

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

F383p de Lima Ferreira, Julie Kenya  
Prospecção química de metabólitos secundários de fungos amazônicos e a influência de diferentes xenobióticos em seu metabolismo / Julie Kenya de Lima Ferreira. Manaus : [s.n], 2018.  
39 f.: color.; 24 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas -  
Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas,  
Manaus, 2018.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen

1. Penicillium spp. 2. OSMAC. 3. metabólitos secundários. I. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Prospecção química de metabólitos secundários de fungos amazônicos e a influência de diferentes xenobióticos em seu metabolismo



GOVERNO DO ESTADO DO  
**AMAZONAS**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: <i>Julie Kemmya Ferreira</i>
TÍTULO DO TCC: <i>Prospecção química de metabólitos secundários de fungos amazônicos e a influência de diferentes xenobióticos em seu metabolismo.</i>

### AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	<i>9,8</i>
b) 1º avaliador(a):	<i>9,6</i>
c) 2º avaliador(a): <i>Rosilene Gomes</i>	<i>9,6</i>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<i>9,7</i>

MÉDIA DA NOTA: *9,7*

Manaus, *28* de *Novembro* de 2018

### ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

*Necler Verique*  
Orientador(a)

*Teda Hortencio Batista*  
1º Avaliador(a)

*[Assinatura]*  
2º Avaliador(a)

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROSPECÇÃO QUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
AMAZÔNICOS E A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES XENOBIÓTICOS EM SEU  
METABOLISMO

MANAUS – AM 2018.

JULIE KENNYA DE LIMA FERREIRA

PROSPECÇÃO QUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
AMAZÔNICOS E A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES XENOBIÓTICOS EM SEU  
METABOLISMO

Trabalho de conclusão de curso em  
Ciências biológicas pela  
Universidade do Estado do  
Amazonas - UEA

Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

MANAUS – AM 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

## AGRADECIMENTOS

Pela finalização do curso, pela elaboração do trabalho final, pelas conquistas pessoais e acadêmicas, agradeço a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para as experiências vividas e aprendizados adquiridos e que pude compartilhar durante esses cinco anos na UEA, entre essas pessoas, destaco aqui:

Prof. Dr. Jair Max Furturnato Maia, por ter lapidado e moldado minha postura acadêmica desde o primeiro período de graduação, agradeço o investimento prestado a mim, bem como a confiança e preocupação durante os projetos de pesquisa e até depois que os mesmos foram finalizados. Agradeço a amizade e o companheirismo desses anos, as reviradas de olhos e puxões de orelha que muitas vezes fiz por merecer.

Em memória da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Frazão Teixeira, por ter me apresentado à pesquisa científica, por ter sido a pessoa a iniciar a montagem do meu Currículo Lattes e, depois de dois anos lutando contra seus diversos problemas de saúde, por ter sido quem soube me manter no curso.

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen, por ter surgido na minha vida não cedo demais e nem tarde demais, mas no momento certo, de forma a colaborar para o meu amadurecimento acadêmico e pessoal ao me ensinar que eu precisava crescer. Por ter tido discernimento nos imprevistos que nos aconteceram, preocupando-se em manter o meu foco e atenção no trabalho. Não éramos perfeitos, mas funcionamos juntos.

Aos os melhores amigos que eu poderia ter: Alzira Frota, Luan Honorato, Italo Almeida, Nívia Bianca, Paulo Alexandre e Sarah Raquel. Ter vocês ao meu lado – por mais que distantes – tornou tudo mais fácil, não só as etapas finais, mas durante todos os anos de graduação.

À minha família da Arte, ao Coven Lua do Norte, eu simplesmente não tenho o que argumentar, os Deuses quiseram vocês no meu caminho. Por isso a única coisa que eu posso dizer é um imenso e feliz encontro, feliz partida e feliz encontro novamente.

À família que os Deuses me presentearam, e aqui faço um adendo: NADA seria possível sem meus pais que trabalharam muito para que eu

tivesse um ensino de qualidade, com os melhores professores e nas melhores escolas, acreditando sempre que eu alcançaria meus objetivos mesmo eu nunca esperando alcançá-los e por esse motivo, as coisas vinham, eu me surpreendia, chorava e eles sempre já estavam a esperar. Por serem os melhores exemplos de vida e de profissionais: à minha madrinha Adelacy Lima, bióloga de primeira formação e enfermeira e à minha tia Adelaneide Lima, engenheira florestal, professora e licenciada em química. Tão certo quanto poderia ser, nossa família sempre se encontra no final das ramificações acadêmicas e, por que não, espirituais.

*Morrigan, Morrigan, three times three  
Hear the words I ask of Thee.  
Grant me vision, grant me power,  
Cheer me in my darkest hour.  
As the night overtakes the day,  
Morrigan, Morrigan light my way...  
Morrigan, Morrigan, raven Queen, round  
and round the Hawthorn green.  
Queen of beauty, Queen of Art,  
Yours my body, your my heart.  
All my trust I place in Thee,  
Morrigan, Morrigan, be with me.*

*~ Luna's Grimoire ~*



## RESUMO

Fungos são microrganismos capazes de habitar todos os lugares do planeta, até biomas mais extremos, devido a inúmeras adaptações estimuladas por fatores limitantes a sua sobrevivência, como temperatura, tipo de solo e umidade. Isso se deve por conta da sua necessidade de se manter energeticamente transformando e interconvertendo diversos compostos orgânicos da natureza para viver, crescer, se reproduzir e construir seus próprios tecidos. Para isso, há um sistema de reações químicas auxiliadas por enzimas que trabalham em conjunto com o metabolismo intermediário para a destinação desse material através de vias metabólicas distribuídas no organismo do ser vivo, são elas as vias participantes do metabolismo primário e do metabolismo secundário. Os produtos biossintetizados por fungos para a sua adaptação ao meio já se mostraram úteis ao ser humano em diversas áreas de aplicação, com isso, o avanço biotecnológico tem apresentado técnicas laboratoriais para a estimulação da produção desses biocompostos, em destaque a OSMAC. Afim de aplicar tal metodologia no presente trabalho, cepas de *Penicillium funiculosum* e *Penicillium chrysogenum* foram submetidas a tratamentos com variação de meio de cultura e adição de sais xenobióticos ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para avaliação do comportamento metabólico das amostras através do perfil químico obtido por cromatogramas de LC-MS/MS no modo positivo. Como resultado, observou-se a inibição da produção de metabólitos secundários por  $\text{CuSO}_4$ , como a roquerfotina C ( $m/z$  322  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), pistillarina ( $m/z$  418  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), ácido terréstrico ( $m/z$  211  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), isoquinocitrinina A ( $m/z$  234  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) e produção por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de brocazina A ( $m/z$  453  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) nas cepas selecionadas dos fungos. Com isso, pode-se concluir que a inserção de xenobióticos no cultivo, afetou de forma direta o metabolismo secundário das cepas.

**Palavras-chave:** *Penicillium* spp., OSMAC, metabólitos secundários

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Repetições de unidades $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina formando uma molécula de quitina. ....	11
Figura 2. Representação esquemática da localização de Spitzenkörper (S) em uma hifa septada. ....	12
Figura 3. Representação de metabólitos secundários produzidos por fungos. Penicilina G, isolada de <i>Penicillium chrysogenum</i> ; Lovastatina, isolada de <i>Aspergillus terreus</i> ; Ciclosporina, isolada de <i>Tolypocladium inflatum</i> . ....	15
Figura 4. Estruturas químicas dos compostos naturais isolados por fungos utilizados na indústria farmacêutica. ....	17
Figura 5. Representação do Time Lapse de crescimento fúngico obtido no presente estudo. ....	21
Figura 6. Sistema de filtração usado para obtenção do caldo fúngico de cada tratamento. ....	22
Figura 7. Extrato fúngico obtido a partir do rotaevaporador (A); Extratos fúngicos prontos para secagem em dessecadora (B); Representação do rotaevaporador utilizado no preparo das amostras. ....	23
Figura 8. Cromatogramas de LC-MS/MS no modo positivo dos cultivos de <i>P. chrysogenum</i> com indicações dos compostos naturalmente produzidos pelo fungo que sofreram inibição por $\text{CuSO}_4$ , roquefortina C e de pistillarina. ....	31
Figura 9. Cromatogramas de LC-MS/MS no modo positivo dos cultivos de <i>P. funiculosum</i> com indicações dos compostos naturalmente produzidos pelo fungo que sofreram inibição por $\text{CuSO}_4$ e $\text{NH}_4\text{Cl}$ em Sabouraud ácido terréstrico e isoquinocitrinina A, com acréscimo de nova substancia. ....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivos de controle de <i>P. funiculosum</i> para os tratamentos em OSMAC. ....	24
Tabela 2. Variações de esporulação de <i>P. funiculosum</i> em cada meio de cultura com adição de xenobióticos. ....	26
Tabela 3. Cultivos de controle de <i>P. chrysogenum</i> para os tratamentos em OSMAC. ....	27
Tabela 4. Variações de esporulação de <i>P. chrysogenum</i> em cada meio de cultura com adição de xenobióticos. ....	29

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 ECOLOGIA.....	Erro! Indicador não definido.
1.2 ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA DOS FUNGOS .....	10
1.3 METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO .....	12
1.4 ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DE GENES.....	14
1.5 APLICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	16
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS.....	18
3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS .....	19
3.3 PLANO EXPERIMENTAL DE OSMAC: REATIVAÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA .....	20
3.4 PLANO EXPERIMENTAL DE OSMAC: SELEÇÃO, AMPLIAÇÃO E PREPARO DE EXTRATOS.....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
4.1 ANÁLISES MACROSCÓPICAS DE <i>P. funiculosum</i> .....	23
4.2 ANÁLISES MACROSCÓPICAS de <i>P. chrysogenum</i> .....	27
4.3 ANÁLISES DE LC-MS/MS .....	30
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica, maior floresta tropical do mundo, abriga uma ampla diversidade de espécies de microrganismos em seus sistemas ecológicos naturais, responsáveis pelo auxílio na ciclagem de nutrientes e na manutenção de ecossistemas estabelecidos principalmente em solos pobres (MOORE et al. 2011). A eficiência desses microrganismos reflete na velocidade em que os nutrientes são assimilados pelo meio biótico através dos processos de decomposição da matéria orgânica morta, mediada pelos mesmos, a fim de propiciar o equilíbrio dinâmico dos biomas (SANTOS e CRISI, 1981).

Estes microrganismos são capazes de habitar todos os lugares admissíveis do planeta, até biomas mais extremos, devido a inúmeras adaptações estimuladas por fatores limitantes a sua sobrevivência, como temperatura, tipo de solo e umidade (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). Entre eles, destacam-se os fungos, capazes de sintetizar enzimas responsáveis pela quebra de moléculas complexas presentes no meio em que estão inseridos para, dessa forma, tornarem àquelas importantes para sua sobrevivência mais fáceis de serem absorvidas (CHEN et. al., 2017).

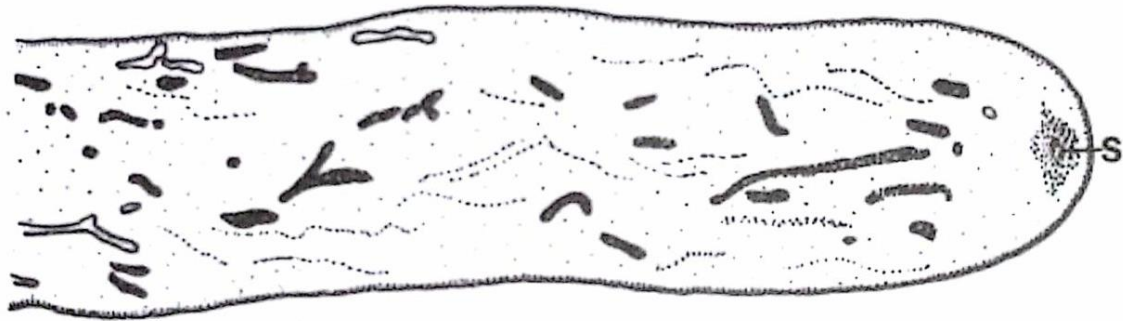
É a partir deste processo que os nutrientes também são disponibilizados para a assimilação por seres vivos presentes no ecossistema, sendo esta etapa de extrema importância para a manutenção biológica do local, pois além de disponibilizarem os macro e micro nutrientes para o solo através do processo de decomposição, há também a liberação de dióxido de carbono para atmosfera, elemento primordial ao desenvolvimento das espécies vegetais do ambiente em que o organismo está inserido (RAVEN et. al., 1976).

### 1.1 ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA DOS FUNGOS

Além de contar com a maquinaria para expressão enzimática no processo de nutrição própria, os fungos também possuem particularidades que os diferem de outros seres vivos, como ausência de clorofila, presença de quitina, polissacarídeo estrutural constituído por polímeros de cadeia longa de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina localizada na parede celular (Figura 1), capacidade de se apresentar em duas fases vegetativas nas formas levuriforme e hifal, sendo a última forma possuínte de organização pseudocelular elaborada por conexões



**Figura 2.** Representação esquemática da localização de Spitzenkörper (S) em uma hifa septada.



Fonte: Modificado de Deacon (1997)

Entretanto, a participação das hifas não se limita apenas a nutrição e crescimento micelial do fungo, mas também auxilia nos processos reprodutivos dos organismos, pois da mesma forma em que existem hifas especializadas para tais funções, há aquelas que participam diretamente dos processos de reprodução assexuada ou sexuada dos fungos, as hifas aéreas (MEDEIROS, 2014). Na reprodução assexuada, há a produção de gomos ou brotos que se ramificam originados do trabalho de brotamento, já na reprodução sexuada, as hifas aéreas fazem o papel de estruturas reprodutivas e são as mesmas que participam da cariogamia presente no ciclo reprodutivo dos fungos, garantindo a formação de zigotos e posterior produção de esporos haploides (FERREIRA, 2005).

## 1.2 METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Todos os fungos precisam se manter energeticamente transformando e interconvertendo diversos compostos orgânicos da natureza para viver, crescer, se reproduzir e construir seus próprios tecidos. Para isso, há um sistema de reações químicas auxiliadas por enzimas que trabalham em conjunto com o metabolismo intermediário para a destinação desse material através de vias metabólicas distribuídas no organismo do ser vivo (DEWICK, 2009).

Esse trabalho realizado pelo metabolismo intermediário se dá graças a processos de catabolismo e anabolismo ocorrendo de forma simultânea e reguladas de forma conjunta, desde o processo de liberação de energia das moléculas disponíveis no meio até o processo de biossíntese de compostos

necessários para a constituição da estrutura do organismo, sendo que cada um desses processos é realizado de acordo com a necessidade do organismo em se manter (NELSON et. al., 2014; MADIGAN et. al., 2014).

Dentre as moléculas orgânicas nutrientes de crucial importância, tem-se carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e ácidos graxos e por mais que os organismos existentes tenham inúmeras diferenças morfológicas e fisiológicas, as vias de modificação e síntese desses compostos são as mesmas, salvo algumas exceções (DEWICK, 2009). Com isso, podem ser considerados como essenciais para a vida de todos os seres o metabolismo primário, devido a ocorrência de vastos processos de reações químicas necessárias para a sobrevivência do organismo, entre elas, processos de metilação, oxidação, acetilação, fosforilação e outros (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2014).

Pode-se utilizar como exemplo de processo metabólico proveniente de vias primárias a glicólise, descrita como a conversão da glicose em piruvato sem a especificidade de uma via metabólica exclusiva, já que existem três caminhos enzimáticos por onde pode ocorrer o processo de glicólise, essencial a manutenção energética do organismo vivo (MOORE et al., 2011).

Já os metabólitos secundários são aqueles originados do metabolismo secundário do fungo, estes ao contrário dos metabólitos primários não são prioritariamente necessários para o desenvolvimento do organismo, mas participam diretamente nas questões adaptativas das espécies, são moléculas estruturalmente heterogêneas e de baixo peso molecular, produzidas em sua maioria para questões adaptativas do organismo, como defesa (micotoxinas, por exemplo) ou alimentação, onde incluem-se enzimas especiais para esta função (LIMA-NETO et al., 2015).

Para exemplificar a diferença entre os dois tipos de metabolismo, pode-se citar a alimentação a partir da fonte nutricional disponível no ambiente em que o microrganismo está (WANG et. al., 2014). Em bactérias, assim como em alguns fungos por exemplo, a nutrição é comumente realizada a partir da metabolização da glicose, porém em sua ausência, a biossíntese de novas enzimas precisa ser realizada a partir da expressão de genes determinantes para tal (JOAQUIM e HANI, 2010).

### 1.3 ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DE GENES

A descoberta da biossíntese de metabólitos secundários por microrganismos gerou possibilidades de aplicação em diversas indústrias de forma a favorecer o ser humano. O interesse aumentou após a observação de suas eventuais fonte de tratamento contra doenças infecciosas, câncer e seu papel como imunossupressores demonstrou o alto potencial farmacêutico desses bioprodutos como agentes de inovação terapêutica.

Por conta disso, muitas bactérias e fungos começaram a ter seus perfis genéticos sequenciados e a descoberta da alta quantidade de genes participantes das vias metabólicas secundárias, denunciaram a alta plasticidade das mesmas presentes nesses organismos (KJAERBOLLING et. al., 2018). A partir do estudo dos perfis genéticos, definiu-se como *clusters* a localização desses genes em especial, porém os estudos de metabólitos secundários ainda possuem limitações, como por exemplo, o fato de muitos *clusters* permanecerem inativados principalmente em condições laboratoriais e, até a utilização de um indutor, tendem a se manter inativados (CHIANG et. al., 2011).

Esses clusters são regulados por uma rede complexa de múltiplas proteínas e complexos que respondem a diferentes estímulos ambientais, isso inclui a diferença do nível de carbono e nitrogênio, disponibilidade de luz, pH, temperatura, condições de hipóxia e estímulos derivados de outros organismos, entretanto, as respostas a esses estímulos são variadas de acordo com a espécie de fungo e podem produzir diferentes metabólitos em diferentes condições ambientais (BRAKHAGE, 2012; WANG et. al., 2015).

Muitos *clusters* provenientes de microrganismos já foram descobertos e seus produtos metabólicos já foram aplicados com sucesso em áreas comerciais, como é o caso da penicilina G, usada como antibiótico até nos dias atuais, o imunossupressor ciclosporina e o composto utilizado no tratamento da diabetes, lovastatina, todos sendo instituídos de fungos (BRAKHAGE e SCHROECKH, 2012). Juntamente com os compostos já citados, a literatura atual conta com uma biblioteca de mais de 23,000 produtos microbianos – sendo a maioria isolado a partir de fungos – com potencial antifúngico,



antibacteriano, antiviral, citotóxico ou com o papel de agentes imunossupressores (TAMIYA, et. al., 2015).

**Figura 3.** Representação de metabólitos secundários produzidos por fungos. Penicilina G, isolada de *Penicillium chrysogenum*; Lovastatina, isolada de *Aspergillus terreus*; Ciclosporina, isolada de *Tolypocladium inflatum*.



Apesar do inúmero banco de dados a respeito de compostos naturais produzidos por fungos e bactérias, não é descartado o desenvolvimento de novas pesquisas a fim de elucidar compostos ainda não descobertos, através de técnicas que visam à ativação de *clusters* crípticos (LI et. al., 2017). Entre estas técnicas, pode-se citar a utilização da bioinformática para a identificação de metabólitos secundários e suas propriedades físico-químicas, assim como técnicas de cultivo em condições laboratoriais (TAKAHASHI et. al., 2017).

Essa primeira técnica se baseia na síntese de metabólitos secundários por multi-modelos de enzimas, ajudando não apenas na definição das enzimas participantes, mas também em seus substratos, bem como as propriedades físico-químicas dos produtos elucidados (RANK, et. al., 2010). Já em se tratando de técnicas laboratoriais, destaca-se a metodologia OSMAC (*One-strain, many compounds*), uma metodologia de indução da ativação de vias metabólicas inativadas através das respostas gênicas frente a diferentes condições como, mudanças nutricionais no substrato de cultivo, co-cultivo entre duas espécies de fungos ou com outros microrganismos (tais como bactérias), além de situações de estresse através de estímulos externos ao seu

desenvolvimento, como por exemplo, a adição de xenobióticos resistentes a degradação fúngica (KELLER et. al., 2005; FILL et. al., 2016; LOPES, 2011).

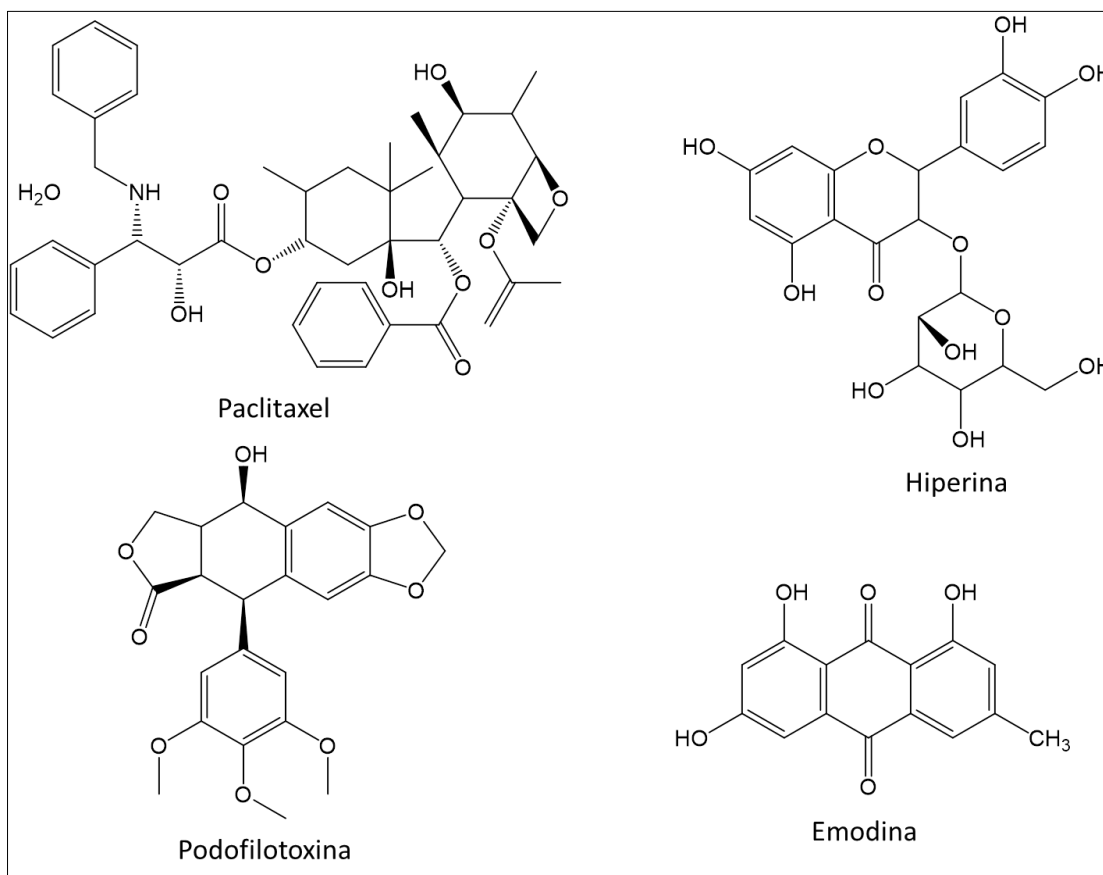
#### 1.4 APLICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Como já foi citado, uma das maiores contribuições dos produtos naturais isolados de microrganismos foi a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, logo após isso, muitos outros bioprodutos começaram a ser isolados de outros microrganismos, como a estreptomicina que foi um dos primeiros aminoglicosídeos isolado da actinobactéria *Streptomyces griseus* e o composto antibacteriano cloranfenicol isolado primeiramente do microrganismo *Streptomyces venezuelae* (HÖLKER et. al., 2004).

Além disso, metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos também demonstraram ser fontes de biomoléculas em potencial a partir da descoberta de compostos anticancerígenos, como paclitaxel – isolada do fungo *Taxomyces andreanae* – podofilotoxina isolada de *Penicillium* sp., além dos antidepressivos hiperina e emodina isolados de *Chaetomium globosum* (Figura 4) (SILVA et. al., 2015).

Com isso, a indústria redirecionou seu foco e esforço para a utilização desses compostos para outras indicações e não somente para fins farmacêuticos como moléculas com atividades anticancerígenas ou antidepressivas, obtendo diversos imunossupressores que revolucionaram a medicina no auxílio de transplante de órgãos, drogas antitumorais, drogas hipocolesterolêmicas, inibidores enzimáticos, estimulantes para o crescimento de ruminantes, inseticidas, herbicidas, antiparasitários contra coccídeos e helmintos, fabricação de alimentos e bebidas por processos de fermentação e diversas outras aplicações (CARDENAS et. al., 1998; KREMER et. al., 2000; VERDINE, 1996).

**Figura 4.** Estruturas químicas dos compostos naturais isolados por fungos utilizados na indústria farmacêutica.



Na indústria alimentícia, os destaques vão para a produção de alimentos como pães (*Saccharomyces cerevisiae*), shoyo (*Aspergillus oryzae*), queijos (*Penicillium roqueforti*) e bebidas fermentadas, como cervejas, vinhos e cachaças (*Saccharomyces cerevisiae*) e, tal como ocorre atualmente na indústria farmacêutica, os trabalhos voltados para o ramo alimentício tende a aumentar principalmente por suas propriedades probióticas, aumentando também por consequência os estudos sobre processos fermentativos de microrganismos (TAKAHASHI et. al., 2017).

Já na indústria de cosmetologia, destacam-se os países da Ásia que desenvolvem estudos de incorporação de bioprodutos fúngicos em cosméticos tradicionais, como loções e ou nutricosméticos. Entre os mais utilizados, pode-se citar a produção de Esquizofilano pelo fungo *Schizophyllum commune*, composto este utilizado para proteger a pele de raios UV (MATUO et. al, 2007), e a ergotioneína, anti-oxidante presente em produtos para antienvhecimento, isolada de *Agaricus bisporus* (JHOEL e BHIMBA, 2013).

Como demonstrado, os bioprodutos oriundos de fungos estão presentes em muitos outros ramos. Elucidar e explorar essas moléculas biotecnologicamente proporciona acesso e auxílio não só no tratamento de doenças através de fármacos produzidos a partir de moléculas encontradas nesses metabólitos, mas também participam de processos de produção em diversas outras áreas.

Com isso, o estudo da prospecção química dos metabólitos secundários de fungos possui alta relevância, principalmente se estiver aliado a testes de indução do metabolismo visando o aumento da síntese dos metabólitos, pois é possível que a expansão da produção proporcione moléculas – novas ou não – de interesse humano e, dessa forma, viabilize novas vias de tratamentos médico para doenças atuais e novos processos de produção industrial em larga escala utilizando técnicas de baixo custo.

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a influência de xenobióticos no metabolismo de *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium funiculosum*

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar diferenças metabólicas em cultivos de cepas previamente isoladas de *P.chrysogenum* e *P.funiculosum* frente a diferentes meios de cultura
- Caracterizar parcialmente o metabolismo das cepas sob a adição dos xenobióticos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS**

As amostras de *P.funiculosum* foram obtidas a partir da coleta de sedimento arenoso presente no fundo do Igarapé do Mindú, em Manaus-AM (3° 06' 05.5" S e 60° 01' 28.2" W). Já a amostra de *P.chrysogenum* foi obtida a partir do fruto do buriti (*Mauritia flexuosa* L.F), coletado no km 106 da rodovia AM-010 na propriedade particular de Koolen, H.H.F. (município de Rio Preto da

Eva, 2° 43' 11.2" S e 59° 31' 08.5" W). O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Biotecnologia da UEA-ESA para a realização da assepsia, conforme estabelecido previamente por Koolen e colaboradores (2012) para o manuseio do material botânico, já as amostras de solo seguiram a metodologia de assepsia conforme Abreu e colaboradores (2015), sem modificações.

Com isso, foram realizadas diluições seriadas para a obtenção de culturas monospóricas e, a partir disso, as culturas puras foram selecionadas e preservadas conforme metodologia de Castellani (1939) e depositadas na coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS

Os isolados monospóricos foram crescidos em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação à 150 rpm e 28 °C para obtenção e massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% de Doyle & Doyle, (1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m) e quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluídas para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') conforme White et al (1990), NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') conforme Carbone e Kohn, (1999) os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 1200 pares de bases, destes, aproximadamente 500 pb correspondem à região ITS e 700 pb correspondem a LSU 28S.

Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de

25 µL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57°C por 1 min., extensão de 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.3 PLANO EXPERIMENTAL DE OSMAC: REATIVAÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Para aplicação da metodologia OSMAC foram selecionados quatro sais xenobióticos, sendo estes CuSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e MgSO<sub>4</sub>, que foram inseridos juntamente ao preparo de quatro meios de cultura sólidos para análise da variação de fonte nutricional quanto ao crescimento e pigmentação nas seguintes proporções:

- BDA (300 mL de água destilada, 60g de batata, 6g de dextrose, 4,5g de Ágar e 0,05g de xenobiótico).
- Sabouraud-ágar (300 mL de água destilada, 6g de Glicose, 3g de peptona, 4,5g de Ágar e 0,05g de xenobiótico).
- *International Streptomyces Project 2-ágar* (ISP<sub>2</sub>, ISP2, 300 mL de água destilada, 1,2g de amido, 1,2g de extrato de levedura, 0,05g de xenobiótico).
- Czapek modificado-ágar (300 mL de água destilada, Glicose 3 g, 0,9 g de NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g de MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g de KCl, 1,5 g de FeSO<sub>4</sub>, 4,5 g de Ágar e 0,05 g de xenobiótico).

De forma simultânea ao preparo dos meios de cultura com xenobióticos, também foram preparados nas mesmas condições os meios para os cultivos de

controle, sem a presença de nenhum sal. Com isso, os esporos preservados em Castellani foram reativados em monoplicatas para todos os meios de cultura, adicionando alíquotas de 60  $\mu$ L de solução de tetraciclina 3% divididos em todas as placas.

Após isso, as placas recém-inoculadas foram lacradas e armazenadas em estufa incubadora do tipo BOD sob condições de temperatura em 28 °C. Com isso, foi registrado em *time lapse* com intervalos de 72 horas o crescimento das culturas até o fim de 15 dias (Figura 5).

**Figura 5.** Representação do Time Lapse de crescimento fúngico obtido no presente estudo.



### 3.4 PLANO EXPERIMENTAL DE OSMAC: SELEÇÃO, AMPLIAÇÃO E PREPARO DE EXTRATOS

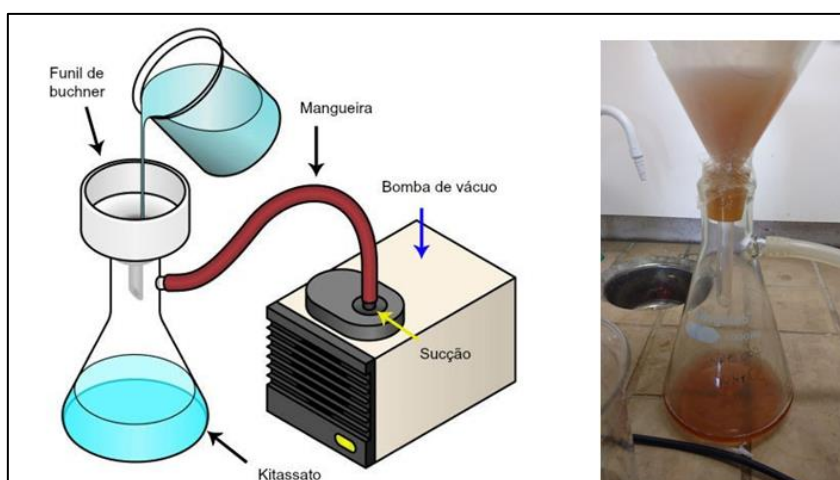
Com o fim de 15 dias de crescimento, foram estabelecidos critérios baseados na conformação macroscópica dos cultivos para a seleção das cepas a serem repicadas. Estes critérios enfatizavam a presença ou ausência de pigmentação extracelular e a variação da coloração micelial observadas no momento da triagem.

Após a seleção dos cultivos de ambos os fungos, as placas em monoplicatas foram repicadas e identificadas em seis novos inóculos sob as mesmas condições de meio de cultura e temperatura de armazenamento. Com 21 dias de crescimento em BOD, foram realizadas as raspagens de todo o material contido nas placas (micélio e o que restava de meio de cultura) para transferência em Béqueres de 500mL contendo solução de solventes preparada a 70% AcOEt e 30% MeOH que fora distribuída entre os béqueres. Após este procedimento, o material fúngico submerso na solução de solventes foi levada ao Sonificador Ultra-sônico USV-1400 por 40 minutos em temperatura ambiente e deixados durante 24 horas envoltos de papel alumínio devido a possível fotossensibilidade do material.

Atingido o tempo pré-estabelecido, os béqueres referentes a cada sistema OSMAC foram levados para a capela de exaustão novamente para a etapa de filtração e obtenção do caldo fúngico. Essa filtração foi realizada com auxílio de um funil de vidro e Kitassato ligado a uma bomba de vácuo para sucção, seguindo o sistema padrão de filtração a vácuo (Figura 6).

Após a obtenção do caldo, cada amostra foi direcionada ao rotaevaporador para obtenção do extrato bruto dos tratamentos. Em seguida, o material foi armazenado em dessecadora com sílica ativada para que a água contida no extrato evaporasse de forma gradual (Figura 6).

**Figura 6.** Sistema de filtração usado para obtenção do caldo fúngico de cada tratamento.



Todos os extratos, antes e depois de armazenados, tiveram seus frascos permanentes pesados para registro da massa de extrato bruto produzido por cada sistema OSMAC. Para isso, foram feitas raspagens com auxílio de metanol de todo o conteúdo contido em cada recipiente que fora anteriormente para a dessecadora, como foi utilizado metanol para facilitar a raspagem do material, tornou-se possível a transferência para os frascos permanentes através de pipetagens de 100  $\mu$ L. Feito isso, os recipientes permanentes foram colocados novamente na dessecadora para secagem final (Figura 7).



**Figura 7.** Extrato fúngico obtido a partir do rotaevaporador (A); Extratos fúngicos prontos para secagem em dessecadora (B); Representação do rotaevaporador utilizado no preparo das amostras.



A etapa final do preparo das amostras para análise se deu da seguinte forma: Foram pesados em Balança Analítica Modelo WALIS o total de 0,003 g de cada extrato seco, as amostras recém-pesadas foram armazenadas em Eppendorfs limpos, etiquetados e esterilizados e em seguida, encaminhados para o Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para análise em LC-MS/MS sob supervisão e cuidados do Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen.

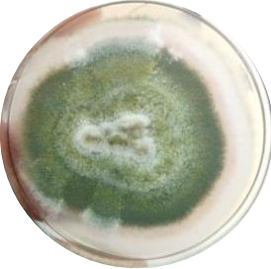


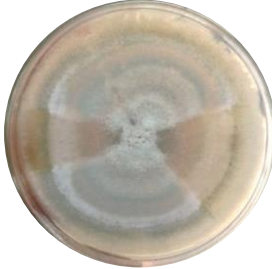
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISES MACROSCÓPICAS DE *P. funiculosum*

Nesse estudo, cepas de *P. funiculosum* e *P. chrysogenum* foram submetidas a cultivos em diferentes meios de cultura, contendo ou não xenobióticos como preconiza a metodologia de OSMAC. Inicialmente, apenas a variação da fonte de carbono e nitrogênio foi suficiente para que fossem observadas mudanças macromorfológicas principalmente na coloração micelial e pigmentação do meio de cultura.

Quando as cepas de *P. funiculosum* foram inoculadas em BDA-controle, o seu micélio apresentou coloração verde e branca de forma alternada até as extremidades que delimitavam o crescimento. Já em Sabouraud-controle, a cepa apresentou padrão de coloração diferente do observado em BDA-controle, alternando-se entre rosa, branco e alaranjado. Diferente de em BDA-controle e Sabouraud-controle, os cultivos em Czapek-controle e ISP<sub>2</sub>-controle apresentaram durante o crescimento um padrão de coloração similar, alternando a coloração do micélio em verde, marrom e branco (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cultivos de controle de *P. funiculosum* para os tratamentos em OSMAC

BDA	Sabouraud	Czapek	ISP <sub>2</sub>
			

Essa variação na resposta frente à mudança dos meios de cultura, sugere que as cepas de *P. funiculosum* estavam melhores adaptadas para aqueles meios cuja fonte nutricional principal derivavam de pectina (BDA-controle) e de peptonas (Sabouraud-controle). Ao submetê-las ao crescimento em meio de cultura cuja fonte nutricional principal era nitrato de sódio (Czapek-controle) e amido (ISP<sub>2</sub>-controle) a resposta de esporulação foi mais fraca, possivelmente devido ao esforço extra que as cepas necessitaram realizar para a conversão das macromoléculas em energia essencial para seu metabolismo.

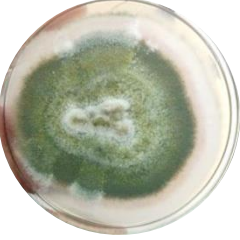



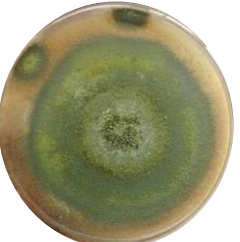


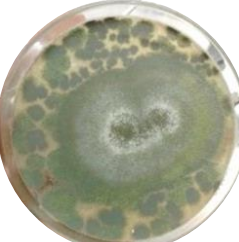
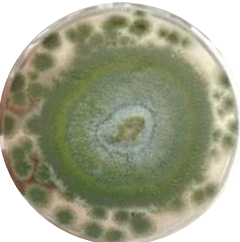



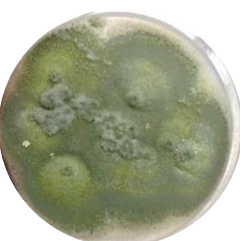



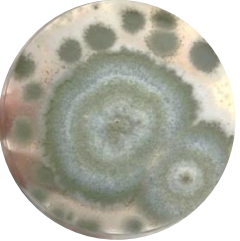

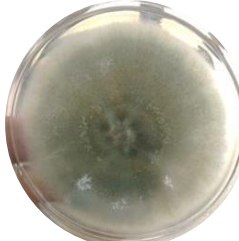

Quando cultivadas nos meios de cultura com adição de xenobióticos, algumas cepas seguiram os padrões de coloração observados em seus controles (Tabela 2). Em BDA+ xenobióticos, a coloração micelial verde foi mantida para as cepas em BDA+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, BDA+NH<sub>4</sub>Cl e BDA+MgSO<sub>4</sub>, com mudança apenas em BDA+CuSO<sub>4</sub>, onde a coloração branca nas extremidades foi substituída para marrom (Tabela 2). Em Sabouraud, a mudança do padrão de coloração ocorreu no tratamento Sabouraud+CuSO<sub>4</sub>, em que as

pigmentações rosa e alaranjado foram substituídas por verde e tons de branco, porém mantendo-se em Sabouraud+  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Sabouraud+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  e Sabouraud+ $\text{MgSO}_4$ . Concomitante a esses resultados, Czapek+ $\text{CuSO}_4$  e  $\text{ISP}_2$ + $\text{CuSO}_4$  também apresentaram variações do padrão de coloração para cada meio de cultura com a substituição das cores para tons de verde, porém também mantiveram-se os padrões de coloração nos tratamentos restantes (Tabela 2).

Essa questão da mudança de coloração do micélio pôde ser observada durante o estudo de Oliveira (2009), em que duas espécies de *Penicillium* sp. foram isoladas de *Alibertia macrophylla* e cultivados em três meios de cultura sólidos diferentes, sendo eles, BDA, meio de milho descascado e o meio BD líquido. Durante esse experimento, as cepas foram observadas durante 21 dias e suas cores tiveram variação entre roxo, verde, branco e marrom. Segundo Zhang e colaboradores (2017), tais mudanças de coloração podem ser resultados da plasticidade das vias metabólicas que podem ser modeladas de forma a serem ativadas ou desativadas em um único cultivo, permitindo que cada célula do metabolismo do microrganismo possa se adaptar às situações em que se encontram, estabelecendo um mosaico de vias metabólicas ainda não alcançadas.

Não obstante, em Sabouraud+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  houve pigmentação extracelular caracterizada pela influência do xenobiótico no metabolismo da cepa, o que sugere uma produção de metabólitos secundários nesse tratamento (Tabela 2). Por conta disso, este cultivo foi selecionado para ampliação de escala, bem como a cepa de Sabouraud-Controle e Sabouraud+ $\text{CuSO}_4$ , devido a mudança brusca de padrão na coloração micelial, permitindo a suposição de que  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tenha demonstrado atividade excitatória para a produção de metabólitos secundários e que  $\text{CuSO}_4$  tenha demonstrado atividade inibitória para a produção.

**Tabela 2.** Variações de esporulação de *P. funiculosum* em cada meio de cultura com adição de xenobióticos.

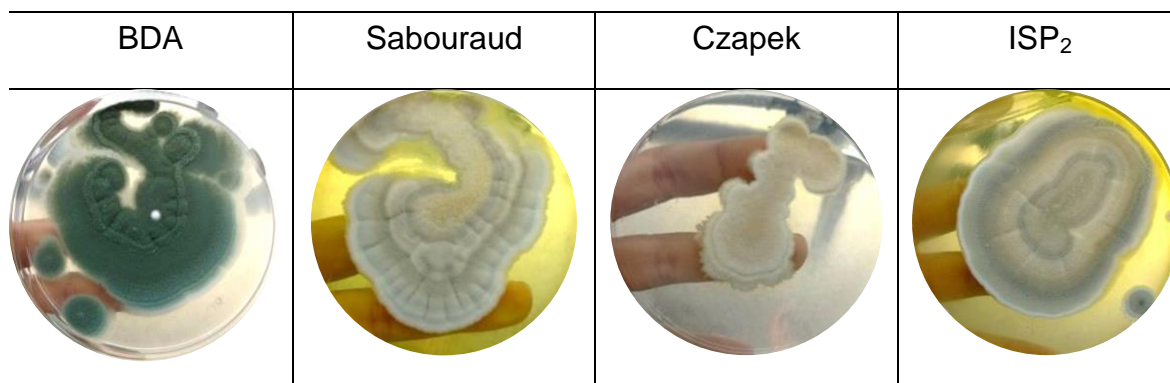
Meio de cultura	BDA	Sabouraud	Czapek	ISP <sub>2</sub>
Controle				
CuSO <sub>4</sub>				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
NH <sub>4</sub> Cl				
MgSO <sub>4</sub>				

#### 4.2 ANÁLISES MACROSCÓPICAS de *P. chrysogenum*

Já quando as cepas de *P. chrysogenum* foram inoculadas em BDA-controle, o micélio apresentou coloração única verde sem pigmentação extracelular e, similar ao observado em BDA-controle, o inóculo em meio Czapek-controle não apresentou pigmentação extracelular, porém a coloração verde dos conídios fora substituída por branco. Já em Sabouraud-controle e em ISP<sub>2</sub>-controle, a coloração micelial apresentou como padrão tons de verde, branco e amarelo de forma alternada, bem como se pôde observar forte pigmentação extracelular de cor amarelada (Tabela 3).

Esse comportamento da pigmentação em amarelo por *P. chrysogenum* também foi observado por Pastre e colaboradores (2007) ao testar a capacidade de produção de pigmentos de 90 morfotipos de *Penicillium* spp. em 4 meios de cultura diferentes. Como respostas, foram encontrados 6 morfotipos de *Penicillium* sp. produtores de pigmentos que variavam de amarelo a vermelho (também observado nos cultivos de *P. funiculosum* em Sabouraud+NH<sub>4</sub>Cl). Seguindo os tratamentos com xenobióticos, as cepas, em sua maioria, mantiveram os padrões de coloração observados em seus controles.

**Tabela 3.** Cultivos de controle de *P. chrysogenum* para os tratamentos em OSMAC.



Em BDA+xenobióticos a coloração verde foi mantida, porém não houve pigmentação extracelular, em Sabouraud+xenobióticos a mudança do padrão de coloração foi observada no tratamento com CuSO<sub>4</sub>, (da mesma forma em que ocorreu nas cepas de *P. funiculosum* no mesmo tratamento), porém a pigmentação extracelular foi presente com intensidades diferentes em todos os

tratamentos de *P. chrysogenum* em Sabouraud, incluindo a cepa de controle. Em Czapek+xenobióticos a mudança de coloração ocorreu em Czapek+CuSO<sub>4</sub> e Czapek+MgSO<sub>4</sub> em que a cor branca presente no controle foi substituída por verde e, por fim, em ISP<sub>2</sub>+xenobióticos, ocorreu mudança de coloração e inibição da pigmentação em ISP<sub>2</sub>+CuSO<sub>4</sub> (Tabela 4).

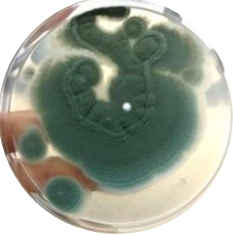


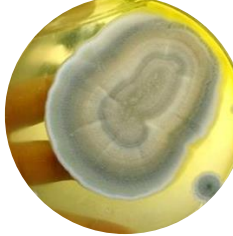
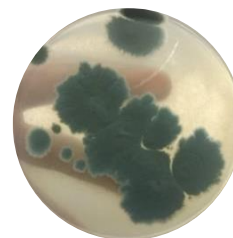
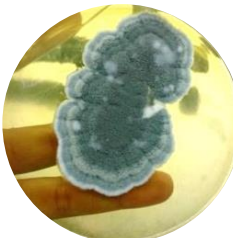










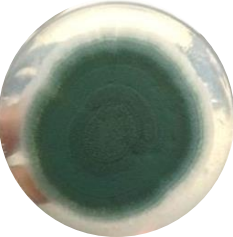


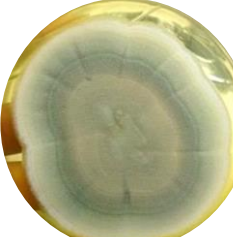
Em questões de coloração micelial sob xenobióticos, Peng e colaboradores (2011) avaliaram o crescimento de cepas de *P. chrysogenum* com adições extras de MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e sal marinho artificial e, como resposta, obtiveram cepas com micélio aéreo sem cor (branco), também observado no presente estudo sob o mesmo tratamento (Tabela 4).

Além disso, as cepas de *P. chrysogenum* apresentaram como resposta à variação das fontes nutricionais de carbono e nitrogênio crescimento mais lento em relação ao observado nas cepas de *P. funiculosum*, como observado nas cepas controle e nas cepas submetidas aos tratamentos com xenobióticos. Apesar de diferenças na coloração micelial dos cultivos de *P. chrysogenum*, a principal variável afetada pela adição dos componentes extras foi a intensidade de pigmentação extracelular, como observado em Sabouraud+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Sabouraud+NH<sub>4</sub>Cl que apresentaram pigmentação mais forte dentre todos os tratamentos (Tabela 4).

De forma contrária, dois xenobióticos se destacaram na aparente função inibitória da produção de metabólitos nos tratamentos ISP<sub>2</sub>+CuSO<sub>4</sub> e Sabouraud+MgSO<sub>4</sub>, no primeiro tratamento (ISP<sub>2</sub>+CuSO<sub>4</sub>) a inibição foi completa devido a ausência total de pigmentos extracelulares quando comparado a cepa de controle (ISP<sub>2</sub>-controle), já no segundo (Sabouraud+MgSO<sub>4</sub>) ainda houve sinais de produção de metabólitos, porém a intensidade de pigmentação foi a mais baixa de todos os cultivos com pigmentos extracelulares.



**Tabela 4.** Variações de esporulação de *P. chrysogenum* em cada meio de cultura com adição de xenobióticos.

Meio de cultura	BDA	Sabouraud	Czapek	ISP <sub>2</sub>
Controle				
CuSO <sub>4</sub>				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
NH <sub>4</sub> Cl				
MgSO <sub>4</sub>				

Fonte: Ferreira, 2017

### 4.3 ANÁLISES DE LC-MS/MS

Foram selecionadas as cepas de *P. chrysogenum* nos tratamentos ISP<sub>2</sub>+CuSO<sub>4</sub> e ISP<sub>2</sub>-controle, e cepas de *P. funiculosum* nos tratamentos Sabouraud+NH<sub>4</sub>Cl, Sabouraud+CuSO<sub>4</sub> e Sabouraud-controle, os conjuntos de cultivos de ambos os fungos foram repicados para ampliação de escala e também posterior análise em LC-MS/MS no modo positivo. Com isso, pôde-se comprovar a atividade inibitória de CuSO<sub>4</sub> empregado nos meios de cultivo selecionados (Figura 8).

De modo similar, Fill e colaboradores (2016) também destacaram essa atividade e acrescentaram MgSO<sub>4</sub>, tanto na inibição da pigmentação quanto na produção de determinados metabólitos secundários, como o verruculogeno 2 – também em concentração padronizada de 0,05g de componentes extras – ao estudar a metodologia OSMAC em cepas de *Penicillium brasilianum* alterando as condições químicas dos meios de cultivo utilizados em seu experimento.

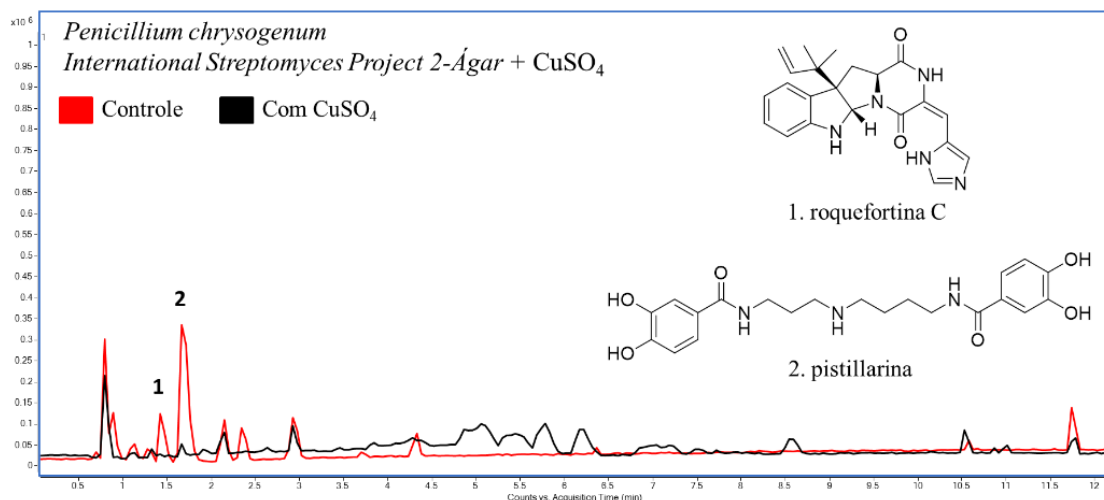
Já no presente estudo, a inibição nos selecionados de *P. chrysogenum* (Figura 8) foi observada na produção do composto roquefortina C ( $m/z$  322 [M+H]<sup>+</sup>) e pistillarina ( $m/z$  418 [M+H]<sup>+</sup>), e nos selecionados de *P. funiculosum* houve a inibição também por CuSO<sub>4</sub> de ácido terrétrico ( $m/z$  211 [M+H]<sup>+</sup>), isoquinocitrinina A ( $m/z$  234 [M+H]<sup>+</sup>) e produção por NH<sub>4</sub>Cl de brocazina A ( $m/z$  453 [M+H]<sup>+</sup>).

A roquefortina C é uma micotoxina termorgênica que foi isolada primariamente a partir de amostras de urina e que é comumente produzida por fungos dos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Claviceps* sp. É um mecanismo de defesa natural e complicações em humanos e animais domésticos por intoxicação desse composto já são registradas com os sintomas de convulsões generalizadas, tremores musculares, rabdomiólise e em casos mais severos, morte (TOR et. al., 2006).

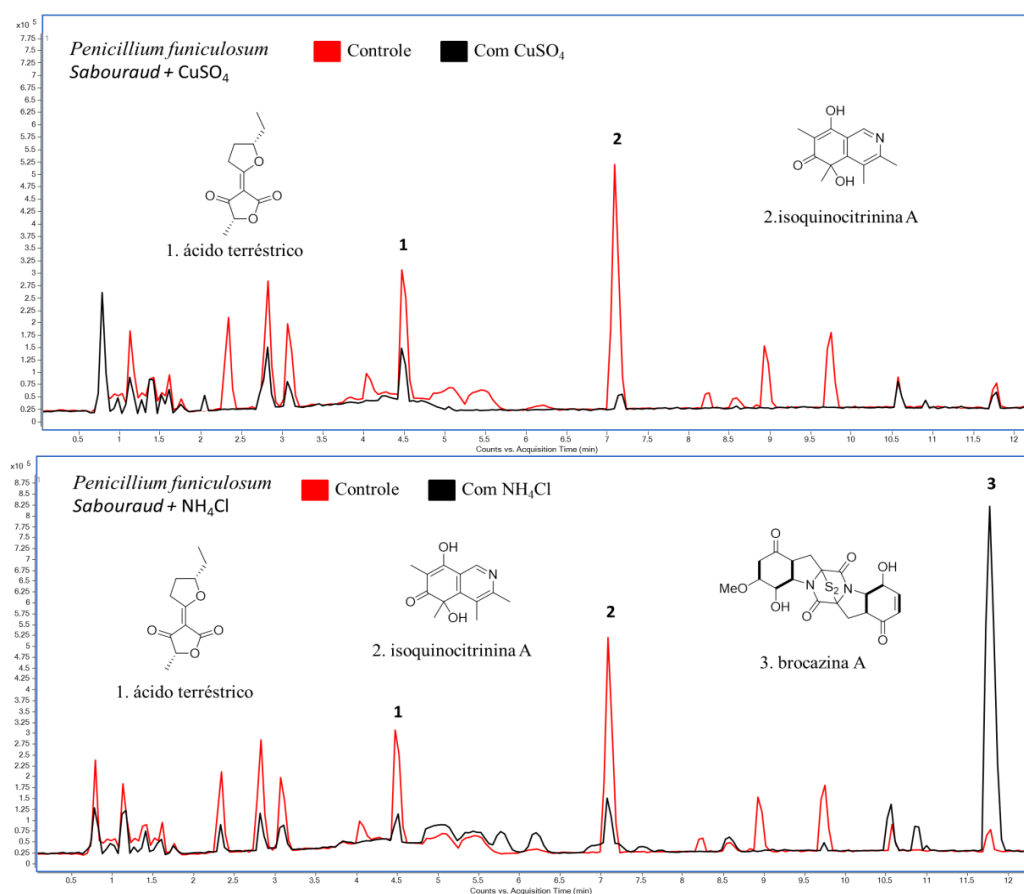
O acréscimo de CuSO<sub>4</sub> nos cultivos de *P. chrysogenum* em ISP<sub>2</sub> causou desvios metabólicos no fungo, impedindo a produção desse composto, o que pôde trazer novas ramificações para tratamentos de combate a toxicidade desse composto. Já a pistillarina é um sideróforo isolado primariamente de *Penicillium bilaii*, o que propõe a substituição da mesma pelo cobre de CuSO<sub>4</sub> (CAPON et. al., 2007).



**Figura 8.** Cromatogramas de LC-MS/MS no modo positivo dos cultivos de *P. chrysogenum* com indicações dos compostos naturalmente produzidos pelo fungo que sofreram inibição por  $\text{CuSO}_4$ , roquefortina C e de pistillarina.



**Figura 9.** Cromatogramas de LC-MS/MS no modo positivo dos cultivos de *P. funiculosum* com indicações dos compostos naturalmente produzidos pelo fungo que sofreram inibição por  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em Sabouraud ácido terréstrico e isoquinocitrinina A, com acréscimo de nova substancia.



Os selecionados de *P. funiculosum* foram analisados em LC-MS/MS no modo positivo que confirmou a inibição por  $\text{CuSO}_4$  de ácido terréstrico e

isoquinocitrinina A (Figura 9). O primeiro foi identificado a partir de isolados de fungos do gênero *Penicillium* sp. e é um metabólito secundário comum em fungos de solo (SMEDSGAARD e FRISVADM, 1996) o segundo composto também é derivado de fungos de solo do gênero *Penicillium* sp. e possui citotoxicidade moderada em células cancerosas, porém sua produção é inibida quando o microrganismo é exposto ao xenobiótico.

Entretanto, a análise de LC-MS/MS denunciou a produção de brocazina A nos selecionados de Sabouraud+NH<sub>4</sub>Cl. Esse composto possui propriedades biológicas de interesse, como atividade antibacteriana, atividade antitumoral e inibidor da replicação viral de HIV-1 (SMEDSGAARD e FRISVADM, 1996).

## 5. CONCLUSÃO

A adição de xenobióticos nos meios de cultura dos cultivos de *P. funiculosum* e *P. chrysogenum* afetou de forma direta o desenvolvimento das cepas, dificultando o crescimento micelial nos tratamentos com CuSO<sub>4</sub>, principalmente. Não obstante, análises do perfil químico denunciaram a atividade inibitória de CuSO<sub>4</sub> nas cepas de ambos os fungos em relação a produção de metabólitos secundários pelos mesmo, ilustrando a ativação ou inativação de enzimas do metabolismo celular do fungo.

Além disso, pôde-se concluir que Sabouraud foi o meio de cultura que demonstrou melhores resultados de prospecção de metabólitos para as cepas de *Penicillium chrysogenum* e para *Penicillium funiculosum*, destacando o conjunto Sabouraud+NH<sub>4</sub>Cl como o diferencial para a produção de novos compostos entre as cepas selecionadas.

## 6. REFERÊNCIAS

- BADLEE, P; FARHODI, F; GHAYOMI, M.A; JAFARIAN, H. Fungi identified in patients with recurrent lung disorders. **Jundishapur Journal of Microbiology**. vol. 11(7), 2018. p. 1-6.
- BRAKHAGE, A & SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites: strategies to activate silente gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**. vol. 48, 2011. p. 15-22.
- BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**. Vol10. n.1, 2012
- CAPON, R.J; STEWART, M; RATNAYAKE, R; LACEY, R; GILL, J.H. Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. **Journal of Natural Products**. vol. 70, 2007. p. 1746-1752.
- CARBONE. I; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**. vol. 91(3), 1999. p. 553-556.
- CARDENAS, M.E; SANFRIDSON, A; CUTLER, N.S; HEITMAN, J. Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. **Trends in Biotechnology**. vol. 16(10), 1998. p. 427-433.
- CASTELLANI, S. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. vol. 42, 1939. p. 225-226.
- CHEN, S; WANG, J; WANG, Z; LIN, X; ZHAO, B; KALIAPERUMAL K; LIAO, X; TU, Z; LI, J; XU, S; LIU, Y. Structurally diverse secondary metabolites from a deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 41001 and their biological evaluation. **Fitoterapia**. vol. 117, 2017. p. 71-78
- CHIANG, Y.M; CHANG, S.L; OAKLEY, B.R; WANG, C.C.C; Recent advances in awakening silente biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**. vol. 15, 2011. p. 137-143.

DEMAIN, A.L; MARTENS, E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. **The Journal of Antibiotics**. vol. 70, 2017. p. 347-360.

DEWICK, P.M. **Medicinal Nature Products: a biosynthetic approach**. 3ª Edição. Editora John Wiley & Sons, 2009. p. 7-11.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Editora Educs. 2ed. Caxias do Sul - Brasil, 2010.

FERREIRA, A.V.B. Fungos: os primórdios do sexo. **Ciência Hoje**. vol.37(218), 2005. p. 1-8

FILL, T.P; PALLINI, H.F; AMARAL, L.S; SILVA, J.V; BIDÓIA, D.L; PERON, F; GARCIA, F.P; NAKAMURA, C.V; RODRIGUES-FILHO, E. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. **Sociedade Brasileira de Química**. vol. 27(8), 2016.

GUBIANI, J.R; HABECK, T.R; CHAPLA, V.M, SILVA, G.H; BOLZANI, V.S; ARAUJO, A.R. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of phenolic compounds using *Camarops* sp., an endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Quimica Nova**. vol. 39(10), 2016. p. 1221-1224

HÖLKER, U; HÖLFER, M. LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. vol. 64, 2004. p. 175-186

JOAQUIM, L.M; EL-HANI, C. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientiae Zudia**. vol. 8(1), 2010. p. 93-128.

JOEL, E.L; BHIMBA, B.V. Biological activity of secondary metabolites isolated from mangrove fungi *Neurospora crassa*. **Journal of Environmental Biology**. Vol.34.n.4, 2013. p. 729-732.

KELLER, N.P; TURNER, G; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews – Microbiology**. vol 3(12), 2005. p. 937-947.

KHAN, A.A; BACHA, N; AHMAD, B; LUTFULLAH, G; FATOOQ, U; COX, R.J. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of

biologically active secondary metabolites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. vol. 4(11), 2014. p. 859-870.

KJAERBOLLING, I; VESTH, T.C; FRISVAD, J.C; NYBO, J.L; THEOBALD, S; KUO, A; BOWYER, P; MATSUDA, Y; MONDO, S; LYHNE, E.K; KOGLE, M.E; CLUM, A; LIPZEN, A; SALAMOV, A; NGAN, C.Y; DAUM, C; CHINIQUY, J; BARRY, K; LABUTTI, K; HARIDAS, S; SIMMONS, B.A; MAGNUSON, J.K; MORTENSEN, U.H; LARSEN, T.O; GRIGORIEV, I.V; BAKER, S.E; ANDERSEN, M.R. Linkin secondary metabolites to gene clusters through genome sequencing of six diverse *Aspergillus* species. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. vol. 9, 2018. p. 751-761.

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

KREMER, L; DOUGLAS, J.D; BAULARD, A.R; MOREHOUSE, C; GUY, M.R; ALLAND, D; DOVER, L.G; LAKEY, J.H; JACOBS, W.R; BRENNAN, P.J; MINNIKIN, D.E; BESRA, G.S. Lipids and lipoproteins: thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**. vol 275(22), 2000. p. 16857-16864.

LI, J; GU, F; WU, R; YANG, J; ZHANG, K. Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in Fungi. **Scientific Reports by Nature**, 2017. p. 1-15.

LIMA NETO, G.A; KAFFASHI, S. LUIZ, W.T; FERREIRA, W.R; DIAS DA SILVA, Y.S.A; RAZIN, G.V; VIOLANTE, I.M.P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. vol. 17(4), 2015. p. 1069-1077.

LOGUERCIO-LEITE, C; GROPOSO, C; DRESCHLER-SANTOS, E.R; FIGUEIREDO, N.F; GODINHO, P.S; ABRÃO, R.L. A Particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**. vol. 19 (2), 2006. p. 17-27.

LOPES, F.C. Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos, 2011. Dissertação submetida (mestrado em biologia celular e molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. [Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli].

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; BENDER, K.S; BUCKLEY, D.H; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. Edição 14. Porto Alegre, Artmed, 2016.

MEDEIROS, L.S. Prospecção química do metabolismo de fungos endofíticos isolados de maçã (*Malus domestica*) e goiaba (*Psidium guajava*), 2014. Tese apresentada (doutorado em ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. [Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho].

MOORE, D; ROBSON, G.D; TRINCI, A.P.J. **21st Century Guidebook to fungi**. Editora Cambridge. 2ed. New York – United States of American, 2011.

NELSON, DAVI L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6<sup>o</sup> Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014. p 805-842.

PASTRE, R. MARINHO, A.M.R, FILHO, E.R. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**. vol. 30(8), 2007. p. 1867-1871.

PENG, X; WANG, Y; SUN, K; LIU, P; YIN, X; ZHU, W. Cerebrosides and 2-pyridone alkaloids from haloterant fungus *Penicillium chrysogenum* grown in a hypersaline mediu. **Journal of Natural Products**. vol. 74, 2011. p. 1298-1302

RAVEN, P.H; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5<sup>o</sup> edição. Editora: Guanabara Dois, Washington DC, 1976. p. 196-210.

RHODES, C.J. Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the Earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*. vol. 26(3), 2015. p. 196-198.

SANTOS, O.M; CRISI, B.M. Efeito do desmatamento na atividade dos microorganismos de solo de terra firme na Amazônia. **Acta Amazonica**. vol. 11(1), 1981. p. 97-102.

SILVA, J.B.A; FRANTZ, S.C; MARQUES, A.K; COELHO, C.M; MORAIS, P.B. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. **Journal of Bioenergy and Food Science**. vol. 4(2), 2015. p. 208-212.

SMEDSGAARD, J; FRISVAD, J.C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, 1996. p. 5-17.

TAKAHASHI, J; LIMA, G.S; SANTOS, G.F. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*. vol.9(6), 2017. p.1-23.

TOR, E.R; PUSCHNER, B; FILIGENZI, M.S; TIWARY, A.K; POPPENGA, R.H. LC-MS/MS screen for penetrem A and roquefortine C in serum and urine samples. **Analytical Chemistry**. vol. 78, 2006. p. 4624-4629.

VERDINE, G.L. The combinatorial chemistry of nature. **Nature**. vol 11(3), 1996. p. 11-13.

WANG, W.G; LI, A; YAN, B.C; NIU, S.B; TANG, J.W; LI, X.N; DU, X; CHALLIS, G.L; SUN, H.D; PU, J.X. LC-MS-Guided isolation of penicilfuranone A: a new antifibrotic furancarboxylic acid from the plant endophytic fungus *Penicillium* sp. sh18. **Journal of Natural Products**. vol. 43(1), 2015. p. 1-7.

WANG, W.J; LI D.Y; HUA, H.M; MA, E.L; LI, Z.L. Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotrisha* sp. ZJ-M-5 by the one strain-many compounds strategy. **Journal of Natural Products**. vol. 38, 2014. p. 3167-3171.

ZHANG, Z; HE, X; ZHANG, G; CHE, Q; ZHU, T; GU, Q; LI, D. Inducing secondary metabolite production by combined culture of *Talaromyces aculeatus* and *Penicillium variable*. **Journal of Natural Products**. vol. 80, 2017. p. 3167-3171.

