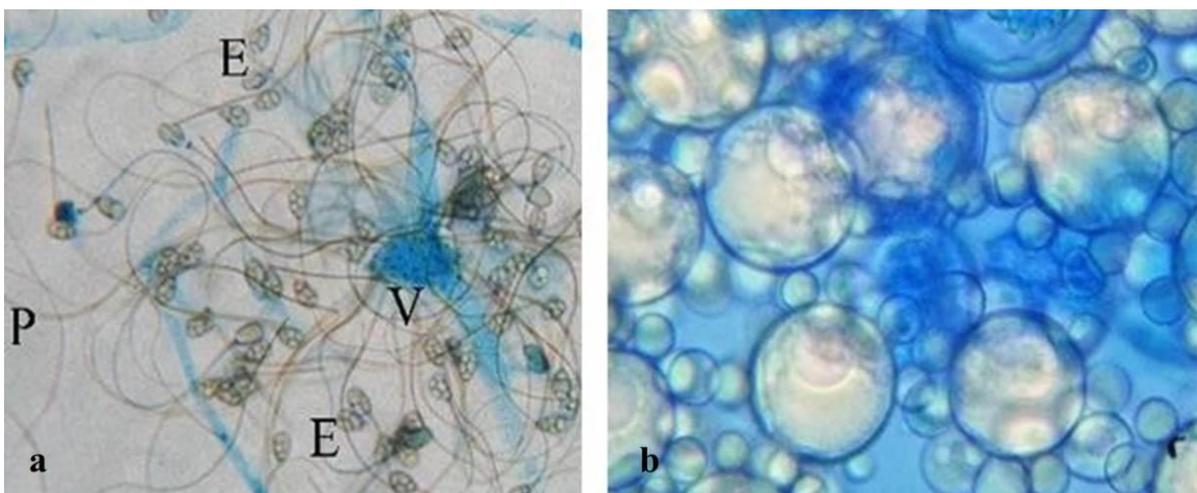


Fonte: Cortez (2018).

#### 2.3.3.3 *BENJAMINIELLA MULTISPORA* BENNY, SAMSON & M.C. SRINIV.

A forma filamentosa dessa espécie apresenta vesícula pequena e ovoide (Figura 7), pedicelos longos e esporangiola contendo múltiplos esporos, característica diferencial da espécie. Em crescimento leveduriforme as células são numerosas, globosas e lisas.

Figura 7. *Benjaminiella multispora*. a) cultivo micelial; P – pedicela; E – esporangiola; V – vesícula; b) cultivo leveduriforme.



Fonte: Cortez (2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FUNGOS UTILIZADOS

As espécies utilizadas neste trabalho pertencem a três gêneros e duas famílias distintas: *Benjaminiella multispora*, *B. poitrasii*, *B. youngii* e *Cokeromyces recurvatus* da Família Thamnidiaceae; *Mycotypha africana*, *M. indica* e *M. microspora* da Família Mycotyphaceae.

As estirpes foram adquiridas das seguintes coleções de culturas: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (*B. multispora*, *B. youngii* e *M. indica*), ARS Culture Collection – NRRL (*B. poitrasii* e *C. recurvatus*), Fundação André Tosello (*M. africana*) e do Jardim Botânico de São Paulo/Instituto de Botânica – Núcleo de Pesquisas em Micologia (*M. microspora*).

#### 3.2 MEIOS DE CULTURA E PREPARO DO INÓCULO

Os cultivos iniciais foram feitos na forma micelial e leveduriforme para verificar se as espécies apresentariam crescimento dimórfico satisfatório. O cultivo micelial foi realizado em meio YPG, sendo a composição em g L<sup>-1</sup>: peptona (3,0), extrato de levedura (5,0), glicose (variável: 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50,0 e 100,0); ágar (20,0), pH 6.5 ± 0,2 (CORTEZ, 2018, modificado de KHALE; DESHPANDE, 1992). O caldo YP (Y-phase) foi utilizado no cultivo leveduriforme, em g L<sup>-1</sup>: glicose (20,0), peptona (20,0), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (10,0), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (10,0), glutamato (0,188), pH 5.0 ± 0,2 (CORTEZ, 2018, modificado de JEFFRIES; KIRK, 1976).

O ajuste de pH foi feito utilizando hidróxido de sódio e ácido clorídrico, de acordo com a necessidade e os meios esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Os meios contendo ágar foram vertidos em placas de Petri de tamanho normal (90 mm de diâmetro) e pequeno (50 mm de diâmetro).

Os inóculos leveduriformes foram preparados em tubos tipo Falcon de 50 mL com caldo YP em BOD a 30±2 °C e cultivados por 72 h, sem agitação. Após o cultivo, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas com solução salina 0,85% (5x), submetidas à contagem e os inóculos mantidos em geladeira a 4 °C por no máximo 24 h até serem transferidos assepticamente para novos frascos de cultivo (MIURA *et al.*, 2003). A contagem foi feita utilizando câmara de Neubauer e os inóculos foram padronizados para concentrarem 10<sup>9</sup> células por litro de meio cultivado (LIU *et al.*, 2006).

As cepas demonstraram melhor crescimento no cultivo leveduriforme, sendo esse o tipo de cultivo empregado nesse trabalho. Dessa forma, foram feitos novos cultivos em tubos de 50 mL contendo mesmo volume de meio YP com 2,5 g de glicose. Para obter a aeração necessária, foram utilizados frascos de cultivo aerado (*baffled shake flasks*) com três aletas laterais. Os frascos foram vedados com tampão, protegidos com papel alumínio e PVC, e esterilizados a 121 °C por 15 min e os cultivos incubados em estufa a 25 °C  $\pm$ 2 por 96 h e 90 rpm de agitação.

### 3.3 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO DE CULTURA

A biomassa proveniente dos cultivos foi separada do meio de cultura por filtração e centrifugação a 1680 g por 30 min. O meio de cultura (sobrenadante) foi então utilizado para as análises que estão posteriormente descritas neste trabalho, sendo denominado de meio fermentativo, enquanto a biomassa foi utilizada em outro projeto para a produção de quitina e quitosana.

O meio fermentativo foi liofilizado e utilizado nas análises descritas a seguir.

### 3.4 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para a análise da composição química dos metabólitos secretados para o meio fermentativo foram empregadas as técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para a verificação da absorvância das moléculas por varredura UV-Vis o meio de cultura fermentativo foi diluído em água destilada na proporção 1:10 e um volume de 250  $\mu$ L foi analisado. A leitura foi feita de 200 a 750 nm em leitor de microplacas Gold Spectrum (BEL Photonics, software Softmax Pro). A investigação dos grupos funcionais dos compostos majoritariamente presentes nos extratos foi feita utilizando a técnica de FTIR em pastilha de brometo de potássio (KBr) (modelo Alpha, Bruker), a qual foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros foram processados utilizando o software Essential®.

### 3.5 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Para reduzir os efeitos de matriz complexa, uma vez que os extratos se originaram do meio de cultura, foi realizada uma extração em fase sólida (SPE) para a remoção dos açúcares presentes nas amostras (FERRERES *et al.*, 1991, com modificações).

O meio fermentativo de cada extrato foi filtrado manualmente em um sistema simples, constituído por uma seringa de 5 mL, um cartucho de coluna C18 (Agilent) e um tubo de ensaio. Primeiramente, foi feito o condicionamento dos cartuchos para receber as amostras. Para isso, foram realizadas três lavagens com metanol e duas lavagens com água ácida (água destilada acrescida de ácido clorídrico (HCl 1M) até atingir o pH 2,0). Em seguida, 100 mg de cada amostra foram dissolvidos em 2 mL de água destilada e inseridos no cartucho, onde o conteúdo foi esvaziado lentamente com 50 mL de água ácida. O procedimento foi repetido até que o líquido escoado se tornasse transparente e, em seguida, cada amostra foi lavada com 50 mL de água destilada. O líquido extraído foi descartado e o conteúdo retido na sílica foi lavado com 25 mL de metanol. Para auxiliar na retirada dos compostos retidos, foram adicionadas algumas gotas de HCl até que o conteúdo saísse transparente e o material foi coletado em frascos de vidro. A concentração dos extratos foi realizada em evaporador rotatório a vácuo com banho de 60 °C e 120 rpm. Os extratos concentrados foram armazenados em *vials* e pesados.

### 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-MS)

Após o processo de rotaevaporação, as amostras foram solubilizadas em metanol grau LC-MS para uma concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Após diversos testes para verificação do sistema mais adequado de solventes para a separação dos compostos, a fase móvel foi definida e está descrita a seguir, juntamente com os parâmetros das corridas. O equipamento utilizado foi o MicrOTOF-QII (Bruker) acoplado ao cromatógrafo líquido (Shimadzu), localizado no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas do CEBIME (Centro de Biologia Molecular Estrutural) da UFSC.

A fase móvel utilizada foi MeOH/H<sub>2</sub>O (solvente B) e H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 0,1% (solvente A) em taxa de fluxo de 1 mg mL<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição utilizado foi B:A,

iniciando com 20% B, aumentando para 60% B (2 min) , 85% B (25 min), 85% B (35 min), 20% B (45 min). Foi utilizada a coluna de octadecil Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm e tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , Agilent). O volume de injeção aplicado foi de 10  $\mu\text{L}$ , fluxo de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  e temperatura do forno de 40  $^{\circ}\text{C}$ . O tempo total de eluição variou de 48 a 53 minutos e a fonte de ionização foi por *electrospray* (ESI).

O mesmo padrão foi utilizado para as análises controle, feitas somente com a fase móvel sem a presença das amostras. As eluições foram feitas no modo *tune-low*, no qual normalmente são registrados picos de substâncias que possuem massas de menor peso molecular, como é o caso das micromoléculas, que normalmente se enquadram na categoria de metabólitos secundários. Como a estrutura química das moléculas produzidas por esses fungos não é conhecida, optou-se por realizar uma varredura em moléculas cuja ionização se daria em modo positivo  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  e negativo  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$  em um intervalo de  $m/z$  entre 50 e 800 Da.

A fragmentação dos picos de maior intensidade (MS/MS) e os espectros foram processados pelo software Compass Bruker Data Analysis 4.2®, interpretados com o auxílio dos bancos de massas MassBank®, MetFrag® e PubChem® e comparados com a literatura.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CRESCIMENTO DOS FUNGOS NOS DOIS TIPOS DE CULTIVO

Os cultivos iniciais feitos para verificação do crescimento dimórfico demonstraram que as espécies cresceram melhor na forma leveduriforme. *Mycotypha africana* apresentou crescimento leveduriforme a 37 °C independente da concentração de glucose. *M. indica* também apresentou crescimento leveduriforme a 37 °C na presença de glucose a uma concentração de 2%. *Benjaminiella multispora* e *Cokeromyces recurvatus* apresentaram crescimento dimórfico em baixas concentrações de glucose (1%) e temperatura de 30 °C. *B. poitrasii* e *B. youngii* apresentaram crescimento apenas leveduriforme em todas as situações impostas. *M. microspora* cresceu somente na forma micelial e, mesmo nessa condição, apresentou pouco crescimento.

Uma vez que o interesse era padronizar os tipos de cultivo, sendo a forma leveduriforme o tipo preferencial de crescimento para cultivos em larga escala, a espécie *M. microspora* foi descartada.

### 4.2 ANÁLISE QUÍMICA DOS METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS

Em geral, fungos leveduriformes secretam os metabólitos secundários que produzem para o meio extracelular. Apesar dessas substâncias não exercerem funções essenciais para o crescimento dos microrganismos, funcionam como mecanismo de defesa frente a diversos interferentes, como variações na temperatura e pH, patógenos, estresse, deficiência de nutrientes, dentre outros fatores.

O foco deste trabalho foi analisar o conteúdo metabólico extracelular somente dos fungos que foram cultivados na forma leveduriforme devido ao menor tempo de crescimento e à facilidade de cultivo e manuseio de organismos unicelulares. Além disso, quando se visa à produção de biomassa em larga escala, por meio da utilização de biorreatores, o cultivo micelial pode se tornar um processo dificultado por alguns fatores, como problemas na agitação das pás e entupimento de reatores de tanque agitado, ocasionados pela presença de filamentos de micélio. Desta forma, do ponto de vista biotecnológico, o cultivo leveduriforme se torna a melhor opção.

A detecção de analitos extraídos do ambiente ou de amostras ricas em açúcar, como foi o caso dos extratos utilizados neste trabalho, pode ser influenciada pelos efeitos de matriz, causados por interferentes presentes na amostra. Normalmente, a influência desse efeito é mitigada pelo uso de padrões internos nas análises. No entanto, como a natureza das substâncias presentes nos extratos era desconhecida, a utilização de padrões não era uma opção viável. Após a extração de fase sólida (SPE) as amostras perderam grande parte de sua massa, tendo em vista a retirada das partículas que não eram de interesse. Os rendimentos finais obtidos para cada amostra estão descritos na tabela 1, onde pode ser verificada uma perda de massa significativa após a SPE. A adição de ácido para auxiliar na eluição das amostras da sílica resultou em rendimentos diferentes entre as espécies. Enquanto que para *M. indica*, a adição de ácido resultou na diminuição do rendimento final, para *B. youngii* e *B. multispora* foi observado um aumento. Para *B. poitrasii*, *M. africana* e *C. recurvatus* o rendimento se manteve. Não foi possível identificar os fatores possíveis para explicar as diferenças de rendimento entre as amostras.

Tabela 1. Rendimentos das amostras após procedimento de extração de fase sólida (SPE).

<b>Amostra</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Rendimento final (g)</b>
Mi MeOH	0,2534	0,0035
Mi MeOH + ácido	–	0,0021
By MeOH	0,1966	0,0009
By MeOH + ácido	–	0,0153
Bm MeOH	0,3549	0,0002
Bm MeOH + ácido	–	0,0186
Bp MeOH	0,1752	0,0006
Bp MeOH + ácido	–	0,0006
Ma MeOH	0,3282	0,0005
Ma MeOH + ácido	–	0,0005
Cr MeOH	0,1335	0,0003
Cr MeOH + ácido	–	0,0003

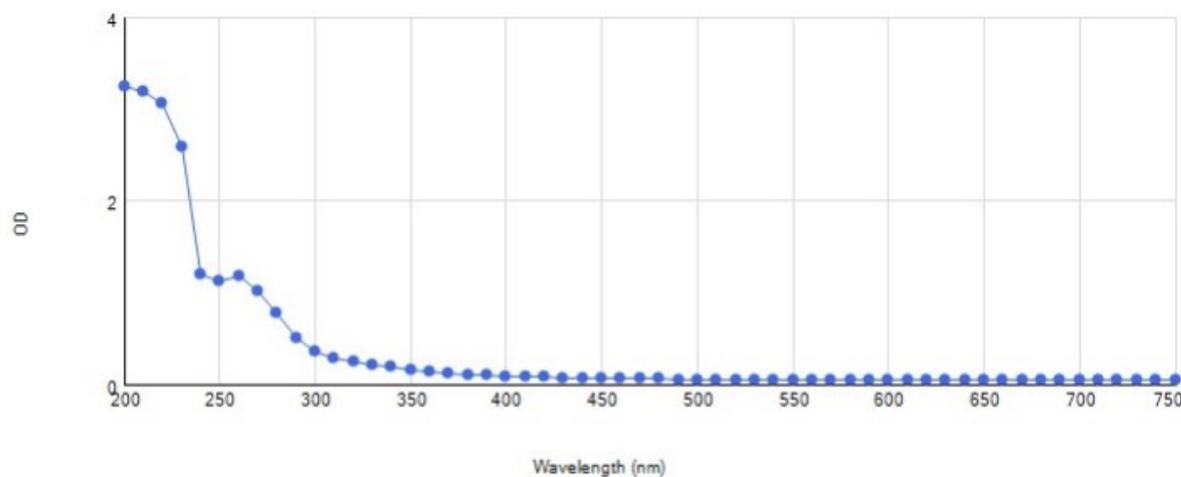
Mi – *Mycotypha indica*, By – *Benjaminiella youngii*, Bm – *Benjaminiella multispora*, Bp – *Benjaminiella poitrasii*, Ma – *Mycotypha africana*, Cr – *Cokeromyces recurvatus*, MeOH - metanol

O símbolo (–) indica que o rendimento inicial não se aplica.

Fonte: elaborada pela autora (2019).

A análise por varredura UV-Vis demonstrou que os compostos absorvem radiação na região UV (até 350 nm), o que indica a presença de compostos orgânicos não pigmentados (Figura 8).

Figura 8. Espectro de varredura UV-Vis obtido para todas as espécies em comprimento de onda de 200 a 750 nm.



Fonte: Autora (2019).

A tabela 2 exibe os grupamentos funcionais encontrados no extrato de *M. africana* após análise por FTIR utilizando pastilha de KBr. Para os demais extratos foram obtidas as mesmas frequências, portanto, o mesmo padrão de bandas foi observado em todas as outras espécies.

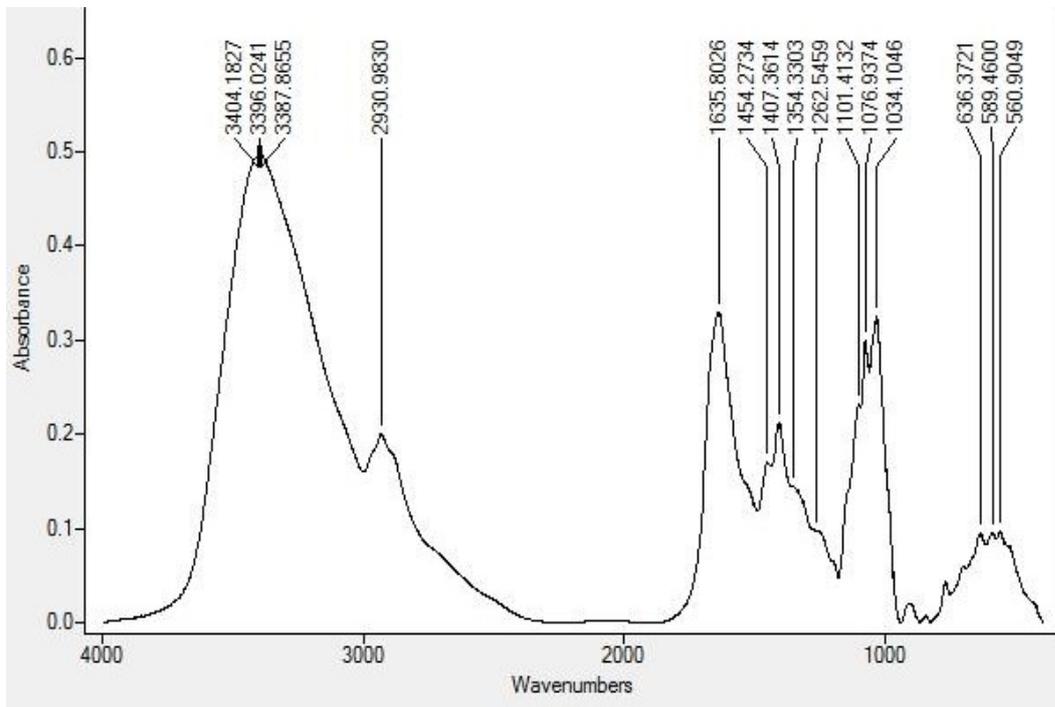
A análise das bandas mostrou a presença de ligações O–H, C–H, N–H, C–C, C–O, C–Cl, indicando que álcoois, fenóis, aminas primárias e secundárias, anéis aromáticos, alcanos, alcenos, dentre outros estão entre os grupos funcionais presentes nas amostras (Figuras 9 a 14).

Tabela 2. Bandas obtidas para *M. africana* em FTIR utilizando pastilha de KBr.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Ligação	Grupo funcional
3383.7862	O-H, H	Álcool, fenol
2926.9037	C-H	Alcano
1637.8423	N-H	Amina primária / secundária
1452.2337	C-H	Alcano
1407.3614	C-C	Anel aromático
1280.9028	C-H C-O C-H	Alcano, álcool, ac. carboxílico, éster, éter, amina aromática
1260.5063	C-O C-N	Alcano, álcool, ac. carboxílico, éster, éter, amina aromática
1199.3166	C-H	Amina alifática
1101.4132	C-O	Álcool, ac. carboxílico, éster, éter
1076.9374	C-N	Amina alifática
1032.0650	C-N C-O	Amina alifática Álcool, ac. carboxílico, éster, éter
911.7254	O-H	Ácido carboxílico
899.4875	=C-H C-H	Alceno Aromático
844.4168	C-Cl	Haloalcano
770.9893	C-H C-Cl	Aromático Haloalcano
703.6807	N-H C-H	Amina Aromático

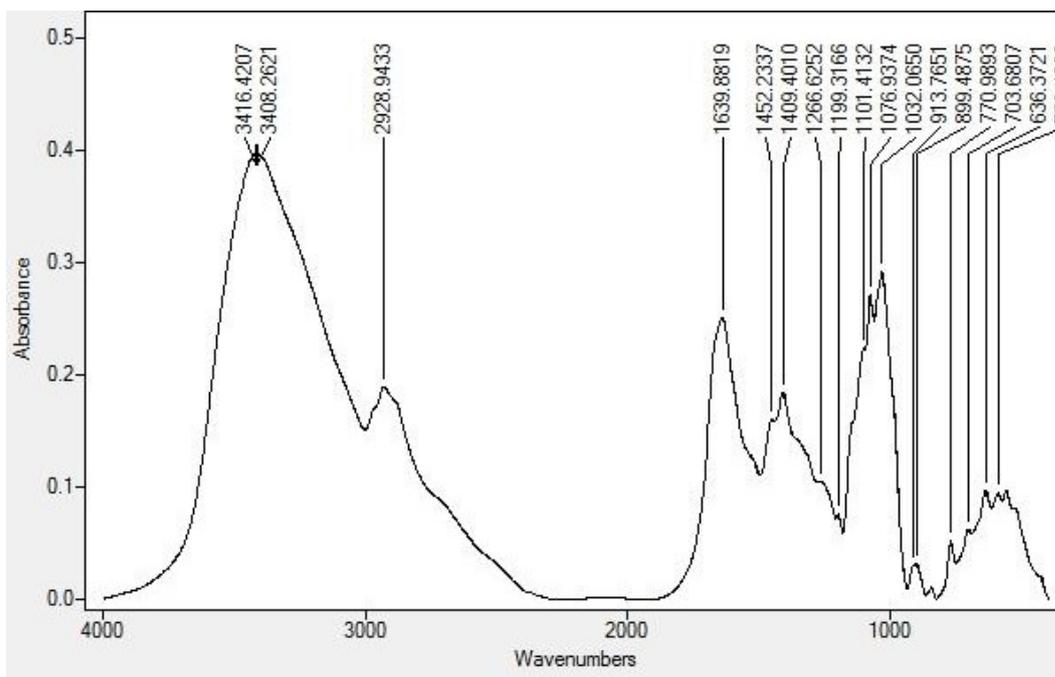
Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 9. Espectro de FTIR de *C. recurvatus*.



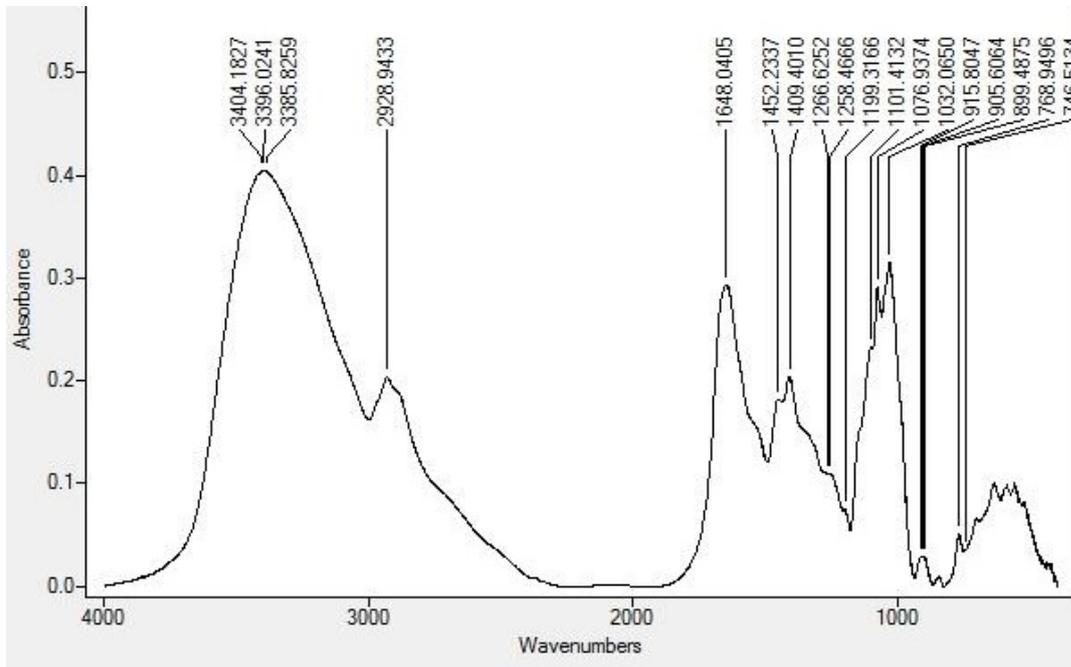
Fonte: Autora (2019).

Figura 10. Espectro de FTIR de *M. indica*.



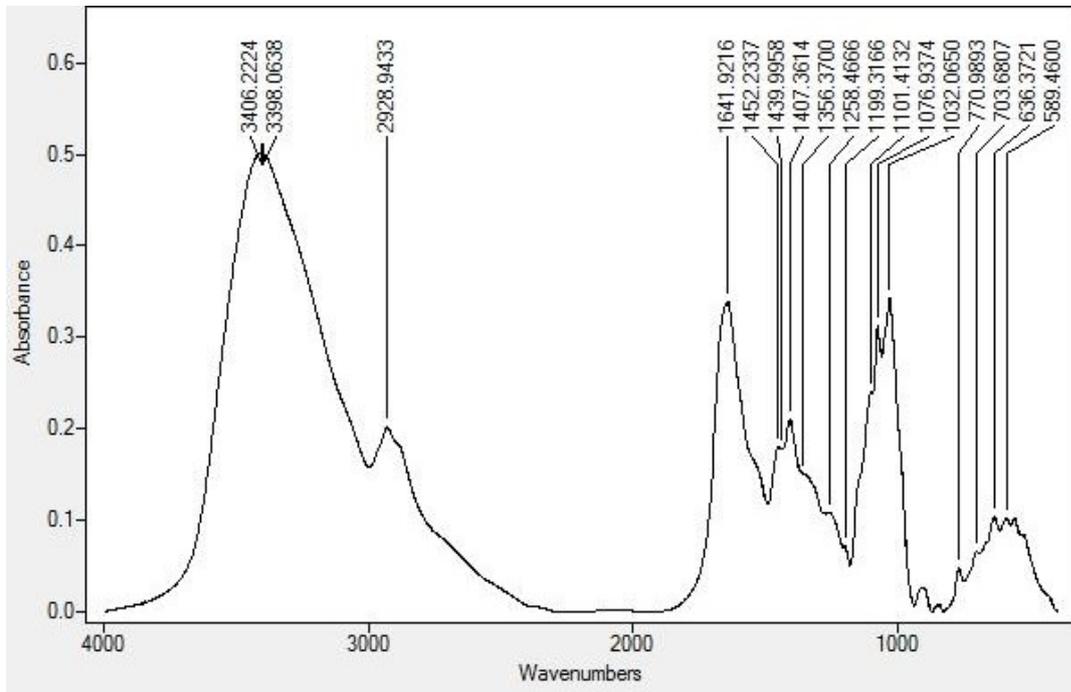
Fonte: Autora (2019).

Figura 11. Espectro de FTIR de *B. multispora*.



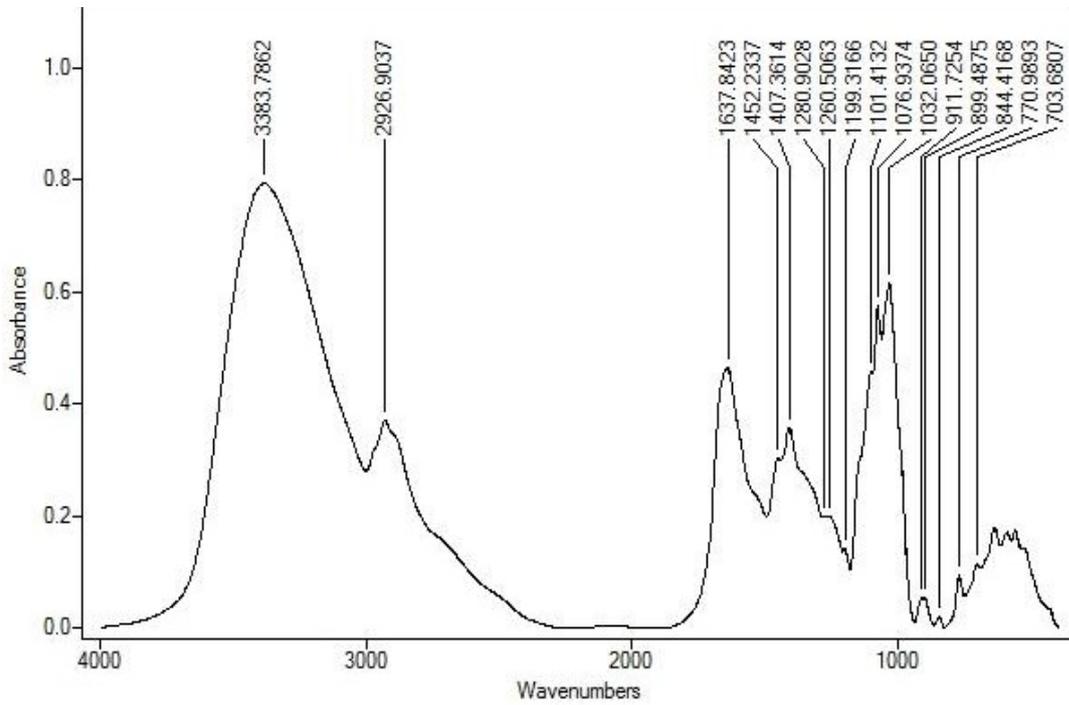
Fonte: Autora (2019).

Figura 12. Espectro de FTIR de *B. poitrasii*.



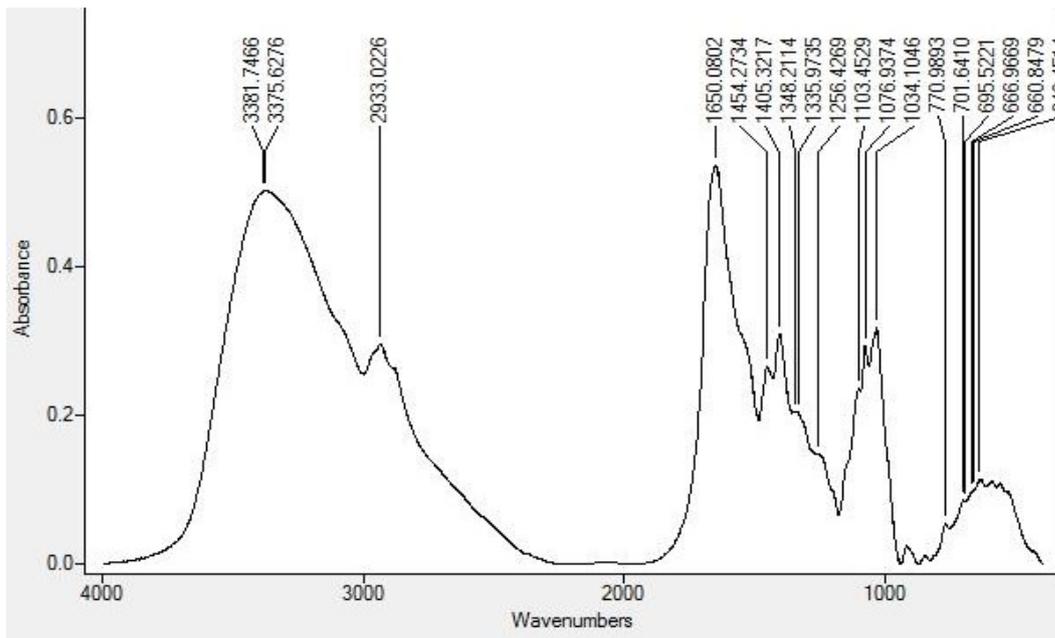
Fonte: Autora (2019).

Figura 13. Espectro de FTIR de *M. africana*.



Fonte: Autora (2019).

Figura 14. Espectro de FTIR de *B. youngii*.



Fonte: Autora (2019).

### 4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após o processo de rotaevaporação, não foi possível obter a completa secagem das amostras de *B. poitrasii*, o que se tornou um fator limitante na execução da análise por HPLC-MS para essa espécie. Por consequência, *B. poitrasii* foi excluída do trabalho e seus cromatogramas não foram incluídos. Para as demais espécies a interpretação dos espectros gerados, assim como a análise das massas obtidas, foi feita com base na literatura e nos bancos de dados e massas, como previamente descritos no item 5.4.2. O equipamento utilizado possui uma acurácia de massa de 1–2 ppm, de modo que a margem de erro pode ser considerada baixa. Seguindo essa especificação, para este trabalho foram consideradas, inicialmente, ao menos duas casas decimais na busca por compatibilidade de substâncias com massas registradas nas bases de dados. Após a obtenção da lista de substâncias sugeridas foi feita uma triagem dos metabólitos possíveis com base na literatura e no que já havia sido descrito para outros fungos. Foram descartadas as sugestões que se tratavam de compostos sintéticos ou de produtos incomuns do metabolismo de microrganismos. Sendo assim, diversas substâncias com massas não descritas não foram encontradas nas buscas e permaneceram com a identidade desconhecida.

Para todos os extratos, o modo negativo funcionou melhor e foi possível observar espectros com picos bem separados e definidos (Figuras 15 a 24). Por outro lado, o modo positivo não promoveu uma separação adequada das substâncias, sendo possível observar a presença de picos apenas nos espectros de *M. africana* (Figura 25). É provável que essa diferença entre os dois modos ocorra pelo fato de uma gama maior de moléculas ser detectada no modo negativo, como é o caso de compostos contendo O<sub>2</sub>, compostos nitrogenados e aromáticos.

Visando o aumento do número de massas foi feita a fragmentação automática dos picos por espectrometria em tandem, pela qual foram gerados espectros nos quais foi possível observar um maior número de picos com massas registradas nos bancos. Os espectros de fragmentação (MS/MS) podem ser observados nas figuras de 16 a 26. Novamente, foram feitas análises nos modos positivo e negativo, sendo o modo negativo o que promoveu melhor separação dos picos e maior resolução para todos os extratos. Mais

uma vez, a análise do modo positivo foi possível somente para o fungo *M. africana* (Figuras 25 e 26).

As tabelas 3 e 4 indicam os metabólitos sugeridos pelas bases de dados após as análises de HPLC-MS. Nota-se que a tabela 3 inclui os metabólitos com compatibilidade de três e quatro casas decimais em relação aos compostos descritos nas bases de dados, enquanto que a tabela 4 mostra os metabólitos com duas casas compatíveis com os compostos descritos. O termo TR refere-se ao tempo de retenção do composto durante a análise, em minutos. A massa teórica é a massa descrita na literatura para cada composto sugerido e a massa experimental é a massa gerada pelo equipamento. A fragmentação dos picos gerou os dados de MS/MS. As células preenchidas por um traço indicam casos nos quais os fragmentos não foram obtidos.

Tabela 3. Metabólitos com três ou quatro casas decimais de compatibilidade com os bancos de dados após análise de HPLC-MS e MS/MS em *M. africana* nos modos negativo e positivo.

	Nome	TR Pico (min)	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	MS/MS	Intensidade	Fórmula molecular
1	Verrucarol	38.7	266.15182	266.1513	—	7582	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
2	Brefeldina A	40.4	280.16745	280.1674	—	1669	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>
3	Castanospermina	41.1	189.10011	189.1001	—	53	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>

(-) Fragmentos não obtidos.

Fonte: elaborada pela autora (2019).

A tabela 3 lista, por ordem de eluição e de intensidade decrescente, os três metabólitos sugeridos para *M. africana*, de acordo com a massa experimental. O composto 1 apresentou massa experimental de 266.1513 e foi sugerido como sendo verrucarol, uma vez que este apresenta massa descrita na literatura de 266.1518. Os compostos 2 e 3 apresentaram compatibilidade de 4 casas com as massas dos compostos sugeridos (brefeldina A e castanospermina).

Tabela 4. Metabólitos com duas casas decimais de compatibilidade com os bancos de dados após HPLC-MS e MS/MS nos modos negativo e positivo.

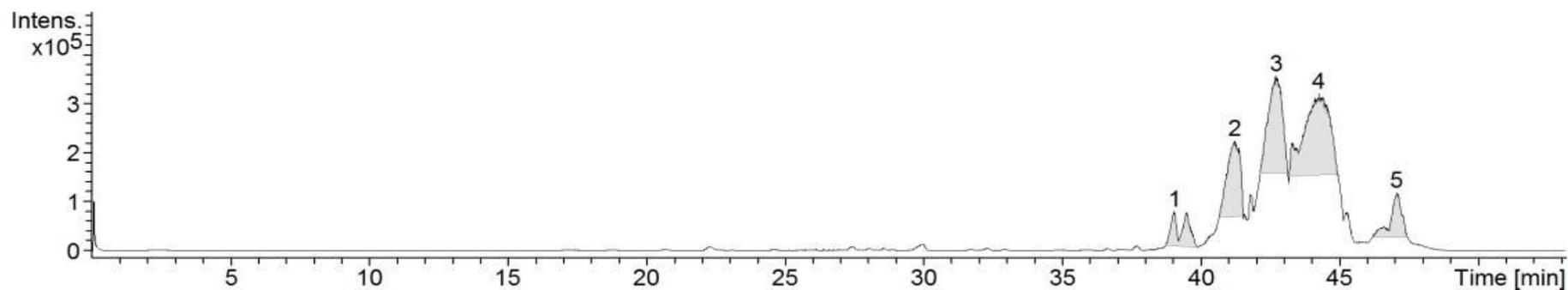
	Nome	TR Pico (min)	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	MS/MS	Intensidade	Fórmula molecular
1	Treonina	40.4 40.9 42.2 43.5 44.3	119.05824	119.0506	119.0508 119.0514 119.0504 119.0506 119.0508	765 1614 1814 1439 1569	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
2	Ácido cólico	44.9	408.28757	408.2869	408.2862 408.2876	148	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>
3	Ácido mirístico	47.2	228.20892	228.2062	228.2053	8811 1369	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
4	Metilergometrina	42.5 42.9 43.7	339.19467	339.1995	339.1993	33422 8961 15112	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
5	Ácido oleico	40.9	282.25589	282.2532	–	1917	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
6	Ajmalina	41.9	326.19943	326.1951	–	719	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
7	Fosfoserina	43.1 40.4	185.00893	185.0092	185.0085	2288 327	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>6</sub> P
8	Glicina-betaína	30.8	102.09189	102.0919	–	182	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO
9	Lisinamida	32.3	145.12151	145.1222	145.1206	2653	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O
10	Ácido 3- hidroxiantranílico	32.4	153.04259	153.0468	–	17	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
11	Histidina	40.1	155.06947	155.0688	–	169	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
12	Piridoxal	40.2	167.05824	167.0543	167.0582		C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
13	Ácido indol acético (AIA)	40.2	175.06329	175.0621	–	69	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
14	Ácido homogentísico	40.6	168.04227	168.0414	–	58	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>

(-) Fragmentos não obtidos.

Fonte: elaborada pela autora (2019).

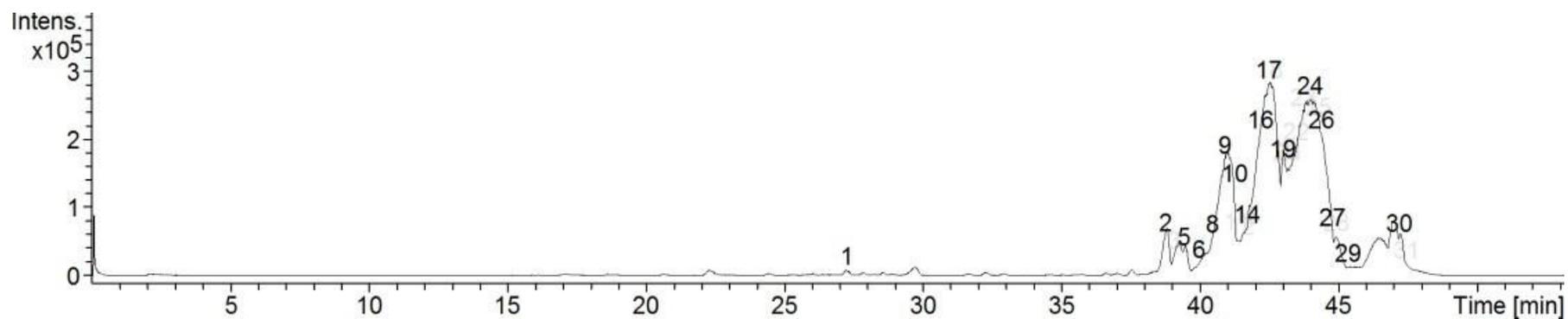
A tabela 4 lista os metabólitos com massas com duas casas decimais de compatibilidade com massas descritas na literatura. Algumas substâncias foram encontradas nos mesmos tempos de retenção de outras quimicamente distintas, o que indica que elas possuem polaridade semelhante. Não foram obtidos índices de similaridade, de modo que as sugestões dos metabólitos aqui descritos foram feitas com base na análise das massas de substâncias disponíveis nas bases de dados. A falta de substâncias padrão e de análises complementares que permitissem elucidar a estrutura química das substâncias, como ressonância magnética nuclear (RMN) bidimensional ou tridimensional foi uma limitação encontrada no método adotado.

Figura 15. Cromatograma do extrato do fungo *M. africana* com detecção por MS no modo negativo.



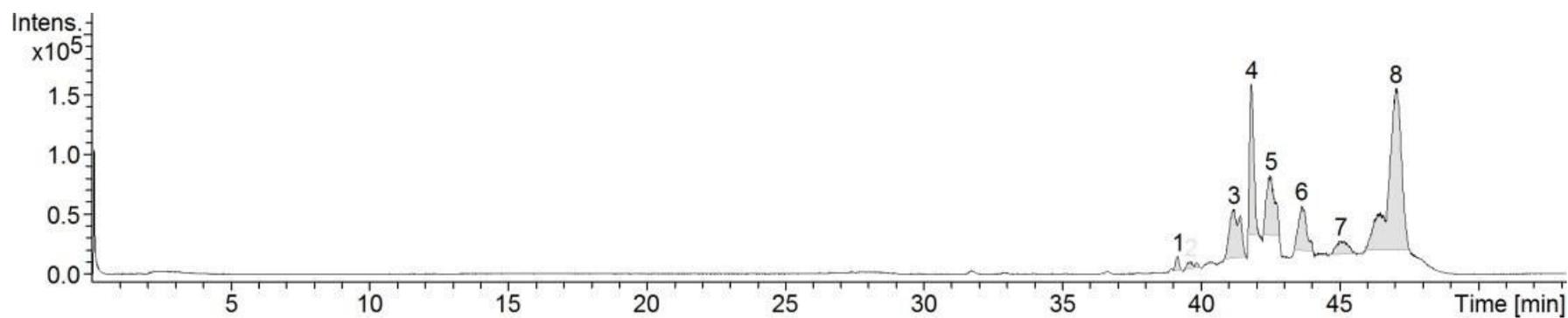
Fonte: Autora (2019).

Figura 16. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *M. africana* com detecção por MS no modo negativo.



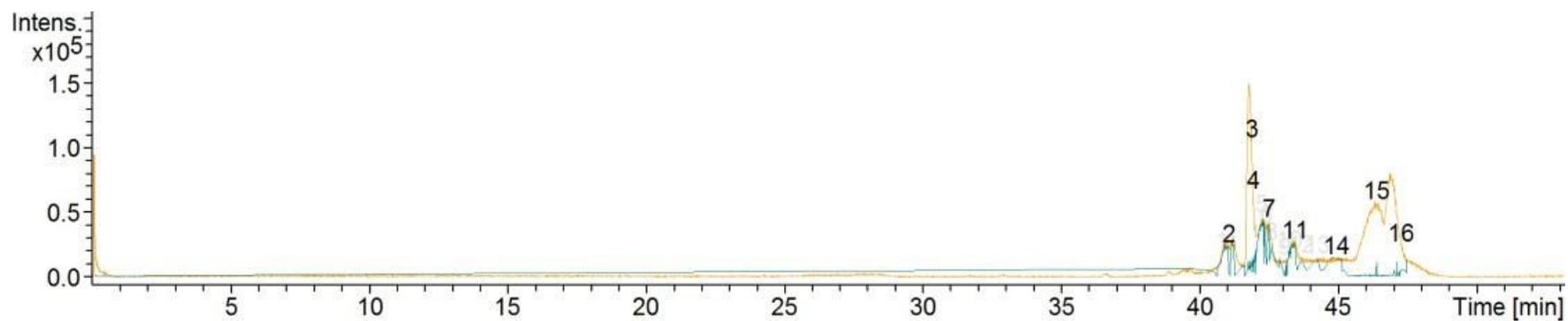
Fonte: Autora (2019).

Figura 17. Cromatograma do extrato do fungo *B. multispora* com detecção por MS no modo negativo.



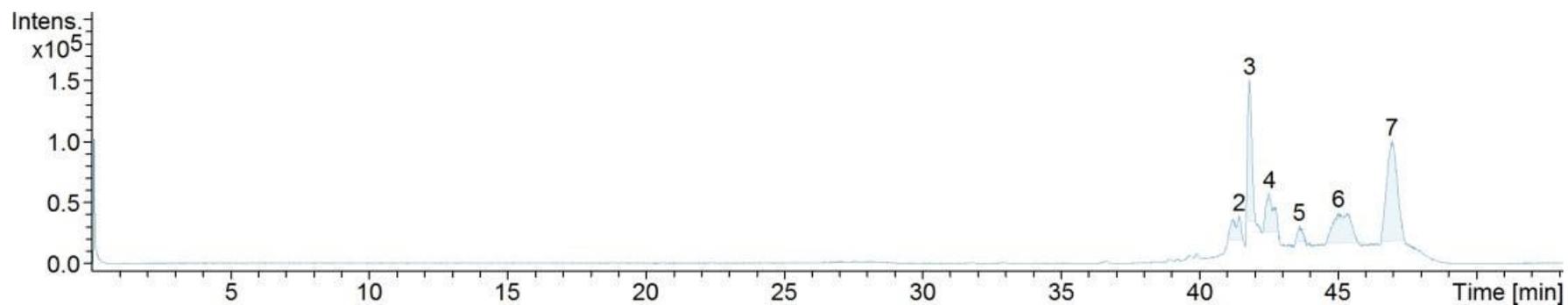
Fonte: Autora (2019).

Figura 18. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *B. multispora* com detecção por MS no modo negativo.



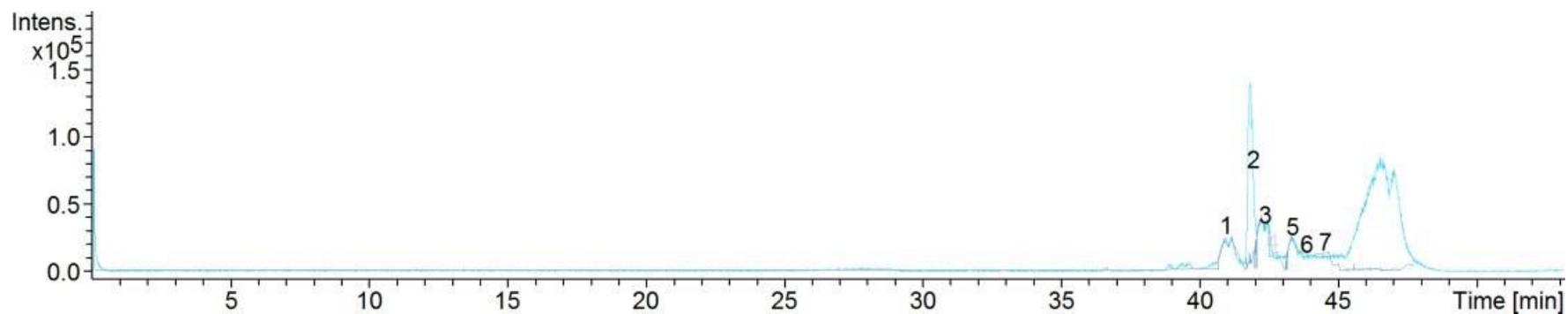
Fonte: Autora (2019).

Figura 19. Cromatograma do extrato do fungo *B. youngii* com detecção por MS no modo negativo.



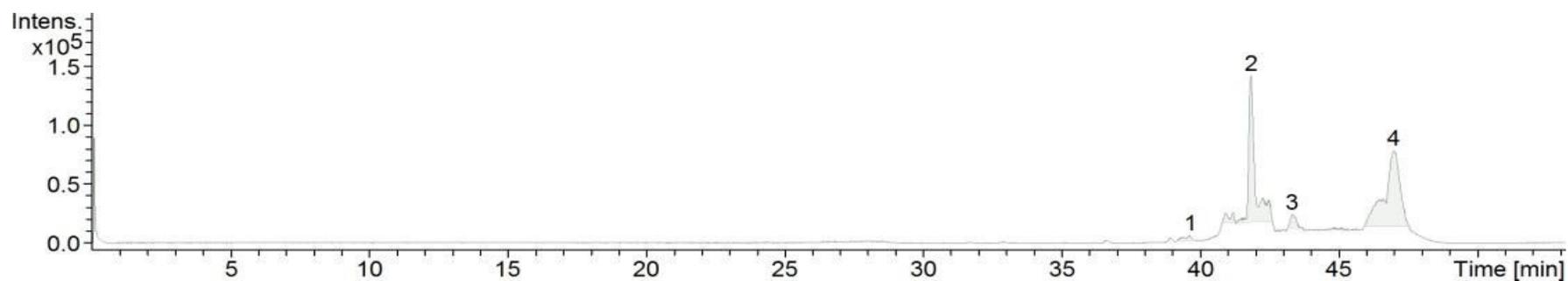
Fonte: Autora (2019).

Figura 20. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *B. youngii* com detecção por MS no modo negativo.



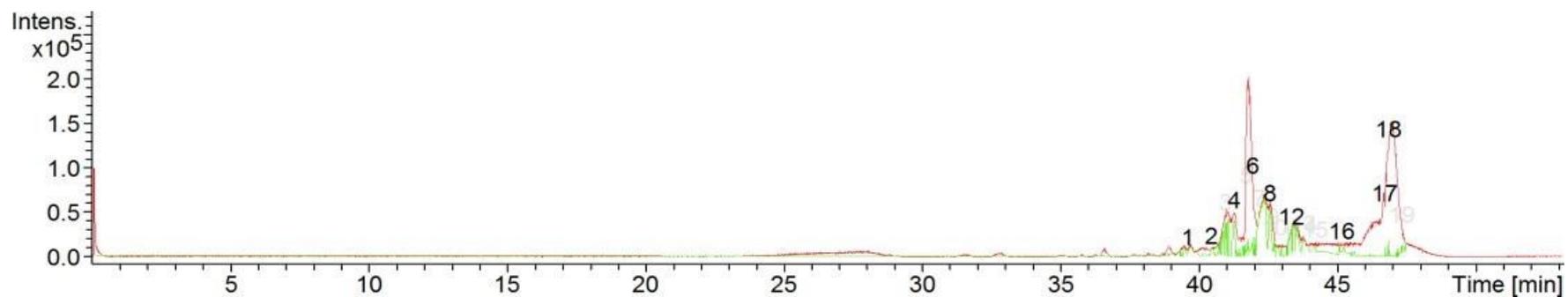
Fonte: Autora (2019).

Figura 21. Cromatograma de HPLC-MS do extrato do *fungo C. recurvatus* com detecção por MS no modo negativo.



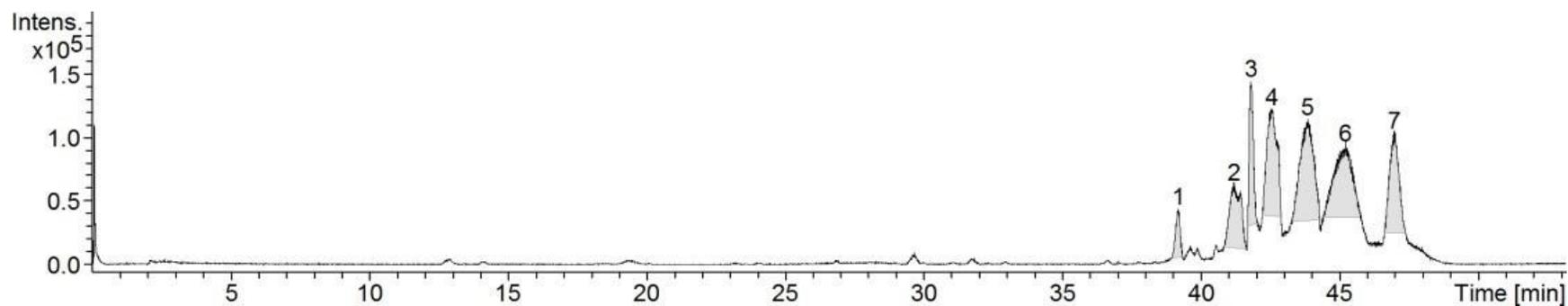
Fonte: Autora (2019).

Figura 22. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *C. recurvatus* com detecção por MS no modo negativo.



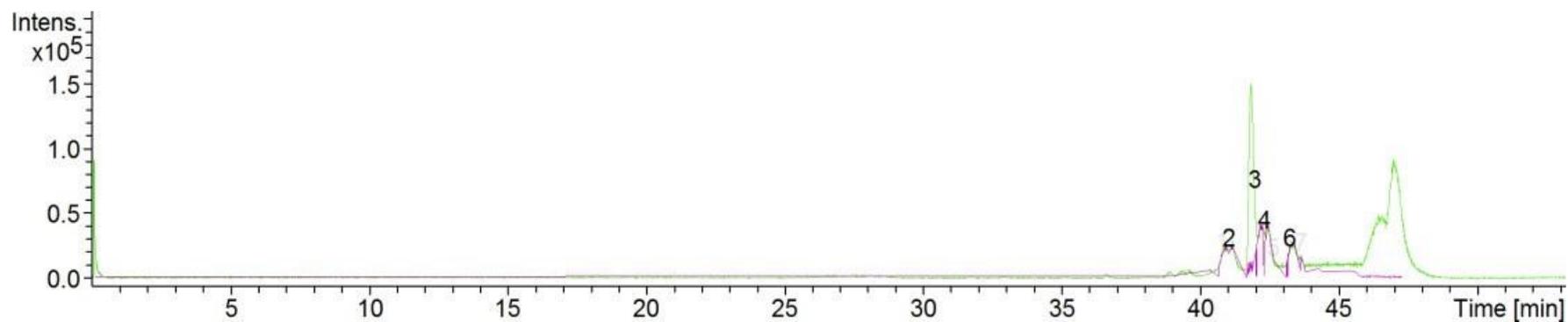
Fonte: Autora (2019).

Figura 23. Cromatograma do extrato do fungo *M. indica* com detecção por MS no modo negativo.



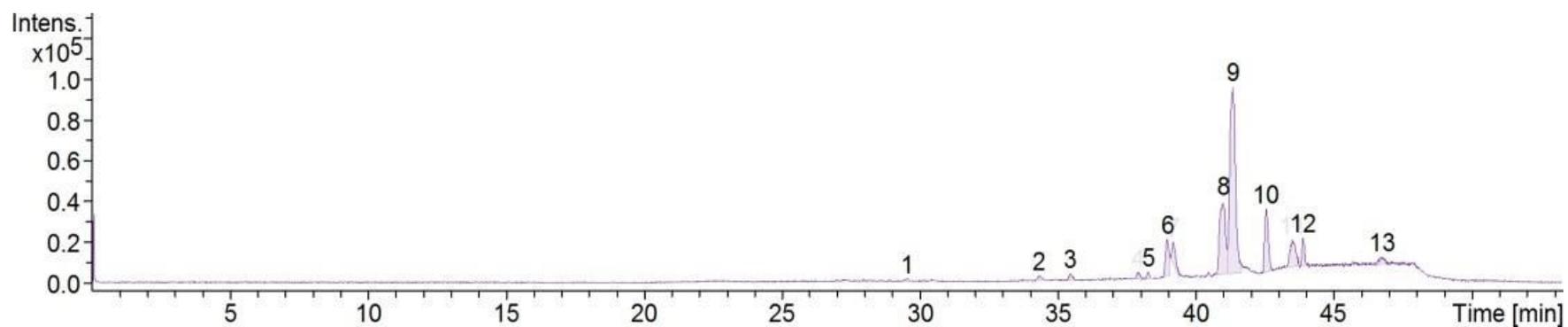
Fonte: Autora (2019).

Figura 24. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *M. indica* no modo negativo.



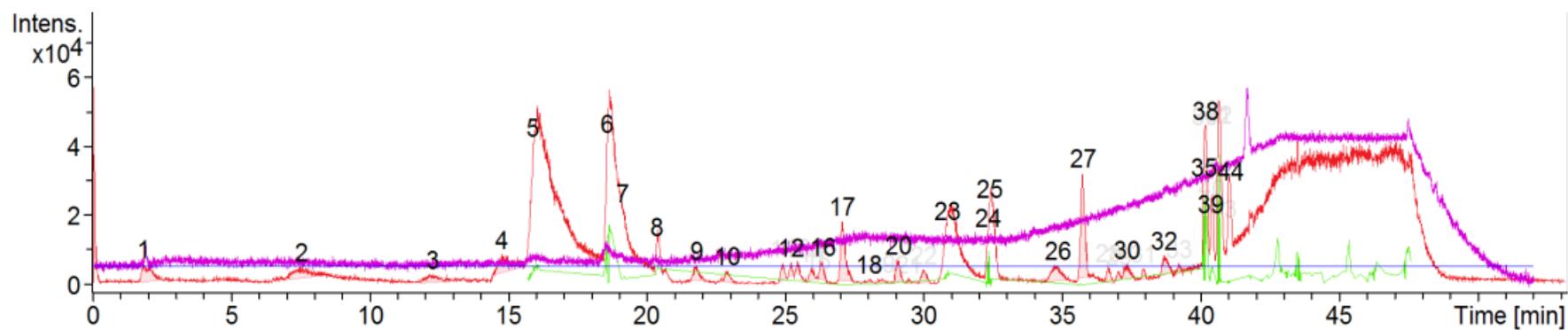
Fonte: Autora (2019).

Figura 25. Cromatograma do extrato do fungo *M. africana* com detecção por MS no modo positivo.



Fonte: Autora (2019).

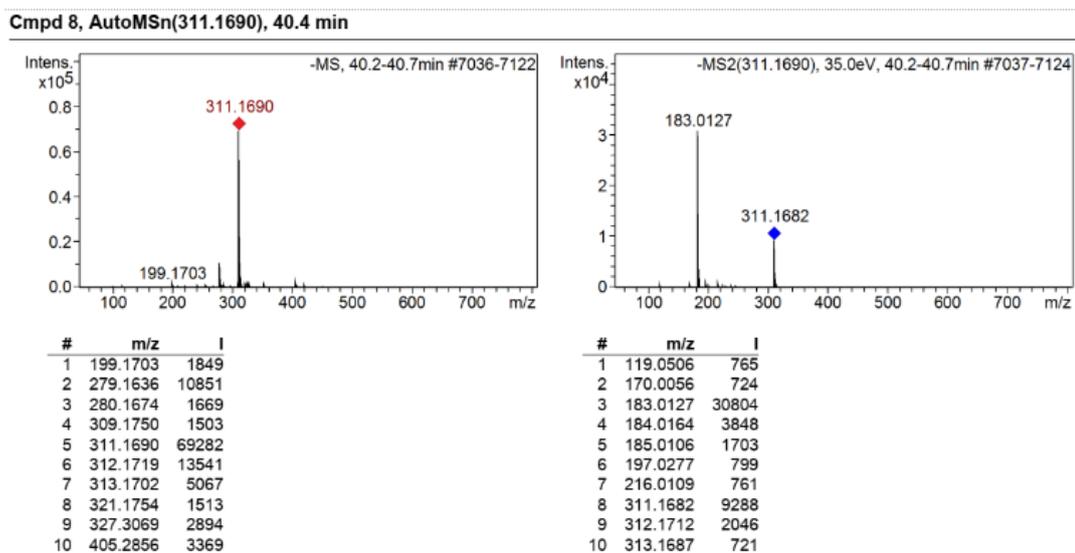
Figura 26. Cromatograma de fragmentação (MS/MS) do extrato de *M. africana* no modo positivo.



Fonte: Autora (2019).

Os cromatogramas apresentados mostram que diversas substâncias com mesmo tempo de retenção e diferentes massas moleculares e intensidades foram acumuladas em um mesmo pico, indicado por números. Na figura 27 observam-se duas imagens referentes a um desses picos, representado na imagem por “composto 8”. À esquerda, o pico majoritário apresenta massa de 311.1690 e tempo de retenção em 40.7 min. À direita, observa-se o espectro de massas do fragmento do componente de maior intensidade, com valor  $m/z$  de 183.0127. Abaixo, se encontram os valores de  $m/z$  dos componentes sob esse pico e suas intensidades relativas. Nota-se que para cada um dos compostos majoritários existe uma série de massas com intensidades menores, mas que também são substâncias presentes na mistura.

Figura 27. Espectro de massas para compostos de maior intensidade e seus fragmentos.



Fonte: Autora (2019).

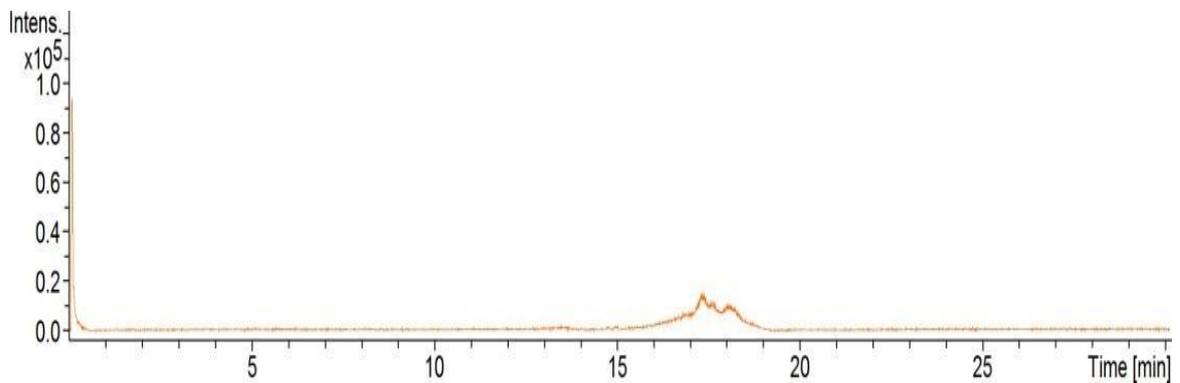
A tabela 5 lista os metabólitos que foram sugeridos para as cinco espécies analisadas. Em geral, alguns metabólitos foram comuns a vários extratos, como é o caso da treonina, da metilergometrina e do ácido cólico. No entanto, foram encontrados compostos característicos de uma única espécie, como é o caso da maioria dos metabólitos para *M. africana*. No total, nos modos positivo e negativo, foram geradas 2.020 massas para todas as cinco espécies analisadas, sendo *M. africana* a espécie que mais apresentou compostos em ambos os modos de análise. Para o modo negativo, as buscas nos espectros de massa de *M. africana* totalizaram 580 massas encontradas. *C. recurvatus* apresentou 380 massas, *B. multispora*

apresentou 320 e *B. youngii* e *M. indica* obtiveram 140 massas cada. Para o modo positivo, *M. africana* apresentou 250 massas, *M. indica* 60, *C. recurvatus* 60, *B. youngii* 50 e *B. multispora* 40 massas.

Como pode ser observado nos espectros apresentados, tanto no modo positivo quanto no negativo, os metabólitos são eluídos majoritariamente entre 40 e 48 minutos após a injeção, o que indica a presença de compostos mais apolares, que possuem maior interação com a fase estacionária, neste caso, a coluna.

A figura 28 mostra o espectro obtido pela corrida controle, feita somente com o solvente, sem a adição de extrato.

Figura 28. Espectro de HPLC-MS sem extrato (controle) feito no modo negativo.



Fonte: Autora (2019).

Tabela 5. Lista dos metabólitos sugeridos para cada espécie nos modos negativo e positivo.

MSMS – LOW NEG					
Compostos	Espécies				
	<i>M. africana</i>	<i>M. indica</i>	<i>B. multispora</i>	<i>B. youngii</i>	<i>C. recurvatus</i>
Verrucarol	x				
Brefeldina A	x				
Treonina	x		x	x	x
Metilergometrina	x	x	x		x
Fosfoserina	x	x			x
Ácido cólico	x		x	x	x
Ácido mirístico	x				
Acefato		x			x
Ácido oleico					x
Ajmalina					x

MSMS – LOW POS					
Compostos	Espécies				
	<i>M. africana</i>	<i>M. indica</i>	<i>B. multispora</i>	<i>B. youngii</i>	<i>C. recurvatus</i>
Glicina-betaina	x				
Lisinamida	x				
Ácido 3-hidroxiantranílico	x				
Histidina	x				
Piridoxal	x				
Ácido indol acético (AIA)	x				
Ácido homogentísico	x				
Castanospermina	x				

MSMS – Espectrometria de massas em tandem, LOW NEG – Modo negativo, LOW POS – Modo positivo.

Fonte: elaborada pela autora (2019).

Entre os metabólitos sugeridos, estão alguns que são produtos comuns do metabolismo básico dos organismos, como os aminoácidos treonina (encontrado em todas as amostras, exceto *M. indica*), histidina e lisinamida (encontrados em *M. africana*). Entretanto, o que se destaca é a quantidade de metabólitos secundários encontrados exclusivamente nas amostras de *M. africana*. No modo negativo foram encontradas 18 massas compatíveis a compostos descritos, dos quais 11 estavam presentes nos extratos de *M. africana*. O modo positivo resultou em seis compostos para o mesmo fungo.

A técnica de HPLC-MS no modo negativo foi eficiente para comparar as substâncias presentes em cada espécie. Uma vez que não existem estudos na área de metabolômica para fungos dessas espécies, esse é um dado inédito e de importância.

Considerando-se uma compatibilidade de massas a partir de três casas decimais foram encontrados três compostos com massas comparáveis a metabólitos secundários com propriedades biotecnológicas. Esses metabólitos são denominados verrucarol (três casas), brefeldina A (quatro casas) e castanospermina (quatro casas), os quais estão brevemente descritos a seguir.

#### 4.3.1 Verrucarol

O verrucarol (Figura 29) é um tricoteceno macrocíclico pertencente à classe dos sesquiterpenoides que possui uma ampla variedade de efeitos biológicos, entre eles atividade antitumoral, antifúngica, antibiótica e antiviral, além de significativa citotoxicidade (YAGEN *et al.*, 1977; BAREL *et al.*, 1990). Por se tratar de uma micotoxina, o verrucarol é uma substância naturalmente produzida por fungos ascomicetos das espécies *Stachybotrys chartarum* e *S. microspora* e pode ser encontrado em grãos de cereais armazenados (EL-KADY; MUBACHER, 1982), além de estar relacionado à Síndrome do Edifício Doente (SBS, do inglês, Sick Building Syndrome) (STRAUS, 2009), fenômeno que pode causar sintomas como dores de cabeça, fadiga, irritação no sistema respiratório superior e erupção cutânea. Normalmente, esses sintomas estão associados com a presença das micotoxinas em partículas de poeira em edifícios cuja ventilação natural fora substituída por um sistema artificial (REDLICH *et al.*, 1997). Efeitos diversos foram observados tanto em ensaios com modelos animais quanto em indivíduos afetados pela SBS, demonstrando que o verrucarol apresenta efeitos tóxicos como irritação ocular e nasal, cansaço e toxicidade oral aguda e cutânea, cujos graus

podem variar desde irritação, corrosão até ser fatal (NORBACK *et al.*, 2016).

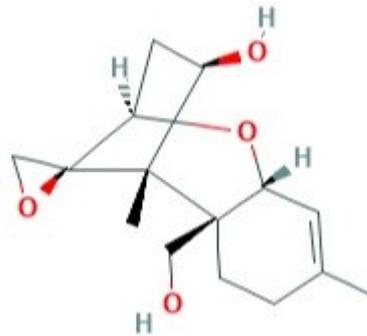
O mecanismo de ação dos tricotecenos pode ocorrer por meio da inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, da atuação na cadeia transportadora de elétrons, no estímulo da peroxidação lipídica, na alteração da função da membrana celular, na indução da apoptose, na modulação de respostas imunes, na ativação de proteínas quinases, na indução da expressão gênica por quimiocinas e citocinas e, por fim, na alteração dos níveis de neurotransmissores (HASCHEK; BEASLEY, 2009).

O processo de inibição da síntese proteica é feito por meio da ligação da molécula à subunidade 60S do ribossomo, interferindo na atividade da peptidil-transferase (MOSTROM, 2011). De acordo com o modo de ação, os tricotecenos são divididos em dois grupos: os que atuam com inibição preferencial na porção inicial e aqueles que atuam no alongamento e/ou na porção final da síntese proteica. Essa diferença se deve principalmente à estrutura da molécula. Tricotecenos com substituições dos grupamentos hidroxila e acetila em C-3 e C-4, como a verrucarina A, inibem predominantemente a iniciação da síntese, enquanto para o verrucarol e outros tricotecenos com grupamento cetona em C-8 e hidroxila em C-7, a preferência de atuação é no alongamento e/ou na porção final (McLaughlin *et al.*, 1977).

Sinteticamente, a obtenção de verrucarol pode ser feita por hidrólise química a partir de um éster macrocíclico de epoxitricoteceno em *S. alternans* ou de tricotecenos macrocíclicos do fungo *Myrothecium verrucaria* (SZATHMARY *et al.*, 1876; ROUSH; D'AMBRA, 1977; JARVIS *et al.*, 1984).

Como previamente mencionado, a sugestão desse composto, bem como dos demais, foi feita com base na massa molecular. Entretanto, não foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) bidimensional de alta resolução que permitissem auxiliar na elucidação das estruturas químicas. Portanto, deve-se levar em consideração a existência de diversos isômeros possíveis para as estruturas químicas aqui indicadas.

Figura 29. Estrutura tridimensional do verrucarol



Fonte: Pubchem (2020).

#### 4.3.2 Brefeldina A

Brefeldina A (Figura 30) é um metabólito fúngico pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas e possui atividade antifúngica, antiviral e antitumoral, tendo sido isolado por pesquisadores suíços a partir do cultivo de *Penicillium brefeldianum* (HARRI *et al.*, 1963). Anteriormente, Betina e colaboradores (1962) haviam isolado do cultivo de *P. cyaneum* uma substância apresentando capacidade de inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduriformes e ação inibitória contra célula HeLa em cultura de tecidos, e a denominaram de cianeína. Análises comparativas dos dados químicos e físicos demonstraram que brefeldina A e cianeína correspondiam à mesma substância (BETINA, 1995) e essa constatação igualmente se estende para substâncias descritas com nomes distintos como decumbina (SINGLETON *et al.*, 1958), ascotoxina (SUZUKI *et al.*, 1970) e sinergisidina (YAGISHITA *et al.*, 1981).

Desde então essa substância foi isolada de fungos do solo, como *P. simplicissimum* e diversos outros gêneros, como *Alternaria*, *Ascochyta*, *Curvularia*, *Cercospora*, *Phyllosticta*, *Paecilomyces* e *Aspergillus* (VURRO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2002). Diversos estudos demonstram a atividade biológica desse metabólito. A capacidade citotóxica da decumbina em ratos e peixes, além da inibição da germinação de trigo foi avaliada e descrita por Singleton e colaboradores (1958). Betina e colaboradores (1962) demonstraram a atividade antifúngica e os efeitos citotóxicos da cianeína. Brefeldina A teve seus efeitos antifúngicos, citotóxicos e cancerostáticos estudados por

Härrri e colaboradores (1963). A ascotoxina e seus derivados foram estudados quando a sua influência em plantas e a atividade fitotóxica foi demonstrada (SUZUKI *et al.*, 1970).

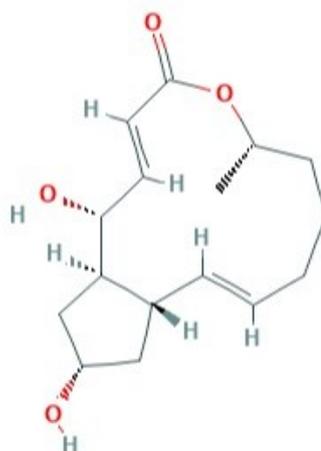
Em métodos de diluição, este metabólito apresenta atividade antiviral contra amostras de vírus herpes simples e de doença de Newcastle, de modo que o espectro de eficácia abrange tanto vírus de DNA quanto de RNA (TAMURA *et al.*, 1968).

O cultivo de microrganismos feito em larga escala visando à produção de diversas substâncias de interesse biotecnológico, como polissacarídeos, enzimas e metabólitos que, em cultivos de bancada, apresentam um rendimento menor em um tempo maior de crescimento é uma das perspectivas de avanço no campo da biotecnologia. O uso de biorreatores na produção de substâncias com atividade biológica é um grande aliado, pois além de potencializar a quantidade de biomassa, consequentemente, aumenta o rendimento do metabólito de interesse. Esse processo contribui ainda na diminuição da interferência do homem no ambiente em que o fungo se encontra. McCloud e colaboradores (1995) cultivaram *Eupenicillium brefeldianum* visando a produção em larga escala de cianeína. O rendimento foi de 1.146 g de metabólito para 6.800 litros de caldo de cultivo (169 mg/L).

Apesar de apresentar vantagens, a produção de brefeldina A pode causar ainda algumas alterações no crescimento e na morfologia dos fungos (BETINA, 1992), além de alterações químicas no aparelho de Golgi que podem afetar a distribuição de proteínas no retículo endoplasmático (BALCH, 1990).

Em cultivo submerso induzindo o crescimento leveduriforme do fungo dimórfico *Paecilomyces viridis*, foram relatadas modificações no tamanho e forma das colônias, além de alterações na composição química da parede celular. Em estudos utilizando *P. brasiliensis* a presença dessa substância afetou a capacidade de dimorfismo (BETINA, 1966; SAN-BLAS e YEGRES, 1978). Outras alterações morfológicas, como aumento do tamanho das células em *Candida albicans* e ramificação das hifas em alguns fungos filamentosos, também já foram observadas (BETINA, 1992).

Figura 30. Estrutura tridimensional da brefeldina A



Fonte: Pubchem (2020).

#### 4.3.3 Castanospermina

A castanospermina (Figura 31) é um alcaloide do tipo indolizidina poliidroxilado encontrado em sementes e folhas da planta *Castanospermum australe*, conhecida como “blackbean” (feijão-preto) (COLLINS *et al.*, 1990) e também em vagens de *Alexa leiopetala* (FURNEAUX *et al.* 1996).

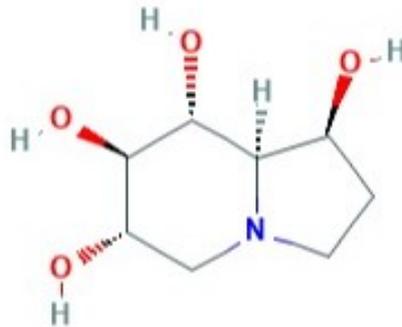
Seu precursor natural é a L-lisina e o primeiro intermediário chave para a biossíntese da castanospermina é o ácido-L-pipecóico, que atua como iniciador para a extensão da cadeia do malonato incorporando um átomo de carbono na molécula. A castanospermina é então formada por uma sequência de reações de hidroxilação. Os alcaloides indolizidínicos possuem atividade inibidora de glucosidases (SAUL *et al.*, 1983) e devido a sua semelhança estrutural com os açúcares podem ser denominados iminoaçúcares, aminoaçúcares ou alcaloides em forma de açúcares (STÜTZ, 1999). Essa similaridade com a molécula de glucose está intimamente relacionada com a atividade inibidora de glucosidase. A castanospermina é formada por quatro grupos hidroxila a partir do anel central, por meio do qual a glucosidase reconhece a molécula e combina-se com ela. Uma vez ligada, a enzima fica presa e é impedida de catalisar sua própria reação.

Entre as atividades biológicas descritas encontram-se a atividade anticancerígena (FLEET, 1990), anti-HIV (HADWIGER *et al.*, 1986; BEEBEE e BURKE, 1988), tratamento de diabetes (RHINEHART *et al.*, 1990), doença de Pompe (REICHMANN *et al.*, 1987), atividade antifúngica (RIDRUGO *et al.*, 1989), inseticida (NASH *et al.*, 1986)

e anti-inflamatória (WILLENBORG, 1992).

A ocorrência desse composto em fungos, especificamente em micorrizas arbusculares do gênero *Glomus* associadas à raiz de *C. australe*, foi relatada por Abu-Zeyad e colaboradores (1999), que demonstraram um aumento do crescimento da planta e da produção de castanospermina nas folhas relacionadas com a simbiose.

Figura 31. Estrutura tridimensional da castanospermina.



Fonte: Pubchem (2020).

#### 4.3.4 Outros metabólitos

Além das substâncias mencionadas nos itens anteriores, foram encontrados outros metabólitos secundários com massas apresentando compatibilidade de duas casas decimais em comparação com dados descritos na literatura. Entre eles estão o ácido cólico, ácido mirístico, metilergometrina, ácido oleico, ajmalina, ácido 3-hidroxi-antranílico e ácido homogentísico.

A metilergometrina se destacou por ter sido encontrada em todos os extratos, com exceção de *B. youngii*. É um alcaloide do tipo ergolínico produzido pelo fungo *Claviceps purpurea* (nome popular: esporão-do-centeio), conhecido pela produção de ácido lisérgico (LSD). Derivado semissintético da ergometrina, a metilergometrina participa da contração da musculatura uterina, sendo indicada no tratamento da hemorragia pós-parto e pós-aborto, além de possuir atividade inibitória da adrenalina, noradrenalina e serotonina, assim como os demais alcaloides de ergot (ADRIO; DEMAIN, 2003; MELLO *et al.*, 2016).

A presença de outro alcaloide, denominado ajmalina, foi observada nos extratos de *C. recurvatus*. Ajmalina é um alcaloide indólico encontrado em raízes da planta

*Rauwolfia serpentina* e possui atividade antiarrítmica e anti-hipertensiva (SRIVASTAVA *et al.*, 2006). A produção de ajmalina em *R. serpentina* pode ser potencializada pelo uso de elicitores abióticos. Srivastava e colaboradores (2016) demonstraram que, em uma concentração de 100 mM de NaCl, foi observado um aumento em 14.8 vezes na produção de ajmalina por essa planta. Para fungos, no entanto, a produção desse composto não é conhecida; os estudos que associam a ajmalina com esses microrganismos estão relacionados ao aumento da produção de alcaloides em plantas utilizando fungos como elicitores. Em *Catharantus roseus*, os compostos ajmalina, vindolina e catarantina tiveram sua produção aumentada pelo fungo *Aspergillus flavus* (LIANG *et al.*, 2018). O aumento também ocorreu para enzimas como triptofano Descarboxilase e Estrictosidina-sintase, envolvidas na biossíntese de alcaloides, por elicitação do fungo fitopatogênico *Pythium aphanidermatum* (CORDELL, 2003).

Já o ácido 3-hidroxiantranílico, intermediário do metabolismo do triptofano, já foi isolado de extrato metanólico de *tempeh*, apresentando atividade antioxidante (ESAKI *et al.*, 1996) e tem sido relatado associado ao fungo da podridão-branca, *Pycnoporus cinnabarinus*, onde atua como mediador da lacase na degradação de lignina (LI *et al.*, 2000; ELISSETCHE *et al.*, 2006). Além disso, esse metabólito foi obtido a partir de extratos do fungo marinho *Penicillium paneu*, por meio de alterações nas condições de fermentação, onde o cultivo em larga escala feito em biorreator permitiu o isolamento de seis tipos de derivados de ácido antranílico presentes no meio de cultura (LI *et al.*, 2013).

Glicina-betaína é uma pequena molécula encontrada em plantas e bactérias que atua na proteção frente ao *stress* envolvendo retenção hídrica, frio, calor, salinidade, dentre outros. Em *Aspergillus fumigatus*, esse metabólito atua como fonte de carbono, nitrogênio e energia devido às reações de demetilação da glicina (LAMBOU *et al.*, 2013). Em plantas associadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), especialmente com a espécie *Glomus clarum*, a presença de glicina-betaína também já foi descrita, tendo desempenhado um papel de proteção e regulação osmótica em plantas submetidas ao estresse hídrico (PEREIRA, 2012).

O composto fenólico denominado ácido homogentísico também já foi isolado de cogumelos comestíveis, como *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus* e *Pleurotus ostreatus*. Apesar de esses fungos apresentarem propriedades

antioxidantes, ensaios realizados não correlacionam essa atividade ao ácido homogentísico, uma vez que a atividade apresentada não foi significativa (PALACIOS *et al.*, 2011).

O ácido oleico é o tipo mais comum de ácido graxo monoinsaturado encontrado no azeite de oliva e tem a capacidade de reduzir os níveis de colesterol, pressão arterial e atuar sobre alguns tipos de cânceres (KURUSHIMA *et al.*, 1995; FERRARA *et al.*, 2000; MENENDEZ; LUPU, 2006). Além das aplicações para a área médica, o ácido oleico pode ser convertido em ácido ricinoleico, um ácido graxo hidroxilado muito utilizado na indústria química como lubrificante para evitar o atrito em peças de equipamentos (van de LOO *et al.*, 1995; AZCAN; DEMIREL, 2008; MEESAPYODSUK; QIU, 2008). Algumas pesquisas demonstram a produção de ácido oleico por fungos. Sakamoto e colaboradores (2017) promoveram o aumento da produção desse ácido em *Mortierella alpina* utilizando técnicas de melhoramento molecular e verificaram que o tempo ótimo para a produção do metabólito foi em cinco dias de cultivo. Além de *M. alpina*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus oryzae* e *Rhodosporidium toruloides* também já foram estudados quanto à produção de ácidos graxos (TAMANO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016).

Os metabólitos produzidos por fungos da ordem Mucorales são pouco conhecidos. Em relação às espécies abordadas no presente estudo, os trabalhos são escassos e abrangem outros campos, que não incluem a metabolômica. Dessa forma, até o presente não existem relatos desses ou de outros metabólitos secundários produzidos por fungos das espécies *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*, sendo este um estudo inédito de prospecção para esses microrganismos.

A inexistência de uma biblioteca de espectros para LC-MS e as limitações encontradas na metodologia proposta, como mencionado anteriormente, foram algumas das dificuldades encontradas durante o desenvolvimento desse trabalho. A similaridade entre as massas das substâncias eluídas dos extratos com aquelas descritas na literatura e nas bases de dados, aliada à presença dessas substâncias em outros fungos e plantas torna possível essa comparação. Além disso, essa é uma metodologia que pode ser utilizada para análises de compostos polares e apolares pouco voláteis, nos quais a derivatização não é viável, como ocorre na cromatografia gasosa.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* secretam metabólitos para o meio extracelular;
- A falta de estudos sobre as substâncias produzidas por esses gêneros de fungos dificultou a aquisição de amostras padrão para as análises;
- Diversas massas encontradas nos extratos não apresentavam descrição na literatura, o que se tornou uma dificuldade na tentativa de identificação dos metabólitos;
- *M. africana* foi a espécie que mais apresentou compostos compatíveis com os bancos de dados, com destaque para três: verrucarol, brefeldina A e castanospermina;
- Os espectros de *M. africana* demonstram que essa é uma espécie interessante para o cultivo em larga escala;
- O uso de fungos com capacidade de dimorfismo e que apresentam crescimento acelerado é uma vantagem em estudos visando à produção de compostos de interesse biotecnológico;
- Para futuros trabalhos sugere-se a análise por RMN bidimensional que, aliada à espectrometria de massas, permite elucidação estrutural das substâncias além de possibilitar a identificação de compostos inéditos, caso sejam adquiridos espectros em boa resolução;
- Ainda, sugere-se a coleta dos picos de interesse por cromatografia em coluna preparativa e ensaios de atividade biológica para futuras aplicações utilizando essas e outras espécies.

## REFERÊNCIAS

- ABU-ZEYAD, R.; KHAN, A. G.; KHOO, C. Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 111 – 117, 1999.
- ADRIO, J. L.; ARNOLD, L. D. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191 – 199, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. Wiley, 1996.
- ALVAREZ, E. D. El Subphylum Mucoromycotina: generalidades y aspectos taxonómicos recientes (Mucoromycotina Subphylum: overview and recent taxonomic aspects). **Boletín micológico**, v. 28, n. 1, p. 16 – 25, 2013.
- ÁVILA, A. E. D.; GARCÍA, L. M. U.; CHÁVEZ, A. J. P. *Mycotypha indica* P. M. Kirk & Benny in turkey dung, a new record for Venezuela. **Multiciencias**, v. 7, n. 2, p. 176 – 180, 2007.
- AZCAN, N.; DEMIREL, E. Obtaining 2-octanol, 2-octanone, and sebacic acid from castor oil by microwave-induced alkali fusion. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 1774 – 1778.
- BAREL, S.; YAGEN, B.; BIALER, M. Pharmacokinetics of the trichothecene mycotoxin verrucarol in dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, 1990.
- BARROS, L., BAPTISTA, P., ESTEVINHO, L. M., & FERREIRA, I. C. F. R. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8766 – 8771, 2007.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. **Journal of Bacteriology**, v. 84, p. 829 – 840, 1962.

BEEBEE, T.; BURKE, J. Gene structure and transcription. **IRL Press**, 1988.

BENJAMIN, R. K. The merosporangiferous Mucorales. **Aliso**, v. 4, p. 321 – 433, 1959.

BENNY, G. L.; BENJAMIN, R. K. Observations on Thamniaceae (Mucorales). II. *Chaetocladium*, *Cokeromyces*, *Mycotypha* and *Phascolomyces*. **Aliso**, v. 8, p. 391 – 424, 1976.

BENNY, G.L.A.; KIRK, P.M.; SAMSON, R.A. Observations on Thamniaceae (Mucorales) III. Mycotyphaceae Fam. Nov. And a reevaluation of *Mycotypha* Senser Benny & Benjamin. Illustrated by two new species. **Mycotaxon**, v. 22, n. 1, p. 119 – 148, 1985.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; RUBIN-FILHO, C. J.; PRIOLI, A.J.; et al. Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**, v. 43, p. 375 – 384, 2010.

BETINA, V.; BEAXNOVA, M.; KUTKOVA, M. Effects of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. **Archives of Mikrobiology**, v. 55, p. 1 – 16, 1966.

BETINA, V. Biological effects of the antibiotic Brefeldin a (Decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): a retrospective. **Folia Microbiologica**, v. 37, n. 1, p. 3 – 11, 1992.

CARTER, G.T. Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1783 – 1789, 2011. doi: 10.1039/c1np00033k.

CHEN, J. N.; WANG, Y. T.; WU, J. S. B. A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6706 – 6711, 2009.

COLLINS, D. J.; CULVENOR, C. C. J.; LAMBERTON, J. A.; LODER, J. W.; PRICE, J. R. **Plants for Medicines**, CSIRO Publications, Melbourne, 1990.

COLLINS, G. L. B.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1997, 262 p.

CORDELL, G. A. **The alkaloids**. Chemistry and Biology, v. 60. Elsevier Academic Press. 2003.

CORTEZ, D. H. C. Obtenção de quistosana natural e filogenia dos fungos dimórficos *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* (Tese). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

CUNHA, M.A. et al. Zigomicose rinocerebral em paciente diabética. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 257 – 259, 2011.

DA SILVA, M. **Caracterização de Mucorales (Zigomicetos) através de análise de ácidos graxos** (Dissertação). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**, 2 ed. Utrecht, Reus, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, John Wiley & Sons: New York, 1997.

DORE, C.; AZEVEDO, T. C. G.; DE SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DE DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R.F., et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta glucan-rich extract from *Geastrum saecatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160 – 1169, 2007.

ENDE VAN DEN, H. Sexual factor of the Mucorales. **Nature**, v. 215, p. 211 – 212. 1967.

ENDO A. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 401 – 405, 1985.

EL-KADY, I. A.; MUBASHER, M. H. Toxigenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. **Experimental Mycology**, v. 6, p. 25 – 35, 1982.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. New Antioxidant Isolated from Tempeh. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 696 – 700, 1996. doi:10.1021/jf950454t

FACCIN, L. C.; BENATI, F.; RINCAO, V. P.; MANTOVANI, M. S.; SOARES, S. A.; GONZAGA, M. L.; et al. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 24 – 28, 2007.

FERRARA, L. A.; RAIMONDI, A. S.; d'Episcopo, L.; GUIDA, L.; DELLO-RUSSO, A.; MAROTTA, T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, p. 837 – 842, 2000.

FERRERES, F.; TOMÁAS-BARBERÁAN, F. A.; GIL, M. I.; TOMÁAS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 56, n. 1, p. 49 – 56, 1991. doi: 10.1002/jsfa.2740560106

FLEET, G. W. J.; FELLOWS, L. E.; WENCHESTER, B. Plagiarizing plants: Amino sugars as a class of glucosidase inhibitors. In: **Bioactive compounds from plants**. Chadwick, D.J. and Marsh, J., Ciba Foundation Symposium, John Wiley and Sons, Chichester, n. 154, 112 – 125, 1990.

FLORES-BUSTAMANTE, Z.; RIVERA-ORDUÑA, F.; MARTÍNEZ-CÁRDENAS, A. *et al.* Microbial paclitaxel: advances and perspectives. **Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 460 – 467, 2010.

GALINDO, H. M. **Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de mucorales utilizando fermentação sólida**. Universidade Federal de Pernambuco (Dissertação), 2016.

GARCÍA -LAFUENTE, A.; MORO, C.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M. A.; D'ARRIGO, M., *et al.* Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. **Antiinflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 125 – 141, 2010.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI, R. C.; *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 35 – 40, 2012.

GŁADKOWSKI, W.; GRABARCZYK, M.; KONOPKA, M.; WAWRZEŃCZYK, C. Biohydroxylation of saturated bicyclic gamma-lactones with the substituted cyclohexane system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 13 – 18, 2004.

GŁADKOWSKI, W.; MAZUR, M.; BIAŁOŃSKA, A.; WAWRZEŃCZYK, C. Lactones 35 [1]. Metabolism of iodolactones with cyclohexane ring in *Absidia cylindrospora* culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 326 – 333, 2011.

GOODAY, G. W. Hormonal control of sexual reproduction in *Mucor mucedo*. **New Phytologist**, v. 67, 815 – 821, 1968.

- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81 – 98, 2010.
- GUILLAMÓN, E., GARCÍA-LAFUENTE, A., LOZANO, M., D'ARRIGO, M., ROSTAGNO, M. A., VILLARES, A., et al. Edible mushroom: Their roles in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v. 81, p. 715 – 723, 2010.
- HADWIGER, A.; NIEMANN, H. KAEBISCH, A.; BAUER, H.; TAMURA, T. Appropriate glucosylation of the FMS gene product is a prerequisite for its transforming potency. **EMBO Journal**, v. 5, n. 4, p. 689 – 694, 1986.
- HESSELTINE, C. W. Zygomycetes in food fermentation. **Mycologist**, v. 5, p. 162 – 169, 1986.
- HOFFMANN, K. Identification of the Genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes): A Comprehensive Taxonomic Revision. **Molecular Identification of Fungi**, p. 439 – 460. DOI: 10.1007/978-3-642-05042-8-19, 2010.
- HOFFMANN, K.; PAWŁOWSKA, J.; WALTHER, G.; WRZOSEK, M.; DE HOOG, G. S.; BENNY, G. L.; KIRK, P. M.; VOIGT, K. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia**, v. 30, p. 57 – 76, 2013.
- HOSSAIN, S.; HASHIMOTO, M.; CHOUDHURY, E. K.; ALAM, N.; HUSSAIN, N.; HASAN, M., et al. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, p. 470 – 475, 2003.
- JARVIS, B. B.; YATAWARA, C. S.; GREENE, S. L.; VRUDHULA, V. M. Production of verrucarol. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 673 – 674, 1984.

JUZLOVA, P.; MARTINKOVA, L.; KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 163 – 170, 1996.

KAVADIA, A.; KOMAITIS, M.; CHEVALOT, I.; BLANCHARD, F.; MARC, I.; AGGELIS, G. Lipid and linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 341 – 346, 2001.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 5, p. 739 – 753, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>

KHANI, H. S. M.; GHANBARY, M. A. T.; ROSTAMZADEH, V. Investigation on Some Extracellular Metabolites of *Mortierella alpina*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 3, p. 518 – 519, 2014. doi: 10.1007/s10600-014-1000-2

KIRK, P. M. A new species of *Benjaminiella* (Mucorales: Mycotyphaceae). **Mycotaxon**, v. 35, p. 121 – 125, 1989.

KIRK, P. M., CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9. ed. CAB International, Wallingford, UK, 2001.

KURUSHIMA, H.; HAYASHI, K.; SHINGU, T.; KUGA, Y.; OHTANI, H.; OKURA, Y.; TANAKA, K.; YASUNOBU, Y.; NOMURA, K.; KAJIYAMA, G. Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p. 251 – 256, 1995.

KUZINA, V.; CERDÁ-OLMEDO, E. Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 991 – 999, 2007. doi:10.1007/s00253-007-1069-7

LAMBOU, K.; PENNATI, A.; VALSECCHI, I.; TADA, R.; SHERMAN, S.; SATO, H.; BEAU, R.; GADDA, G.; LATGÉ, J. P. Pathway of Glycine Betaine Biosynthesis in

*Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 6, p. 853 – 863, 2013. doi: 10.1128/EC.00348-12.

LEE, S. C.; HEITMAN, J. Sex in the Mucoralean fungi. **Mycoses**, v. 57, n. 3, p. 18 – 24, 2014. doi:10.1111/myc.12244.

LI, K.; HORANYI, P. S.; COLLINS, R.; PHILLIPS, R. S.; ERIKSSON, K. E. L. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n 4-5, p. 301 – 307, 2001. doi: 10.1016/s0141-0229(00)00332-x

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161 – 165, 2009. doi: 10.1126/science.1168243

LI, F. S.; WENG, J. K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. **Natural Plants**, v. 3, 2017. doi: 10.1038/nplants.2017.109

LIANG, C.; CHEN, C.; ZHOU, P.; XU, L.; ZHU, J.; LIANG, J.; ZI, J.; YU, R. Effect of *Aspergillus flavus* Fungal Elicitor on the Production of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Cambial Meristematic Cells. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. doi: 10.3390/molecules23123276.

LIMA, M. C.; SILVA, T. C. D. M; SOUZA, A. F. de; LUNA, M. A. C.; ANDRADE, R. F. S.; SILVA, C. A. A. da; OKADA, K. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* (UCP/WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP/WFCC 1299) e *Rhizopus microsporus* (UCP/WFCC 1304) isolados do solo da Caatinga de Pernambuco. **Engevista**, v. 19, n. 5, p. 1417 – 1430, 2017.

LIU, T. et al. Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* MK-96-1196 from 0.003 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 1, p. 9 – 12, 2006.

- MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine**. Springer, US, p. 307 – 340, 2004.
- MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 555 – 564, 2002. doi:10.1007/s00253-002-0932-9.
- MARTIN, W. J. Effectiveness of fungicides in reducing soft rot in washed, cured sweet potatoes. **Plant Disease Reporter**, v. 48, 606 – 607, 1964.
- MCCLOUD, T. G.; BURNS, M. P.; MAJADLY, F. D.; MUSCHIK, G. M.; MILLEP, D. A.; POOLE K. K.; ROACH, J. M.; ROSS, J. T.; LEBHERZ, W. B. Production of Brefeldina A. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, 5 – 9, 1995.
- MEESAPYODSUK, D.; QIU, X. An oleate hydroxylase from the fungus *Claviceps purpurea*: cloning, functional analysis, and expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 147, p. 1325 – 1333, 2008.
- MELLO, J. C. P. De; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., MENTZ, L. A. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**, 1 ed. Artmed, 2016.
- MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Mediterranean dietary traditions for the molecular treatment of human cancer: anti-oncogenic actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, p. 495 – 502, 2006.
- MIURA, S. *et al.* Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 65 – 69, 2003. doi:10.1016/S1389-1723(03)90098-3.
- MOSTROM, M. Trichothecenes and zearalenone. **Reproductive and Developmental Toxicology**, p. 739 – 751, 2011. doi:10.1016/b978-0-12-382032-7.10054-2

NACHMAN, K. E.; SMITH, T. J. S. Hormone use in food animal production: assessing potential dietary exposures and breast cancer risk. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, p. 1 – 14, 2015.

NASH, R. J.; FENTON, K. A.; CATEHOUSE, A. M. R.; BELL, A. E. Effect of the plant alkaloid castanospermine as an anti-metabolite of storage pests. **Entomology Experiment Applied**, v. 42, p. 71 – 77, 1986.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311 – 335, 2012. doi: 10.1021/np200906s.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems Biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054 – 1056, 2008.

NIELSEN, C.; SUTTON, D. A.; MATISE, I.; KIRCHHOF, N.; LIBAL, M. C. Isolation of *Cokeromyces recurvatus*, initially misidentified as *Coccidioides immitis*, from peritoneal fluid in a cat with jejunal perforation. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 372 – 378, 2005.

NORBÄCK, D.; HASHIM, J. H.; CAI, G.-H.; HASHIM, Z.; ALI, F.; BLOOM, E.; LARSSON, L. Rhinitis, Ocular, Throat and Dermal Symptoms, Headache and Tiredness among Students in Schools from Johor Bahru, Malaysia: Associations with Fungal DNA and Mycotoxins in Classroom Dust. **Plos One**, v. 11, n. 2, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0147996

NOU, M. J. R.; KIERS, J. L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 789 – 805, 2005.

ORLANDELLI, R. C., ALBERTO, R. N.; RUBIN FILHO, C. J.; PAMPHILE, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 1575 – 1585, 2012.

OLIVEIRA, T. G. L. De; MENDES, G. P.; CAMBUIM, I. I. F. N. Mucormicose aguda por *Rhizopus* isolado de fragmento de tecido pulmonar de paciente imunocomprometido: relato de caso / Acute Mucormycosis due to *Rhizopus* isolated in patient's lung tissue fragments: case report. **Revista Ciências em Saúde**, v. 7, n. 3, p. 21 – 24, 2017.

PALACIOS, I., LOZANO, M., MORO, C., D'ARRIGO, M., ROSTAGNO, M. A., MARTÍNEZ, J. A., VILLARES, A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 674 – 678, 2011. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.085

PARKER, V. J.; JERGENS, A. E.; WHITLEY, E. M.; FRANA, T. S. Isolation of *Cokeromyces recurvatus* from the gastrointestinal in a dog with protein-losing enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1014 – 1016, 2011.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M.S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 204 – 207, 2016. doi: 10.1016/j.drudis.2015.01.009.

PEREIRA, M. S. F. **Fungo micorrízico arbuscular e glicina betaína aumentam a tolerância de pinhão-mansão em condições de estresse abiótico** (Tese - Doutorado em Microbiologia Agrícola). 152 p – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2012.

RAMANI, R.; NEWMAN, R.; SALKIN, I. *Cokeromyces recurvatus* as a human pathogenic fungus: case report and critical review of the published literature. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 19, p. 155 – 158, 2000.

RAO, N.; XIAO, M. P.; LI, W. J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01113

RAY, R. C.; RAVI, V. Post-harvest spoilage of sweet potato in tropics and control measures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 623 – 644, 2005.

REDLICH, C. A.; SPARER, J.; CULLEN, M. R. Sick-building syndrome. **The Lancet**, v. 349, n. 9057, p. 1013 – 1016, 1997. doi: 10.1016/s0140-6736(96)07220-0

RHIDRUGO, J. C.; MUNOZ, M. D., ANDALUZ, E.; LARRIBA, G. Inhibition of yeast exoglucanases by glucosidase inhibitors. **Biochemistry et. Biophysica Acta**, v. 993, p. 179 – 185, 1989.

RHINEHART, B. L.; ROBINSON, K. M.; KING, R.; LIU, P. S. Castanospermine-glucosides as selective disaccharidase inhibitors. **Biochemistry Pharmaceutical**, v. 39, n. 10: 153 – 1543, 1990.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J.A. In silico analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5,8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 935 – 950, 2013.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, n. 2, p. 236 – 301, 2000.

ROUSH, W.R.; D'AMBRA, T. E. Total synthesis of verrucarol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 4, p. 1058 – 1060, 1983.

RYAN, L. J.; FERRIERI, P.; POWELL, R. D.; PADDOCK JR, C. D. ZAKI, S. R.; PAMBUCCIAN, S. E. Fatal *Cokeromyces recurvatus* pneumonia: Report of a case highlighting the potential for histopathologic misdiagnosis as *Coccidioides*. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 373 – 376, 2011.

SAN-BLAS, G., YEGRES, F. J.: Effects of cyanein and ramihyphin A on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Folia Microbiologica**, v. 23, p. 198 – 201, 1978.

SARKER, S. D., NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321 – 324, 2007.

SAUL, R.; CHAMBERS, J. P.; MOLYNEUX, R. J.; ELBEIN, A. D. Castanospermine, a tetrahydroxylated alkaloid that inhibits glucosidase and p-glucocerebrosidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 221, n. 2, p. 593 – 597, 1983.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K.V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosan. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, 1999.

SHARMA, N.; SCHWARTZMAN, J. D.; GUTMANN, E.J.; MAROTTI, J. D.; LIU, X. *Cokeromyces recurvatus* in a Papanicolaou test: An exceedingly rare finding that can be mistaken for *Paracoccidioides brasiliensis*. **CytoJournal**, v. 15, n. 5, 2018.

SPATAFORA, J. W. *et al.* A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028 – 1046, 2016. doi: 10.3852/16-042, 2016.

SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, A. K.; PANDEY, R.; VERMA, R. K.; GUPTA, M. M. Quantitative determination of reserpine, ajmaline, and ajmalicine in *Rauwolfia serpentina* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, p. 557 – 560, 2006.

SRIVASTAVA, M.; SHARMA, S.; MISRA, P. Elicitation based enhancement of secondary metabolites in *Rauwolfia serpentina* and *Solanum khasianum* hairy root cultures. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 3, p. 315 – 320, 2016.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214 – 216, 1993.

STROBEL, G. A., STIERLE, A., STIERLE, D. & HESS, W. M. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. **Mycotaxon**, v. 47, p. 71 – 80, 1993.

STÜTZ, A. E. Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond, Wiley-VCH, New York, v. 8, 1999.

STRAUS, D. C. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 9-10, p. 617 – 635, The Author(s), 2009. doi:10.1177/0748233709348287

SZATHMARY, C. I.; MIROCHA, C. J.; PALYUSIK, M.; PATHRE, S. V. Identification of mycotoxins produced by species of *Fusarium* and *Stachybotrys* obtained from Eastern Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 4, 579 – 584, 1976.

TAMANO, T.; BRUNO, K. S.; KARAGIOSIS, S. A.; CULLEY, D. E.; DENG, S.; COLLET, J. R.; UMEMURA, M.; KOIKE, H.; BAKER, S. E.; MACHIDA, M. Increased production of fatty acids and triglycerides in *Aspergillus oryzae* by enhancing expressions of fatty acid synthesis-related genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 269 – 281, 2013.

TAMURA, G.; ANDO, K.; SUZUKI, S.; TAKATSUKI, A.; ARIMA, K. Antiviral activity of Brefeldin A and Verrucarin. **The Journal of Antibiotics**, v. 21, n. 2, 1968.

TSAI, T. W.; HAMMOND, L. A.; RINALDI, M.; MARTIN, K.; TIO, F.; MAPLES, J.; FREYTES, C. O.; ROODMAN, G. D. *Cokeromyces recurvatus* infection in a bone marrow transplant recipient. **Bone Marrow Transplantation**, v. 19, p. 301 – 302, 1997.

TUDZINSKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, 298 – 231, 1999.

van de LOO, F. J.; BROUN, P.; TURNER, S.; SOMERVILLE, C. An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 18, p. 6743 – 6747, 1995.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, 2006.

VOIGT, K.; KIRK, P. M. Classification of Zygomycetes: reappraisal as coherent class based on a comparison between traditional versus molecular systematics. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, 2014.

VURRO, M.; EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M. C.; GIORDANO, F.; MOTTA, A. Brefeldin A and  $\alpha$ ,  $\beta$ -dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. **Plant Science**, v. 138, p. 67 – 79, 1998.

WADE N. L.; MORRIS, S. C. Causes and control of cantaloupe post-harvest wastage in Australia. **Plant Disease**, v. 66, p. 549 – 552, 1982.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51 – 57, 2002.

WANG, Y.; ZHANG, S.; PÖTTER, M.; SUN, W.; LI, L.; YANG, X.; JIAO, X.; ZHAO, Z. K. Overexpression of  $\Delta$ 12-fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1497 – 1507, 2016.

WANI M.C., TAYLOR H.L., WALL M.E., COGGON P., MCPHAIL A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of American Chemical Society**, v. 93, p. 2325 – 2327, 1971. doi: 10.1021/ja00738a045.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press. 2003.

WILLENBORG, D. O.; PARISH, C. R.; COWDEN, W. B. Inhibition of adjuvant arthritis in the rate by phosphor sugars and the alpha glucosidase inhibitor castanospermine. **Immunology Cell Biology**, v. 70, n. 6, p. 369 – 377, 1992.

YAGEN, B.; JOFFE, A. Z.; HORN, P.; MOR, N.; LUTAKY, I. I. Mycotoxins in Human and Animal Health. In: Rodricks, J. V.; Hesseltine, C. W.; Mehlman, M. A.; Eds.; **Pathotox**, v. 11, 1977.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metals removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4486 – 4496, 2003.

YANG, S.; HOGGARD, J. C.; LIDSTROM, M. E.; SYNOVEC, R. E. **Metabolomics in Practice**; Lammerhofer, M., Weckworth, W., eds.; Wiley: Hoboken, 2013.

YOSHINO, K.; KONDOU, Y.; ISHIYAMA, K.; IKEKAWA, T.; MATSUZAWA, T.; SANO, M. Preventive effects of 80% ethanol extracts of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus* on mouse type IV allergy. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 76 – 80, 2008.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2557 – 2561, 2007.