



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

GUSTAVO VINÍCIUS COIMBRA GOES

Análise de alcaloides indólicos antitumorais produzido por *Penicillium chrysogenum* guiada por Espectrometria de massas e Molecular Networking

Manaus - AM

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

GUSTAVO VINÍCIUS COIMBRA GOES

Análise de alcaloides indólicos antitumorais produzido por *Penicillium chrysogenum* guiada por Espectrometria de massas e Molecular Networking

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como um dos requisitos básicos para obtenção de mestre em Ciências farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Manaus - AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G598a Goes, Gustavo Vinícius Coimbra
Análise de alcaloides indólicos antitumorais produzido por
Penicillium chrysogenum guiada por espectrometria de massas e
molecular networking / Gustavo Vinícius Coimbra Goes . 2021
123 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima
Coorientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Molecular networking. 2. Espectrometria. 3. Penicillium. 4.
Penicillium chrysogenum. 5. Citotoxicidade. I. Lima, Emerson Silva.
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho ao meu pai e melhor amigo da vida, que muito me apoiou em diversos momentos, principalmente nos momentos de crises quando tentei suicido e apesar da dor que o fiz sentir ele nunca desistiu de mim e continuou lutando para que eu conseguisse reencontrar o meu caminho. Amo-te eternamente com todo meu coração!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e a graça de aprender.

Aos meus pais Romualdo Luz e Cláudia Senna por todo o amor e sacrifício que fizeram para me proporcionar as melhores condições em busca dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Cristiano Goes e Carlos Goes por me lembrarem de sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu melhor amigo da infância pra vida Carlos Eduardo Alves que sempre esteve ao meu lado me apoiando por todas as etapas de minha vida, com você eu aprendi o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A melhor cunhada/amiga que eu poderia ter Fabiele Silva, obrigado por todo o suporte durante esse processo e por ouvir meus desabafos e angústias existenciais.

De uma forma muito especial gostaria de agradecer ao prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen, por sua orientação, sobretudo por todo o apoio e suporte proporcionado principalmente nos momentos que precisei me ausentar do laboratório por questões psiquiátricas, sendo por diversas vezes mais do que um orientador, mas um verdadeiro amigo.

Ao grupo de pesquisa Metabolomics and Mass Spectrometry Research, em especial a Asenate, Emilly e Weider por todo o companheirismo e aprendizados compartilhados.

As minhas amigas de turma que o mestrado me presenteou, Isabelle, Bianca e Karin, muito obrigado meninas por todo apoio desde as matérias até as angústias por sermos os únicos guerreiros a enfrentar um mestrado enquanto trabalha pra conseguir se manter.

Ao prof. Dr. Emerson Silva Lima pela orientação e suporte em todas as etapas do mestrado.

À UFAM por conceder-me a oportunidade da realização de um sonho ao qual pude adquirir um vasto conhecimento acadêmico e profissional, que levarei comigo durante toda a minha jornada.

E por fim, mas não menos importante, a todos que me ajudaram de forma direta e indireta na execução desse trabalho fica aqui o meu muito obrigado!

“Transmita o que aprendeu. Força, mestria. Mas fraqueza, insensatez, fracasso também. Sim, fracasso acima de tudo. O maior professor, o fracasso é. Luke, nós somos o que eles crescem além. Esse é o verdadeiro fardo de todos os mestres.” – Mestre Yoda

RESUMO

Os fungos endofíticos representam uma fonte abundante de substâncias quimicamente bioativas, em especial a ação citotóxica que vem incentivando pesquisas em diversas áreas. Dessa forma, o presente estudo consistiu em identificar alcaloides indólicos dos extratos do fungo *Penicillium chrysogenum* em diferentes meios de cultura por Espectrometria de massas (MS) e por rede molecular Networking (MN), bem como avaliar o potencial anticâncer *in vitro* dos seus extratos. Através das análises MS e MN, foi possível identificar 16 substâncias, sendo oito alcaloides indólicos: (1) glandicolina A, (2) glandicolina B, (3) oxalina, (4) meleagrina, (5) roquefortina C, (6) roquefortina D, (7) neoxalina, (8) triptofano), dois peptídeos de piroglutamil: (9) piroglutamilfenilalanina, (10) piroglutamilvalina, e seis alcaloides piperazinas: (11) ciclo (L-prolina-L-valina), (12) ciclo (L-leucina-L-prolina), (13) ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina), (14) ciclo L-valina-L-leucina, (15) ciclo (L-fenilalanina-D-Prolina), (16) ciclo (fenilamina-leucina). Vale ressaltar que não há registro na literatura acerca da produção das substâncias 9, 10 e 13, 14, 15, e 16 sobre a espécie *P. chrysogenum*. Dessa forma, essas substâncias identificadas por LC-MS/MS e pela rede MN são contribuições inéditas para a espécie em estudo. Os extratos preparados em diferentes meios de cultura não apresentaram potencial citotóxico promissor sobre as células testadas. Através do *screanning*, o extrato preparado em meio ISP2 apresentou 63,9% e 20,1 % para as células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e B16-F10 (melanoma murinho), respectivamente. Dessa forma, é possível considerar que a espécie fúngica estudada produziu alcaloides (indólicos e do tipo piperazinas) e peptídeos, sendo alguns deles responsáveis pela atividade citotóxica (conforme a literatura). Com isso, fica evidente a importância em prosseguir os estudos com essa cepa fúngica acerca do isolamento fitoquímico e atividades farmacológicas.

Palavras-chave: Molecular Networking; espectrometria; *Penicillium chrysogenum*; citotoxicidade.

ABSTRACT

Endophytic fungi represent an abundant source of chemically bioactive substances, especially the cytotoxic action that has been encouraging research in several areas. Thus, the present study consisted of identifying indolic alkaloids from extracts of the fungus *Penicillium chrysogenum* in different culture media by mass spectrometry (MS) and by molecular network Networking (MN), as well as assessing the in vitro anticancer potential of its extracts. Through the MS and MN analyzes, it was possible to identify 16 substances, eight indole alkaloids: (1) glandicoline A, (2) glandicoline B, (3) oxaline, (4) meleagrine, (5) roquefortina C, (6) roquefortina D, (7) neoxaline, (8) tryptophan), two pyroglutamyl peptides: (9) pyroglutamylphenylalanine, (10) pyroglutamylvaline, and six piperazine alkaloids: (11) (L-proline-L-valine) cycle, (12) cycle (L-leucine-L-proline), (13) cycle (L-phenylalanine-4-hydroxy-proline), (14) cycle L-valine-L-leucine, (15) cycle (L-phenylalanine-D- Proline), (16) cycle (phenylamine-leucine). It is worth mentioning that there is no record in the literature about the production of substances 9, 10 and 13, 14, 15, and 16 about the species *P. chrysogenum*. Thus, these substances identified by LC-MS / MS and the MN network are unprecedented contributions to the species under study. The extracts prepared in different culture media did not show a promising cytotoxic potential on the tested cells. Through screanning, the extract prepared in ISP2 medium showed 63.9% and 20.1% for tumor cells HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and B16-F10 (murine melanoma), respectively. Thus, it is possible to consider that the studied fungal species produced alkaloids (indole and piperazine type) and peptides, some of which are responsible for cytotoxic activity (according to the literature). Thus, the importance of continuing studies with this fungal strain on phytochemical isolation and pharmacological activities is evident.

Keywords: Molecular Networking; spectrometry; *Penicillium chrysogenum*; cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Novos fármacos obtidos entre 1981 a 2014.....	20
Figura 2. Estrutura química do ácido acetil salicílico (1), digitoxina (2), morfina (3), quinina (4) e pilocarpina (5).	23
Figura 3. Exemplos de alcaloides verdadeiros.....	24
Figura 4. Exemplos de pseudoalcaloides.....	24
Figura 5. Estrutura química do paclitaxel (taxol).	28
Figura 6. Exemplos de alcaloides derivadas de fungos filamentosos.	30
Figura 7. Alcaloides isolados do fungo <i>Penicillium citrinum</i> ,	30
Figura 8. Estrutura Morfológica do <i>penicillium chrysogenum</i>	31
Figura 9. Rota biossintéticas simplificada para formação das roquefortinas e derivados.	33
Figura 10. Alcaloides isolados de <i>Pencillium chrysogenum</i>	34
Figura 11. Análogos da roquefortina	34
Figura 12. Procedimento experimental para obtenção dos extratos de <i>P. chrysogenum</i>	42
Figura 13. Procedimento para a obtenção da rede molecular dos extratos de <i>P. chrysogenum</i>	44
Figura 14. Equações para a determinação do R_o (A) e para determinar a porcentagem de proliferação celular (B).	46
Figura 15. Procedimento experimental para o ensaio de citotoxicidade in vitro.....	46
Figura 16. Estruturas das substâncias identificadas nos extratos de <i>P. chrysogenum</i>	47
Figura 17. Cromatogramas obtidos da espécie <i>P. chrysogenum</i> em diferentes meios de culturas.	49
Figura 18. Espectro MS/MS da glandicolina A (1) extraído do meio de cultura BD.....	50
Figura 19. Espectro MS/MS da glandicolina B (2) extraído do meio de cultura BD.....	50
Figura 20. Espectro MS/MS da oxalina (3) extraído do meio de cultura BD.	50
Figura 21. Espectro MS/MS da meleagrina (4) extraído do meio de cultura BD.	50
Figura 22. Espectro MS/MS da roquefortina C (5) extraído do meio de cultura BD.....	51
Figura 23. Espectro MS/MS da roquefortina D (6) extraído do meio de cultura BD.....	51
Figura 24. Espectro MS/MS de neoxalina (7) extraído do meio de cultura BD.....	51
Figura 25. Espectro MS/MS de triptofano (8) extraído do meio de cultura BD.	51
Figura 26. Espectro MS/MS de piroglutamilfenilalanina (9) extraído do meio de cultura BD.....	52
Figura 27. Espectro MS/MS de piroglutamilvalina (10) extraído do meio de cultura BD.....	52
Figura 28. Espectro MS/MS de ciclo (L-prolina-L-valina (11) extraído do meio de cultura BD.....	52
Figura 29. Espectro MS/MS de ciclo (L-leucina-L-prolina) (12) extraído do meio de cultura BD.....	53
Figura 30. Espectro MS/MS de ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (13) extraído do meio de cultura BD.....	53
Figura 31. Espectro MS/MS de ciclo valina-leucina (14) extraído do meio de cultura BD.	53
Figura 32. Espectro MS/MS de ciclo (L-fenilalanina-D-prolina) (15) extraído do meio de cultura BD.	54
Figura 33. Espectro MS/MS de ciclo (fenilalanina-leucina) (16) extraído do meio de cultura BD.....	54
Figura 34. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio aveia apresentando as 8 substâncias identificadas.	55
Figura 35. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio arroz apresentando as 12 substâncias identificadas.	56
Figura 36. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio canjica apresentando as 14 substâncias identificadas.	57

Figura 37. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio sucralose apresentando as 11 substâncias identificadas.	58
Figura 38. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio sabourand apresentando as 13 substâncias identificadas.	59
Figura 39. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio CZAPEK concentrado apresentando as 13 substâncias identificadas.	59
Figura 40. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio ISP2 apresentando as 15 substâncias identificadas.	60
Figura 41. Rede molecular do extrato de <i>P. chrysogenum</i> preparado em meio BD apresentando as 16 substâncias identificadas.	61
Figura 42. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio arroz.	76
Figura 43. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio arroz.	76
Figura 44. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do Oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio arroz.	77
Figura 45. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio arroz.	77
Figura 46. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio arroz.	78
Figura 47. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio arroz.	78
Figura 48. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio arroz.	79
Figura 49. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio arroz.	79
Figura 50. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio arroz.	80
Figura 51. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio arroz.	80
Figura 52. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio arroz.	81
Figura 53. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilamina-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio arroz.	81
Figura 54. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio aveia.	82
Figura 55. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio aveia.	82
Figura 56. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do piruglutamil-fenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio aveia.	83
Figura 57. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio aveia.	83
Figura 58. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (13) obtido do extrato preparado em meio aveia.	84
Figura 59. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio aveia.	84
Figura 60. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-L-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio aveia.	85

Figura 61. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio canjica.	85
Figura 62. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio canjica.	86
Figura 63. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio canjica.	86
Figura 64. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio canjica.	87
Figura 65. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio canjica.	87
Figura 66. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio canjica.	88
Figura 67. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamil-fenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio canjica.	88
Figura 68. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (10) obtido do extrato preparado em meio canjica.	89
Figura 69. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio canjica.	89
Figura 70. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio canjica.	90
Figura 71. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio canjica.	90
Figura 72. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio canjica.	91
Figura 73. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio canjica.	91
Figura 74. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio canjica.	92
Figura 75. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	92
Figura 76. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	93
Figura 77. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	93
Figura 78. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	94
Figura 79. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	94
Figura 80. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	95
Figura 81. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	95
Figura 82. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	96
Figura 83. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	96
Figura 84. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	97

Figura 85. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.	97
Figura 86. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio BD.....	98
Figura 87. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio BD.....	98
Figura 88. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio BD.	99
Figura 89. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio BD.	99
Figura 90. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio BD.....	100
Figura 91. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio BD.....	100
Figura 92. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio BD.	101
Figura 93. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio BD.	101
Figura 94. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio BD.....	102
Figura 95. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (10) obtido do extrato preparado em meio BD.....	102
Figura 96. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio BD.....	103
Figura 97. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio BD.....	103
Figura 98. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio BD.	104
Figura 99. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio BD.....	104
Figura 100. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio BD.....	105
Figura 101. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo (fenilalanina-leucina) (16) obtido do extrato preparado em meio BD.....	105
Figura 102. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	106
Figura 103. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	106
Figura 104. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	107
Figura 105. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	107
Figura 106. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	108
Figura 107. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.....	108
Figura 108. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.	109

Figura 109. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.	109
Figura 110. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	110
Figura 111. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	110
Figura 112. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	111
Figura 113. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	111
Figura 114. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	112
Figura 115. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	112
Figura 116. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	113
Figura 117. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	113
Figura 118. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	114
Figura 119. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (10) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	114
Figura 120. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	115
Figura 121. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	115
Figura 122. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	116
Figura 123. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	116
Figura 124. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio ISP2.	117
Figura 125. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	117
Figura 126. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	118
Figura 127. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	118
Figura 128. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	119
Figura 129. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	119
Figura 130. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	120
Figura 131. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	120
Figura 132. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	121

Figura 133. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	121
Figura 134. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	122
Figura 135. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	122
Figura 136. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	123
Figura 137. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio sabourand.	123

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de plantas e de organismos marinhos.	27
Tabela 2. Exemplos de metabólitos secundários produzidos e isolados de espécies de <i>Penicillium chrysogenum</i>	32
Tabela 3. Quantidades dos materiais para o preparo dos meios de cultura.	40
Tabela 4. Substâncias identificadas através da análise da Rede molecular networking da fração de <i>P. chrysogenum</i>	48
Tabela 5. Comparação das substâncias presentes nos 8 extratos em meios de culturas diferentes de <i>P. chrysogenum</i>	62
Tabela 6. Resultado da atividade citotóxica in vitro dos extratos de <i>P. chrysogenum</i>	64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

µg	Micrograma
A _{HW}	Absorbância de maior comprimento
A _{LW}	Absorbância de menor comprimento
AcOEt	Acetato de etila
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês “ <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> ”);
ATCC	Coleção de cultura Americana (do inglês “ <i>american type culture collection</i> ”);
B16-F10	melanoma murinho
CH ₃ OH	Metanol
CI ₅₀	Concentração inibitória média
cm	Centímetros
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por electrospray (do ingles “ <i>electrospray ionization</i> ”);
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano
HCT116	Carcinoma de colón humano
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês “ <i>ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> ”);
IC ₅₀	Concentração inibitória em 50% (do inglês “ <i>inhibition concentration</i> ”);
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
m	Metros
mm	Milímetro
MS	Espectrometria de massas (do inglês “ <i>mass espectrometry</i> ”);
MS/MS	Espectrometria de massa sequencial (do inglês “ <i>tandem mass spectrometry</i> ”);
MeOH	Metanol
mL	Mililitro

m/z	Relação massa/carga
nm	Nanômetro
Q	Quadrupolo;
QqQ	Triplo quadrupolo;

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Histórico e importância dos produtos naturais	20
2.2. Metabolismo secundário e biossíntese de alcaloides	21
2.3. Fungos endofíticos e aplicabilidade.....	25
2.4. O gênero <i>Penicillium</i> e os fármacos.....	28
2.5. <i>Penicillium chrysogenum</i>	30
2.6. Aplicabilidade da atividade citotóxica	35
2.7. Fundamentos da técnica de HPLC-MS/MS	36
2.8. Aplicabilidade das redes moleculares (molecular networking)	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	40
4.1. Preparo dos meios de cultura.....	40
4.2. Cultivo do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i>	41
4.2.1. Preparo do pré-inóculo I.....	41
4.2.2. Técnica de OSMAC	42
4.3. Obtenção de extratos	42
4.4. Espectrometria de massas.....	43
4.5. Análise por Molecular Networking	43
4.6. Ensaio citotóxico in vitro dos extratos de <i>Penicillium chrysogenum</i>	45
4.6.1. Preparo das amostras e células	45
4.6.2. Ensaio de citotoxicidade	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Identificação das substâncias presentes nos extratos de <i>P. chrysogenum</i> por LC-MS/MS e por meio da rede Molecular Networking (MN).	47
5.2. Avaliação da atividade citotóxica in vitro dos extratos de <i>P. chrysogenum</i>	64
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. APÊNDICE.....	76

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos os microrganismos têm sido estudados por diversos pesquisadores devido a produção de substâncias bioativas, bem como na promoção de processos como a fermentação, a transformação e a decomposição da matéria orgânica (ALY *et al.*, 2011). Nesse sentido, fungos endofíticos são categorizados como um grupo altamente diversificado, capazes de colonizar tecidos de plantas de forma assintomática (CHOWDHARY *et al.*, 2012).

Esses microrganismos estão associados a partes de plantas, tais como raízes, caules, folhas, flores e frutos e, geralmente um ou mais destes tecidos dão origem a um endófito. Eles diferem dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais, dos micorrizos que vivem em associação com as raízes das plantas e, dos fitopatógenos, que causam doenças a espécie vegetal que habitam (STROBEL, 2014). Os fungos endofíticos encontram-se no processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, no entanto, seu papel na vida das plantas permanece obscuro. Alguns autores afirmam que os endófitos podem ser patógenos, mas, que estão em estado latente. O equilíbrio entre as demandas da invasão de fungos e a resposta da planta são os fatores que determinam se um endófito é inofensivo ou prejudicial, sendo que, uma vez desequilibrada, o endófito pode se transformar em um patógeno (KHARWAR *et al.*, 2011).

Atualmente, os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Isso se deve à produção de substâncias bioativas agrupadas em várias categorias (incluindo: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glicosídeos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outros) com propriedades anticâncer, inseticida, antimicrobiana, bem como promove o crescimento de espécies vegetais e resistência de pragas e patógenos (SUDHA, *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a descoberta de substâncias anticâncer derivadas de PN tem incentivado as pesquisas em diversas áreas. Dessa forma, tem se comprovado nas últimas décadas o desenvolvimento de doenças degenerativas e o câncer. O câncer é uma das principais doença de preocupação mundial, na qual há diversas dificuldades em seu tratamento e os alarmantes dados estatísticos apresentados (INCA, 2019).

As bases de dados atuais revelam o crescente aumento das pesquisas com microrganismos endofíticos. Nos últimos 20 anos observou-se que a publicação de trabalhos relacionados com isolamento, determinação estrutural e caracterização de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos cresceram drasticamente. Estas evidências atraem a atenção dos químicos de PN e de biólogos, conforme indicado pelo aumento constante de

publicações dedicadas a este tema nos últimos anos (DEVARI *et al.*, 2014). Mesmo pelo constante crescimento de pesquisas de metabólitos de fungos, os estudos ainda são considerados pouco difundido, visto que há uma variedade de substâncias e possíveis biossínteses de novas substâncias. Dessa forma, há uma necessidade da investigação fitoquímica e biológica de metabólitos de fungos endofíticos na qual representam uma fonte abundante e confiável de substâncias bioativas (MARINHO & RODRIGUES FILHO, 2011).

Tendo em vista a atual estratégia do governo do estado do Amazonas em investir em atividades de prospecção com diversas finalidades, bem como todo o potencial para a produção de novos insumos/produtos oriundos da riqueza natural, justificam-se estudos que visam descobrir novas fontes de compostos bioativos. Neste sentido, os metabólitos secundários de PN amazônicos são uma realidade ainda pouco explorada no que se refere às necessidades de investidores, como a indústria farmacêutica. Com isso, o presente estudo tem como objetivo realizar a análise metabolômica de alcaloides indólicos presentes nos extratos de *Penicillium chrysogenum* por meio da Cromatografia Líquida de Alta eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (HPLC-MS/MS), e por meio de Redes Moleculares, bem como investigar o potencial anticâncer *in vitro* dos extratos desse fungo.

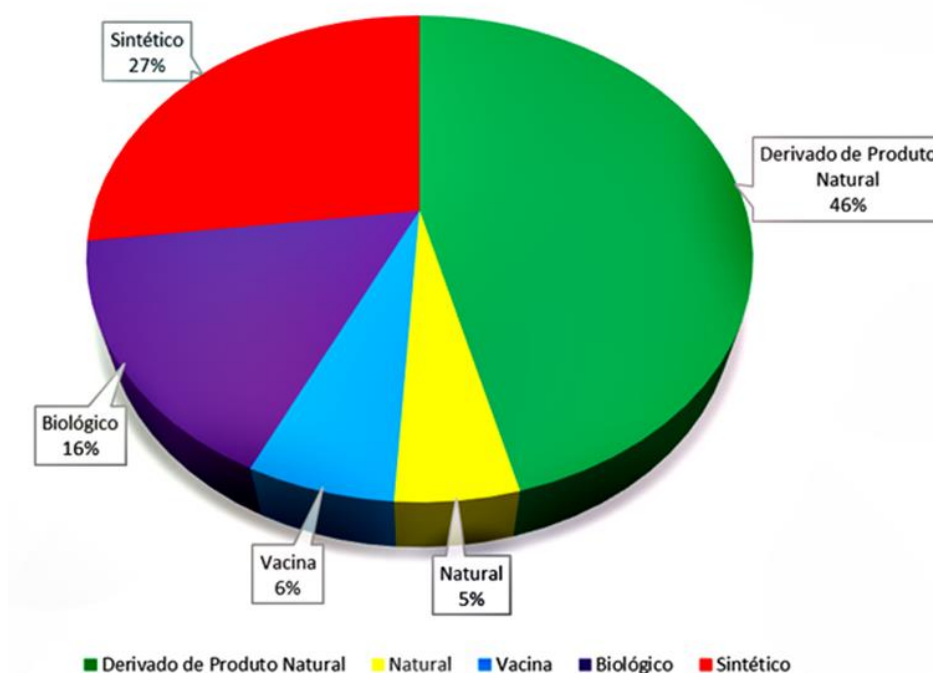
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico e importância dos produtos naturais

Por milhares de anos a medicina juntamente com os PN's estão intimamente ligados através da utilização de medicamentos populares e o uso de venenos naturais (BUTLER, 2004). Os PN são substâncias químicas, geralmente produzidos por microrganismos (fungos, bactérias e vírus), ou sintetizados por plantas. Os quais são dispostos por síntese química (ambos semissíntese e síntese total) (STROBEL, 2014).

Apesar da concorrência com outros métodos de descoberta de novos medicamentos, os PN's ainda desempenham um papel significativo na inserção de novas drogas e no desenvolvimento desta área (BUTLER, 2004). De acordo com a revisão de Newman e Cragg (2014) foram analisados fármacos e aprovados em todo o mundo, nos últimos 30 anos (1981 a 2014). Foi constatado que mais da metade das novas substâncias químicas encontradas no mercado eram derivadas de PN ou sintetizadas a partir destes (Figura 1), sendo que, diversos fármacos são consagrados medicamentos industrializados, na qual foram resultantes de sínteses direcionadas para reproduzir a ação das moléculas encontradas na natureza.

Figura 1. Novos fármacos obtidos entre 1981 a 2014.



Fonte: Adaptado de Newman e Cragg, 2016.

Das novas entidades químicas aprovadas, 29% foram obtidas de origem natural. Dos medicamentos anticancerígenos, 48,6% foram obtidos de PN ou diretamente derivados destes.

Dos medicamentos aprovados para tratamento de infecções contra bactérias, fungos, parasitas e vírus, 33,7% também foram obtidos a partir de fontes naturais. Esta constatação mostra como os PN são consideradas fonte expressiva para a obtenção de medicamentos, e que estes foram e ainda são valorizados como fonte de protótipos para a descoberta de novos fármacos (BUTLER, 2004).

Atualmente, o cenário da pesquisa de PN está sendo modernizado com a utilização de técnicas de química combinatória, a fim de otimizar o estudo da parte ativa da molécula e sua estrutura (NEWMAN & CRAGG, 2014) e se obter o maior número de substâncias bioativas possível (VIEGAS *et al.*, 2006). Outra perspectiva do ponto de vista da inovação nessa área é a pesquisa utilizando microrganismos como fontes naturais bioativas, devido ao fato destes serem amplamente disseminados no ecossistema e de, nos últimos anos, vários terem tido seus genomas sequenciados (NEWMAN & CRAGG, 2014), encorajando esta vertente.

O isolamento de substâncias naturais com atividades biológicas, seja de origem vegetal ou de outras fontes, como microrganismos, apresenta várias vantagens em relação ao uso de extratos, visto que a substância bioativas pode ser administrada e/ou quantificada de forma reprodutível e em doses exatas, gerando benefícios do ponto de vista experimental e terapêutico (GIAQUINTO & VOLPATO, 2005). Além disso, apresentam alta afinidade por respectivos receptores específicos, que geralmente são proteínas, podendo ativá-los ou inibi-los, e possuem ampla variabilidade química, sendo utilizadas para a prevenção e tratamento de uma gama de enfermidades (COS *et al.*, 2006; MOLINARI, 2009; KINGSTON, 2011).

No campo da química orgânica, a definição de PN é geralmente restrita a compostos orgânicos purificados isolados de fontes naturais que são produzidos pelas vias do metabolismo primário ou secundário. Assim sendo, os PN podem ser classificados de acordo com sua função biológica, via biossintética ou fonte (HANSON, 2003).

2.2. Metabolismo secundário e biossíntese de alcaloides

Classificados de acordo com a função biológica, pela via biosintética ou por suas fontes, os PN foram divididos em classes pela primeira vez por Albrecht Kossel: os metabólitos primários e secundários (AVE, 2004; KARLOVSKY, 2008; KOSSEL, 1888). Segundo Kossel (1981), os metabólitos primários fazem parte da função essencial relacionada a sobrevivência do organismo que está produzindo estes metabólitos e os ditos secundários seriam os considerados não essenciais para a sobrevivência, mas que poderiam conferir uma evolução do organismo dentro do seu ambiente.

Os metabólitos primários são os componentes básicos da via metabólica necessária para a vida, as quais estão associadas com as funções celulares como a assimilação de nutrientes, além da sua produção de energia para crescimento e desenvolvimento. Nestes fazem parte os carboidratos, lipídios, aminoácidos e os ácidos nucleicos, que constituem a base da vida, além de diversos outros componentes, fazendo parte da engrenagem básica para o funcionamento de um organismo (AVE, 2004; KARLOVSKY, 2008; BOAL, 2012; NELSON; COX, 2005).

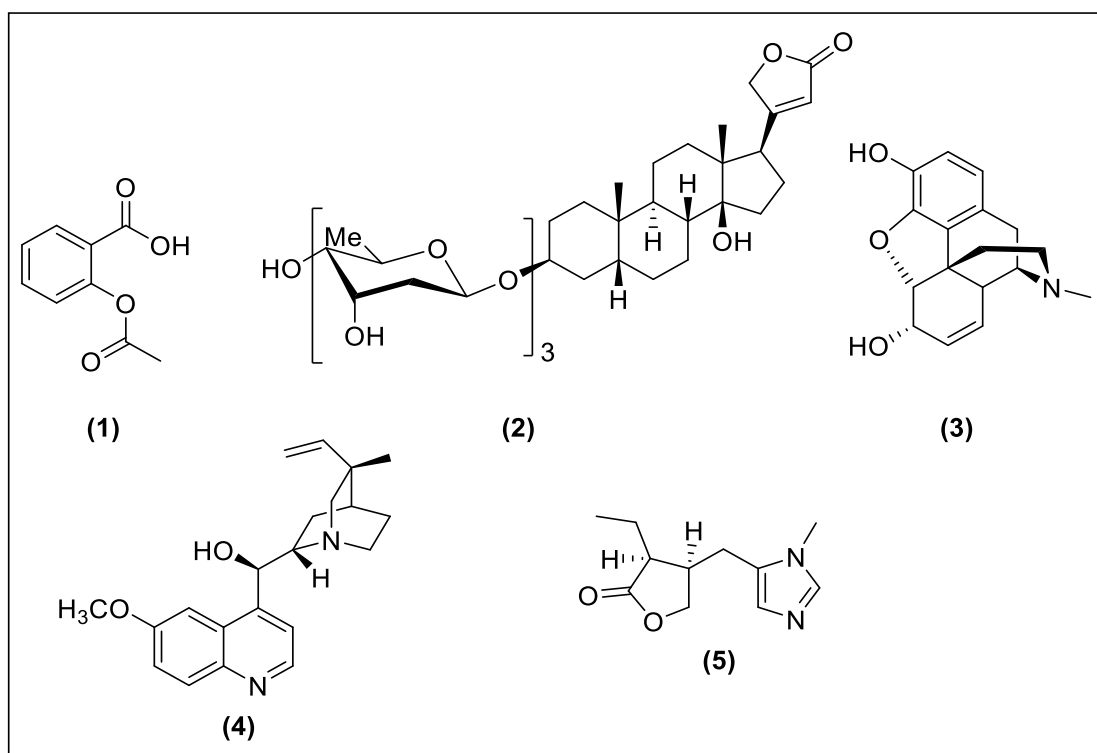
Os metabólitos secundários são definidos por possuírem uma ampla gama de funções que incluem os feromônios, moléculas de comunicação que são capazes de atrair e ativar organismos simbióticos, assim como armas competitivas, mecanismos de defesas contra predadores, entre outros, contudo uma boa parte dos metabólitos secundários têm a sua função desconhecida (DEMAIN; FANG, 2000).

Devido à sua capacidade de modular as vias bioquímicas e de transdução de sinal, alguns metabólitos secundários apresentam propriedades farmacológicas com benefícios terapêuticos diversos no tratamento de doenças (BRAHMACHARI & LASKAR, 2010). Através dos estudos químicos, farmacológicos e clínicos dos princípios ativos derivados de medicamentos populares, principalmente de plantas e microorganismos, (STROBEL, 2014) diversos fármacos foram desenvolvidos e comercializados, tais como: aspirina® (ácido acetil salicílico (1)) derivada da salicina, encontrada em diversas plantas do gênero *Salix*, a digitoxina (2), morfina (3), quinina (4) e pilocarpina (5) (BUTLER, 2004) (Figura 1). As classes estruturais gerais dos metabólitos secundários incluem alcaloides, fenilpropanoides, policetídeos e terpenoides (HANSON, 2008).

O termo alcaloide foi proposto pela primeira vez pelo farmacêutico W. Meissner em 1819, significa "semelhante ao alcalino". Origina-se da palavra "álcali" que se refere à capacidade de uma molécula em absorver cátions de hidrogênio (prótons) oriundos de uma substância ácida. Estes constituem um grupo complexo com mais de 15.000 metabólitos descritos.

Os alcaloides indólicos podem ser classificados de acordo com as características de seu esqueleto, que está diretamente relacionado à sua biogênese. O sistema indólico é derivado do aminoácido L-triptofano. O L-triptofano é descarboxilado pela enzima triptofano-decarboxilase formando triptamina. A triptamina, bem como seus produtos de metilação e hidroxilação. Alcaloides indólicos monoterpênicos são, quase sempre, produtos de condensação da triptamina com o secoiridoide secologanina, que é formado a partir do monoterpene pirofosfato de geranila (DEWICK, 2009).

Figura 2. Estrutura química do ácido acetil salicílico (1), digitoxina (2), morfina (3), quinina (4) e pilocarpina (5).



Fonte: BUTLER, 2004

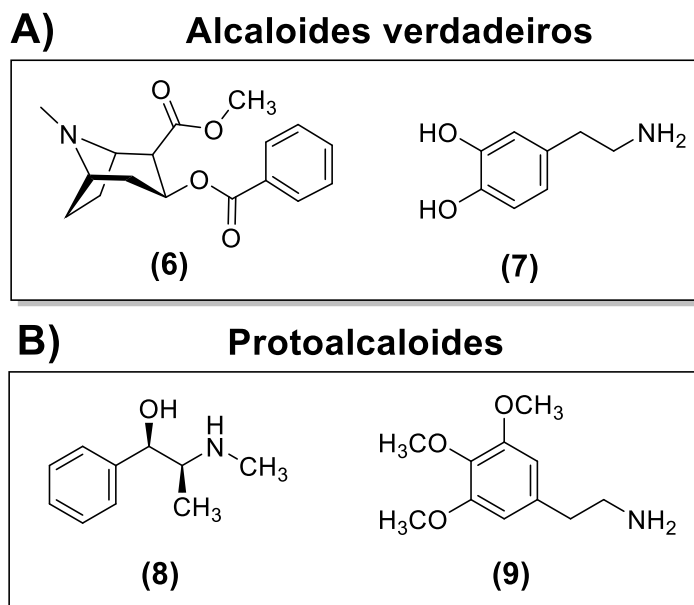
Os alcaloides verdadeiros derivam de aminoácidos, e possuem um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio. Os precursores primários dos alcaloides verdadeiros são aminoácidos como a L-ornitina, L-lisina, L-fenilalanina/L-tirosina, L triptofano e L-histidina. Exemplos de alcaloides verdadeiros incluem substâncias como a quinina (3), morfina (4), cocaína (6) e a dopamina (7) e (Figura 3A) (DEWICK, 2009).

Os protoalcaloides são compostos em que o átomo de nitrogênio derivado do aminoácido não faz parte do anel heterocíclico. Alguns deste tipo de alcaloides incluem compostos derivados da L-tirosina e L-triptofano. Sendo estes uma minoria do grande conjunto de alcaloides. A efedrina (8) e mescalina (9) são exemplos de protoalcaloides (Figura 3B).

Os pseudoalcaloides são compostos em que o esqueleto base de carbono não deriva de aminoácidos. São derivados de precursores da biodegradação de aminoácidos. Podem também resultar de reações de aminação e transaminação de diferentes precursores de aminoácidos, ou de outros precursores que não de aminoácidos. O nitrogênio inserido na molécula deriva de diferentes terpenos e esteroides. Os pseudoalcaloides podem ser derivados do acetato, da fenilalanina ou terpenos, assim como, de esteroides. A gentianina (10) e a tomatidina (11) são exemplos de pseudoalcaloides (DEWICK, 2009). Dentre as diversas estruturas possíveis nos diferentes tipos, aqueles derivados do aminoácido triptofano ganham destaque, pois diversas

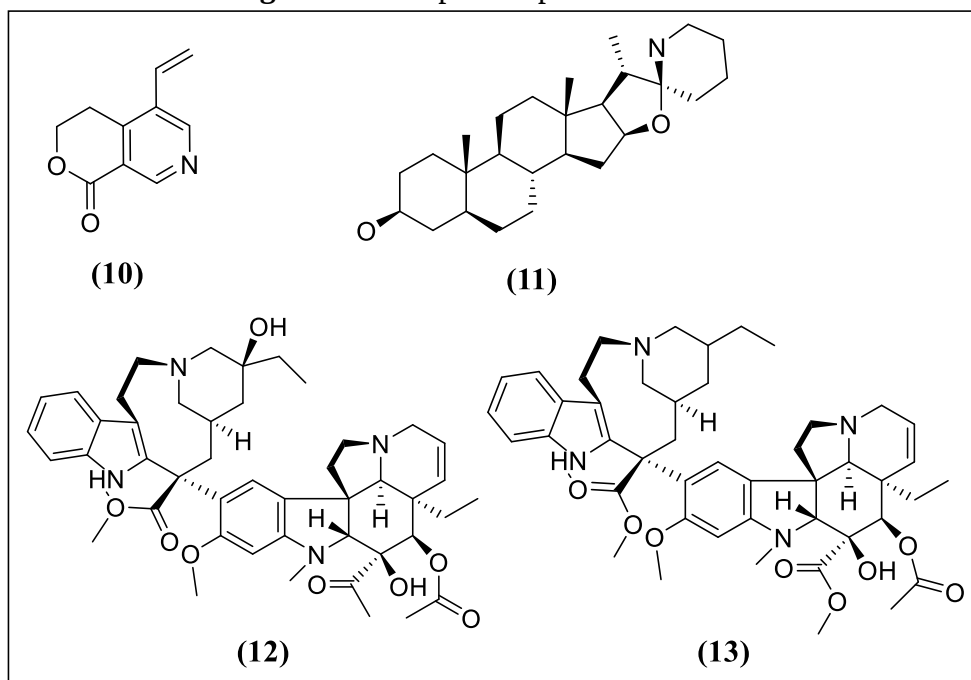
drogas contra o câncer derivam deste núcleo. Como exemplos, a vimblastina (**12**) e a vincristina (**13**), utilizadas na oncologia (MOUDI et al., 2013) (Figura 4).

Figura 3. Exemplos de alcaloides verdadeiros.



Fonte: DEWICK, 2009.

Figura 4. Exemplos de pseudoalcaloides.



Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009; MOUDI et al., 2013.

Historicamente, os fungos têm-se apresentado como um dos organismos mais importantes na produção de alcaloides (GUNATILAKA, 2006; BÉRDY, 2005). Estima-se que o ecossistema detenha cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas diferentes, no entanto, somente 5% desse total foram descritos, e apenas 16% desse percentual foram estudados (PINTO, *et al.*, 2002), o que representa um enorme potencial para a prospecção de alcaloides indólicos. Desse modo, os fungos constituem fontes promissoras de substâncias bioativas, sendo alvos na procura de produtos naturais com ampla diversidade biológica. Neste sentido, considerando que muitas espécies de fungos endofíticos são pouco conhecidas faz-se necessária a busca por novos compostos com uma maior variabilidade tanto química quanto biológica (CLARDY; WALSH, 2004).

2.3. Fungos endofíticos e aplicabilidade

O termo endófito originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais. Eles ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA, *et al.*, 2011). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontrados bactérias e fungos endofíticos. Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isoladas de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN & ZOU, 2001).

A espécie hospedeira pode ser infectada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida. O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto na transmissão horizontal (não sistêmica) essa interação tende a ser antagonista (ALY, *et al.*, 2011). Uma vez no hospedeiro, o endófito permanece, geralmente, em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis. Neste caso, o endófito pode assumir uma função patogênica (ALY *et al.*, 2011).

A relação de um endófito com o hospedeiro pode variar de um hospedeiro para outro, e as interações entre eles ainda são pouco compreendidas (GUNATILAKA, 2006). Esta asso-

ciação sugere que estes microrganismos coevoluíram com os seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística. Nesta relação os endófitos recebem nutrientes e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação, como maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, parasitas nematoides e microrganismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade, entre outros) (OWNLEY *et al.*, 2010).

Muitos autores já comprovaram que o tipo de interação entre um endófito e uma planta é controlado pelos genes de ambos os organismos e modulado pelo meio ambiente. No entanto, essa interação é pouco conhecida (JALGAONWALA *et al.*, 2011). Existe a possibilidade de microrganismos trocarem material genético com a planta quando ocorre a penetração de suas organelas no interior das células do hospedeiro, ou quando liberam parte deste material genético para fora da célula. Existem relatos que demonstram a ocorrência desta transferência genética (AGRIOS, 1998). Este fenômeno ecológico tem sido interpretado como sendo uma “transferência genética horizontal”, que pode ser originada por troca de material genético dos organismos associados (planta e fungos) durante o processo de penetração no hospedeiro.

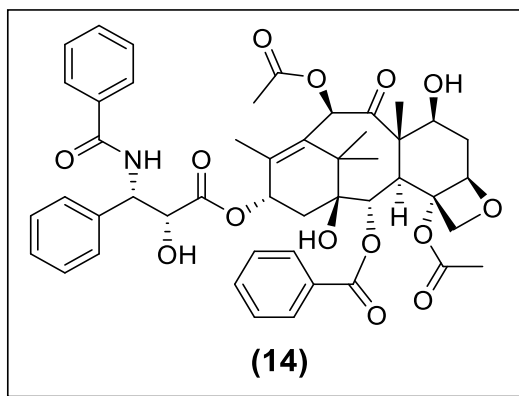
A produção de compostos, como os antibióticos, sugere que os endófitos podem controlar doenças de plantas (JALGAONWALA *et al.*, 2011). Em alguns casos, nematoides podem ser controlados por endófitos, como o fungo *Fusarium oxysporum* que produz metabólitos contra o nematoide *Meloidogyne incognita*. Os fungos endofíticos produzem alcaloides que podem apresentar atividade inseticida e nematicida, protegendo a planta destes patógenos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). Desse modo, os PN de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, tais como a atividade antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica. (BUTLER, 2004). A Tabela 1 sumariza alguns desses compostos, com atividades biológicas importantes.

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de plantas e de organismos marinhos.

METABÓLITO	PRODUTOR	HOSPEDEIRO	AÇÃO DO METABÓLITO	REFERÊNCIA
tricodermina	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Ilex cornuta</i>	Antibiótico	CHEN <i>et al.</i> , 2007
fomenona	<i>Xylaria sp.</i>	<i>Piper aduncum</i>	Antibiótico	SILVA <i>et al.</i> , 2010
chokols	<i>Epichloë typhina</i>	<i>Phleum pratense</i>	Fungicida	YOSHIHARA <i>et al.</i> , 1985
paclitaxel (taxol)	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno	STIERLE <i>et al.</i> , 1993
sordaricina	<i>Xylaria sp.</i>	<i>Garcinia dulciis</i>	Ação contra <i>C. albicans</i>	PONGCHAROEN <i>et al.</i> , 2008
scoparasina B	<i>Eutypella scoparia</i>	<i>G. dulcis</i>	Antimicótico	PONGCHAROEN <i>et al.</i> , 2006
peramina	<i>Acremonium lolii</i>	<i>Lolium perene</i>	Inseticida	ROWAN, 1993
piperina	<i>Periconuia sp.</i>	<i>Piper longum</i>	Ação contra <i>M. tuberculosis</i>	VERMA <i>et al.</i> , 2011
lovastatina	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Taxus baccata</i>	Citotóxico	RAGHUNATH <i>et al.</i> , 2012
taxol	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>R. annamalayana</i>	Anticancerígeno	ELAVARASI <i>et al.</i> , 2012
terpenoide	<i>Phomopsis sp.</i>	<i>A. Cathartica</i>	Bactericida	MUTHAMARY, 2011
podofilo	<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Podophyllum sp.</i>	Antiviral	SUDO <i>et al.</i> , 1998;
periconicinas	<i>Periconia sp.</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Antimicótico	KIM <i>et al.</i> , 2004

Além da gama de metabólitos secundários próprios, fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos até então encontrados em suas hospedeiras (GREVE, *et al.*, 2010). Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol® (14), um importante fármaco anticancerígeno, que se origina do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância. Outro importante anticancerígeno é a vincristina (13) isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (BRAHMACHARI & LASKAR, 2010).

Figura 5. Estrutura química do paclitaxel (taxol).



Fonte: BRAHMACHARI & LASKAR, 2010.

Desde a descoberta das penicilinas por Fleming, isolado do fungo *P. notatum*, as pesquisa por metabólitos secundários oriundos de fungos endofíticos, principalmente do gênero *Penicillium* tem ganhado destaques. Isso ocorre devido as espécies de *Penicillium* apresentarem uma alta diversificação, tanto na sua morfologia, quanto na produção de metabolitos secundários. Entre os metabólitos secundários de interesse farmacológico sintetizados por espécies de fungos desse gênero, podemos destacar: antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos e estreptograminas), antibióticos antitumorais (antraciclinas, actinomicinas, bleomicinas e ácidos aureólicos), agentes redutores de colesterol humano (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A) e outros (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2000).

2.4. O gênero *Penicillium* e os fármacos

O gênero *Penicillium* foi classificado como pertencente ao filo Ascomycota, classe *Eurotiomycetes* a ordem *Eurotiales* e pertencentes a família *Trichocomanaceae*, com sua fase telemórfica pertencente aos gêneros *Eupenicillium* ou *Talalomyces*. Este gênero *Penicillium* é considerado importante no que se refere à contaminação alimentar, são amplamente distribuí-

dos no mundo todo e estão presentes em solos, no ar, vegetação em deterioração entre outros (PITT, 2002).

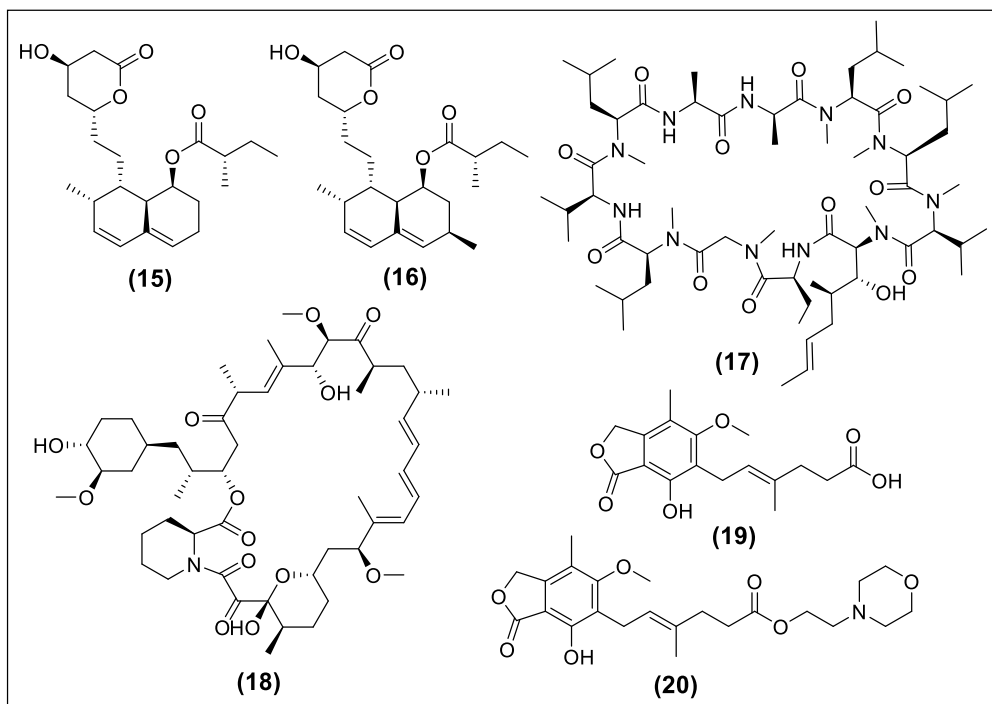
O nome *Penicillium* foi introduzido pela primeira vez por Heinrich Friedrich Link em 1809 e é derivado de *Penicillus*, que significa "pequeno pincel". Diversos trabalhos surgiram no século XIX sobre o gênero, entretanto Dierckx (1901) foi o primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundária, incluindo os subgêneros *Aspergilloides*, *Eupenicillium* e *Biverticillium* (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011).

Por não apresentar reprodução sexuada, o *Penicillium* produz esporos assexuais ou conídios, que se desenvolvem em micélios septados. Sua forma de reprodução é de esporulação, em que os corpos de frutificação sintetizam por mitose células abundantes e leves, que são disseminadas pelo meio. Cada célula é um esporo chamado de conídio, que possui capacidade de dar origem a um novo mofo ou bolor. (PELCZAR, 1997). Este gênero compreende mais de 350 espécies descritas e muitas são habitantes comuns do solo, bem como produtos agrícolas, industrializados e alimentos em deterioração (FRISVAD *et al.*, 2004; PITT & HOCKING, 2009; VISAGIE *et al.*, 2014). São fungos mesófilos que necessitam crescer em temperatura entre 5-37°C (ótima, 20 - 30°C) a um pH de 3-4,5. O crescimento máximo é obtida in vitro a 23°C a pH 3 a 4,5. (MYCOLOGY ONLINE, 2001). Alguns fungos desse gênero apresentam importância fundamental na indústria, como a produção industrial de antibióticos e enzimas, além de serem utilizados na indústria alimentar, na maturação de queijos tipo gorgonzola, roquefort, cramberi dentre outros. (DONATI, 2008).

Em 1975, no Japão, isolou-se, pela primeira vez, do fungo *P. brevicompactum*, a mevastatina (15), sendo posteriormente obtida também de *P. citrinum* (DEWICK, 2009). A lovastatina (16), outra substância hipocolesterolêmica foi isolada posteriormente com estrutura semelhante à mevastatina (possui um grupo 6'-metílico adicional), mas com potência superior, levando à sua aprovação como medicamento, em 1987, pelo FDA (Food and Drug Administration) (CAMPO & CARVALHO, 2007).

Outras substâncias com importantes atividades biológicas também isoladas de espécies do gênero *Penicillium* são os imunossupressores, tais como a ciclosporina A (17), rapamicina (18) e ácido micofenólico (19), tendo, este último, originado o fármaco semissintético micofenolato de mofetila (20) (USUI, 2006).

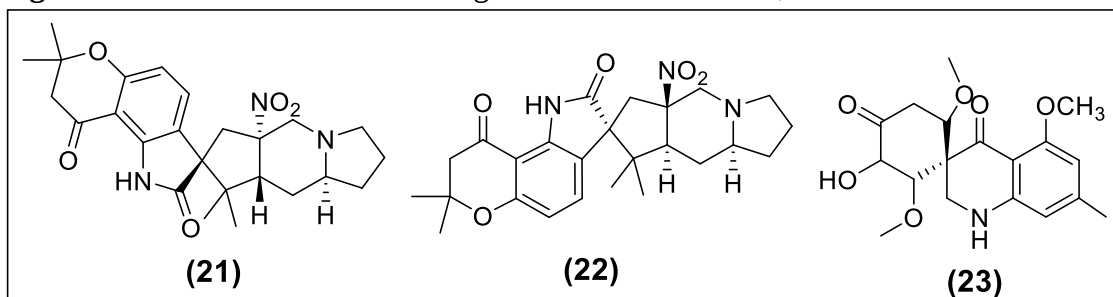
Figura 6. Exemplos de alcaloides derivadas de fungos filamentosos.



Fonte: DEWICK, 2009; CAMPO & CARVALHO, 2007; USUI, 2006.

No trabalho de Pimenta e colaboradores (2010) foi realizado o isolamento dos alcaloides citrinalinas A e B (**21** e **22**) a partir de uma linhagem endofítica de *P. citrinum*, sendo estas substâncias com propriedades citotóxicas contra células de leucemia murina e carcinoma de epiderme (TSUDA, *et al.*, 2004; MUGISHIMA, *et al.*, 2005). Além deste, um novo alcalóide, também foi isolado (**23**). Este por sua vez apresentou atividade distinta contra *Cândida albicans* com CIM de 75 µg/mL.

Figura 7. Alcaloides isolados do fungo *Penicillium citrinum*,



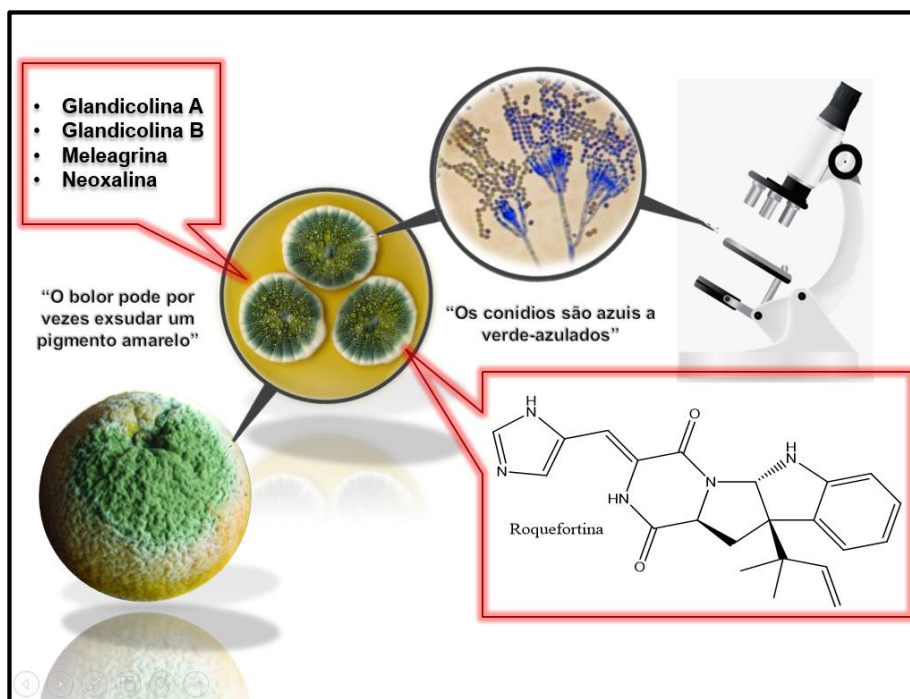
Fonte: Pimenta *et al.*, 2010.

2.5. *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum é um bolor amplamente distribuído na natureza, frequentemente encontrado em alimentos e em ambientes interiores, onde vive. Antes conhecido como *P. notatum*, em raras ocasiões foi apontado como causa de doença em humanos. Como muitas outras espécies do gênero *Penicillium*, o *P. chrysogenum* reproduz-se formando cadeias secas

de esporos (ou conídios) a partir de conidióforos em forma de escova (OVERY *et al.*, 2006). Os conídios são tipicamente transportados por correntes de ar até novos locais de colonização. Em *P. chrysogenum* os conídios são azuis a verde-azulados, e o bolor pode por vezes exsudar um pigmento amarelo (KOSALKOVÁ, *et al.*, 2009).

Figura 8. Estrutura Morfológica do *penicillium chrysogenum*



Fonte: Adaptado de OUCHAOU *et al.*, 2015; ALI, *et al.*, 2013; DEWICK, 2009;

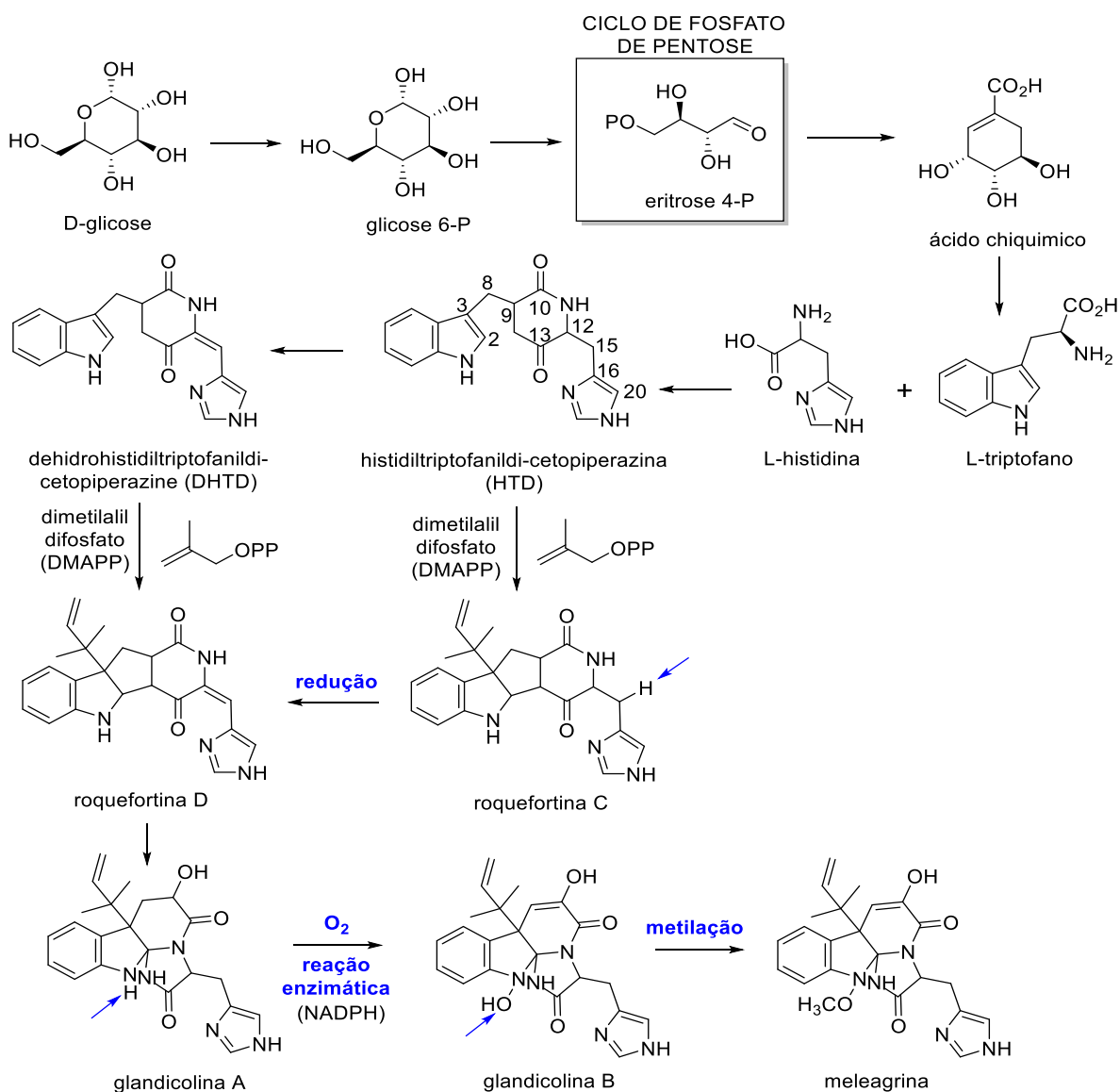
A espécie *P. chrysogenum* é de grande destaque na área farmacêutica, uma vez que linhagens diversas deste fungo são exploradas desde os anos 40 pela elevada produtividade de antibióticos β -lactâmicos (DEMAIN, 2014). Nos últimos anos, o sequenciamento do genoma, bem como a análise de microarranjos em combinação com a modificação genética de *P. chrysogenum*, forneceram uma base sólida para elucidar o papel dos aglomerados secundários de metabólitos encontrados neste organismo, sendo a fonte de diversas variações de antibióticos β -lactâmicos, dentre os quais, o mais conhecido é a penicilina. Entre outros metabólitos secundários de *P. chrysogenum* incluem-se: as roquefortinas e seus derivados, crisogina, xantocilinas, ácidos secalônicos, sorrentanona e sorbicilínóides. Estes com as mais diversas potencialidades farmacológicas tais como, antibióticas, imunossupressoras, e principalmente, citotóxicas (CUETO *et al.*, 2001). A tabela 2 relaciona alguns exemplos do potencial químico e biológico dos metabólitos isolados de *Penicillium chrysogenum* e suas atividades avaliadas.

Tabela 2. Exemplos de metabólitos secundários produzidos e isolados de espécies de *Penicillium chrysogenum*

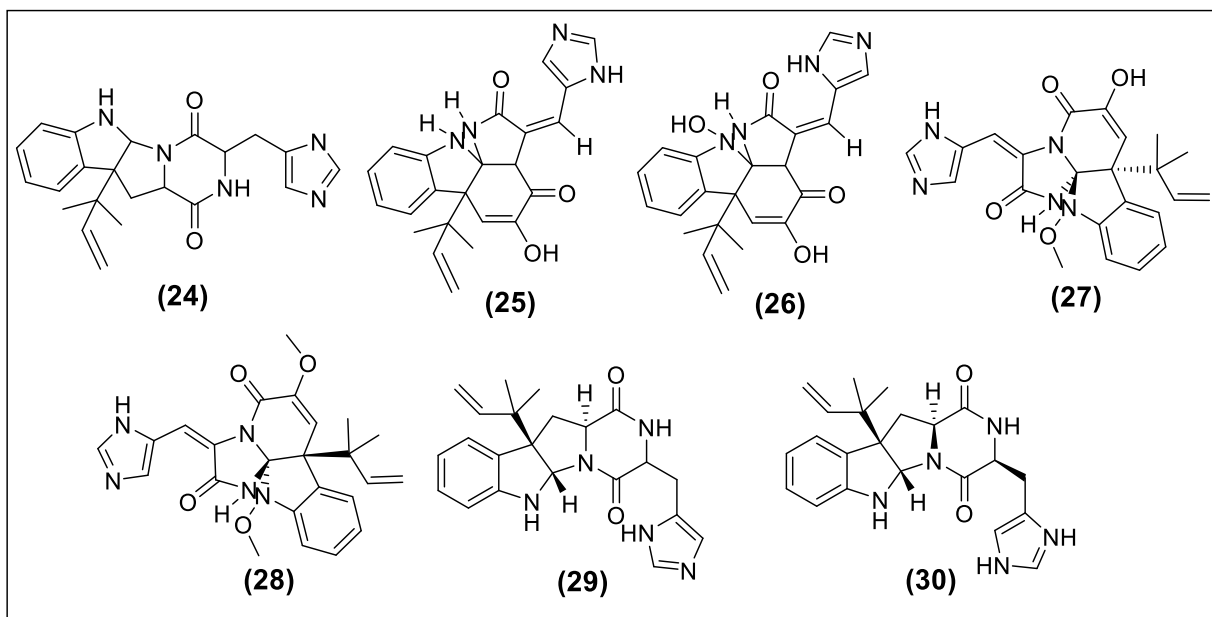
ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	METABÓLITO	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Aegiceras cornulatum</i>	Leptosfaerona C e penicilone	Citotóxica	LIN et al., 2008
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Fagonia cretica</i>	Hipocrelina B e C	Antifúngica	MENG et al., 2011
<i>P.chrysogenum</i>	Planta NI	Xantoviridicatinas E e F	Antiretroviral	SINGH et al., 2003
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Porteresia coarctata</i>	Citrinina	Antimicrobiana e antifúngica	DEVI & D'SOUZA, 2009
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Sargassum. Palladium</i>	2-(4-hidroxifenil)quinazolina-4(3H)-one, N-[2-(4 hidroxifenil) acetil] formamida e N-[(2E)-(4-hidroxifenil) etenil] formamida	Citotóxica	AN et al., 2013
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Tethya aurantium</i>	Cilifuranona	Citotóxica e inibitória enzimática	ALY et al., 2011
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Ircinia fasciculata</i>	Sorbicilactona A	Citotóxica e antiviral	BRINGMANN et al., 2005
<i>P.chrysogenum</i>	<i>Evodia rutaecarpa</i>	10-hidroxi-evodiamina e 11-hidroxi-evodiamina	Citotóxico	LI et al., 2006

Estudos prévios com diversas linhagens de *Penicillium chrysogenum* conduziram à produção de derivados da roquefortina C, tais como roquefortina D (**24**), glandicolinas A e B (**25 e 26**) (em quantidades traço), meleagrina (**27**) e oxalina (**28**). Todos esses metabólitos estão estruturalmente relacionados e podem surgir de precursores biossintéticos comuns por modificações enzimáticas tardias. Recentemente, foi relatado que as roquefortinas C e D (**29 e 30**) são produzidos em *Penicillium chrysogenum* por uma via paralela de biossíntese. No primeiro passo, o precursor comum, histidiltriptofanildicetopiperazi (HTD) é sintetizado pela enzima peptídeo sintase RoqA não-ribossômica. O HTD é subsequentemente transformado em uma série de etapas em roquefortinas e, destas, nos metabólitos secundários seguintes (Figura 8) (GARCÍA-ESTRADA, *et al.*, 2011).

Figura 9. Rota biossintéticas simplificada para formação das roquefortinas e derivados.

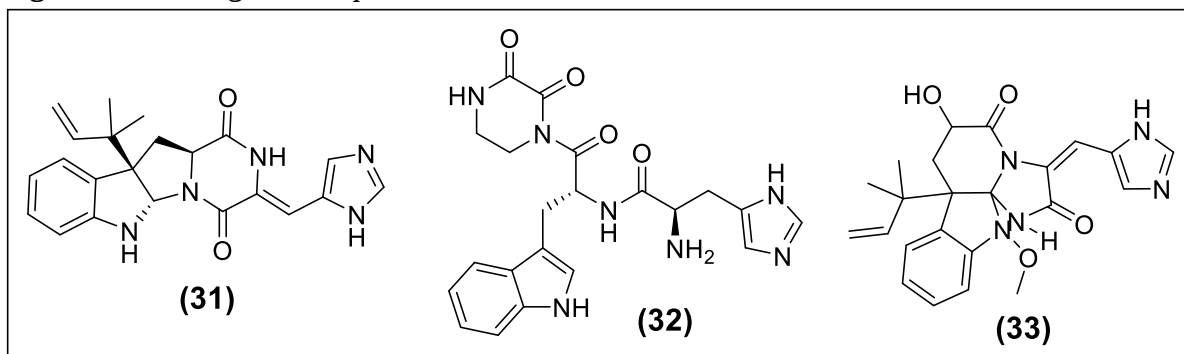


Fonte: Adaptado de OUCHAOU *et al.*, 2015; ALI, *et al.*, 2013; DEWICK, 2009;

Figura 10. Alcaloides isolados de *Penicillium chrysogenum*.

Fonte: GARCÍA-ESTRADA, *et al.*, 2011.

Além de fornecer novos análogos de roquefortinas (31), os demais metabólitos secundários derivados deles são produzidos por muitas espécies diferentes de *Penicillium*, incluindo *Penicillium chrysogenum* (GARCÍA-ESTRADA, *et al.*, 2011). Eles são membros da família ampla de alcaloides indólicos pré-alkilados e são derivados da HTD (32), como precursor distintivo. A roquefortina e seus derivados são de grande interesse devido à sua complexidade estrutural, biossíntese e atividade biológica. A roquefortina C foi identificada como tendo atividade neurotóxica em camundongos e é bacteriostático contra várias bactérias gram-positivas. Um produto derivado da roquefortina C é a neoxalina (33), também um composto com atividade antimicrobiana atribuída (OVERY *et al.*, 2005).

Figura 11. Análogos da roquefortina

Fonte: GARCÍA-ESTRADA *et al.*, 2011; OVERY *et al.*, 2005.

As estruturas químicas relacionadas a roquefortina C, meleagrina e neoxalina sugerem que esses três metabólitos derivam dos mesmos intermediários iniciais da via comum. De fato, foi sugerido que na espécie *P. glandicola*, a roquefortina C é convertido em meleagrina. Essa hipótese foi confirmada por García-Estrada e colaboradores (2008) usando mutantes silenciados em diferentes genes da via roquefortina/meleagrina. Da mesma forma, a meleagrina pode ser convertida em neoxalina. Essas reações ainda são pouco caracterizadas.

Ali e colaboradores (2013) propuseram uma modificação das etapas tardias da via (conversão da roquefortina C em meleagrina e neoxalina). Com base na caracterização química dos intermediários biossintéticos, esses autores relataram que o *P. chrysogenum* produz um novo composto, a roquefortina L. Por fim, para a meleagrina, esses autores propuseram o caminho da seguinte forma: roquefortina C para roquefortina L, depois glandicolina B e meleagrina.

Tendo em vista a atual estratégia do governo do estado do Amazonas em investir em atividades de prospecção com diversas finalidades, bem como todo o potencial para a produção de novos insumos/produtos oriundos da riqueza natural, justificam-se estudos que visam descobrir novas fontes de compostos bioativos. A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos PN. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. Portanto as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al, 2010).

2.6. Aplicabilidade da atividade citotóxica

O câncer é uma doença causada por mutações nos genes codificadores de proteínas e alteração na produção de proteínas, ocasionando o crescimento desordenado de células (neoplasia). Por se dividirem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). (DUTTA et al., 2019; BERNARDES et al., 2019).

Os tumores malignos acometem um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo e representam a segunda causa de morte da população mundial. O câncer está entre as doenças que afetam a sociedade humana, com 14,1 milhões de casos estimados e 8,2 milhões de mortes em todo o mundo (DUTTA et al., 2019). O câncer de pulmão é o câncer mais identificado (11,6% do total de casos), seguido estritamente pelo câncer de mama feminino (11,6%), câncer de próstata (7,1%) e câncer colorretal (6,1%) (DUTTA, et al., 2019).

A pesquisa na área de produtos naturais tem mostrado grandes avanços principalmente no campo da oncologia. Desde 1981 até final de 2014, foram registrados 136 medicamentos contra o câncer no mundo, sendo apenas 17% de origem totalmente sintética e 83% oriundos de produtos naturais (AMARAL *et al.*, 2019). Atualmente, o tratamento do câncer é multidisciplinar englobando mais de uma modalidade dentre cirurgias, quimioterapia e radioterapia. No entanto, muitos tumores ainda se mostram resistentes aos tratamentos clássicos (SOUZA *et al.*, 2018). Portanto, há uma ampla necessidade da indústria farmacêutica na descoberta de novos fármacos com potencial atividade anticâncer ou que melhorem a ação dos fármacos existentes (ISAH *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2019).

Uma das metodologias utilizadas para avaliar a diminuição da proliferação celular ou a citotoxicidade, de amostras de produtos naturais frente diversas células cancerígenas é o ensaio colorimétrico *in vitro* Alamar blue (RAMPERSAD, 2012). Por ser um método rápido e confiável, este ensaio tem sido comumente usados para estudos de viabilidade celular e citotoxicidade em vários sistemas biológicos (BONNIER *et al.*, 2015). Neste ensaio, o reagente colorimétrico resazurina (coloração azul), após algum tempo de exposição à célula, reduz para resofurina (cor rosa fluorescente), esta redução é mediada por enzimas mitocondriais, citosólicas e microssomais e utilizado como um marcador da viabilidade das mesmas (O'BRIEN, *et al.*, 2000).

O perfil de metabolitos representa uma ferramenta que encontra aplicações nos aspectos de descoberta, entendimento e utilização e portanto, representa um ponto importante em estudos da taxonomia e fisiologia de fungos (Smedsgaard & Nielsen, 2005). Desse modo, há um crescente número de técnicas analíticas que são empregadas para estabelecer um perfil de metabolitos secundários e a seleção de um método específico é usualmente uma relação entre sensibilidade, seletividade e rapidez (sumner *et al.*, 2007).

2.7. Fundamentos da técnica de HPLC-MS/MS

A busca por produtos naturais e sua identificação química ocorre através da aplicação de uma das principais técnicas analíticas denominada HPLC–MS/MS (Cromatografia Líquida de Alta eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial). Esta técnica é amplamente utilizada em metabolômica para identificação de moléculas por meio da medição da sua razão massa carga (m/z), sendo comumente utilizada como um método de desreplicação de compostos previamente conhecidos (DORRESTEIN, 2014).

Um dos pontos fortes da técnica espectrometria de massa (MS) é que são necessárias quantidades muito pequenas de amostra e, portanto, a capacidade de obter o máximo de informações estruturais a partir de um único espectro de massa. A facilidade de uso, a sensibilidade e a robustez combinadas com custos razoáveis de instrumentação fazem desta técnica uma das primeiras escolhas em avaliações preliminares de novas fontes naturais (BOUSLIMANI *et al.*, 2014). A análise de massas sequencial (MS/MS) é definida como qualquer análise em MS que tenha dois ou mais estágios de medição da m/z sequencial (pelo acoplamento de dois ou mais analisadores de m/z).

A análise em um espectrômetro de massas, de modo geral se inicia com a introdução da amostra, em seguida será conduzida à geração de íons (positivos ou negativos) na câmara de ionização por electrospray (IGLESIAS, 2016). Após a ionização, os íons são separados de acordo com sua m/z , por fim, são detectados, onde cada íon será contado gerando um sinal. Os pulsos elétricos gerados por estes sinais são analisados por um software instalado ao computador acoplado ao espectrômetro, de modo a visualizar um gráfico denominado espectro de massas. Este tipo de análise auxilia na elucidação estrutural de substâncias orgânicas, uma vez que possui informações acerca da fórmula química da substância, bem como informações de sua fragmentação em fase gasosa, ponto principal para a identificação de certos grupos funcionais e características estruturais únicas (IGLESIAS, 2016).

2.8. Aplicabilidade das redes moleculares (molecular networking)

O uso de redes moleculares (MN) vem sendo uma ferramenta alternativa atual muito eficiente na busca por novos análogos de produtos naturais, estes presentes em misturas complexas como extratos. Essa abordagem é baseada na organização de conjuntos de dados complexos com espectros de MS/MS, além de pesquisas em bancos de dados específicos para a tentativa de identificação de um produto natural (DORRESTEIN, 2014).

Embora, os avanços da MS sejam notáveis, as informações geradas por ela, podem resultar em milhares de espectros em um curto espaço de tempo, portanto, dificultando a análise manual desses dados e o compartilhamento desse conhecimento. Uma alternativa é a utilização de ferramentas computacionais combinadas com a MS. Dentro dessa perspectiva, recentemente aprimoraram o campo da pesquisa em produtos naturais, com o surgimento da ferramenta Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), do Centro de Espectrometria de Massas Computacional da Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD) (WANG *et al.*, 2016; QUINN *et al.*, 2016).

O GNPS é uma plataforma online de banco de dados de livre acesso, que permite a rápida organização de um conjunto complexo de espectros de MS/MS obtidos a partir de inúmeras substâncias analisadas simultaneamente em uma corrida de HLC-MS/MS. Além do agrupamento racional, a sua compatibilidade com bancos de dados permite a desreplicação de substâncias previamente conhecidas, como também auxiliam na identificação de novos compostos. A construção de uma rede molecular ocorre a partir do alinhamento computacional dos espectros de MS/MS, permitindo a correlação espectral de moléculas relacionadas de acordo com as semelhanças nos padrões de fragmentação, logo, assume-se que essas moléculas se fragmentam de maneiras semelhantes (DUNCAN *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Prospectar extratos da linhagem MMSRG-048 de *Penicillium chrysogenum* e caracterizar os alcaloides indólicos produzidos através do uso de redes moleculares e análise espectrométrica, bem como avaliar seu potencial citotóxico.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química dos metabolitos secundários da classe dos alcaloides indólicos produzidos pelo extrato de *P. chrysogenum* através de ferramenta por rede moleculares e espectrometria de massas.
- Avaliar a mudança metabólica induzida pela composição dos meios de cultivo através da técnica de OSMAC (One-strain-Many-Compounds);
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos do fungo *P. chrysogenum*

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Preparo dos meios de cultura

Para o meio de cultura BD – Batata e Dextrose, foram cortadas batatas em cubos com aproximadamente 15 x 15 mm e levadas ao micro-ondas em copo de béquer com água destilada suficiente para cobrir os cubos, em seguida foram cozidas por 20 minutos em potência alta. O caldo foi filtrado com coador de pano e o volume foi completado com água destilada. Os demais meios foram preparados com água destilada utilizando quantidades de materiais distintas (Tabela 2) para cada meio. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para esterilização.

Tabela 3. Quantidades dos materiais para o preparo dos meios de cultura.

Meio de cultura	Materiais	Quantidades
BD (Batata e Dextrose)	Batata portuguesa sem casca	200 g
	Dextrose	20 g
	Água destilada	1 L
ISP2 (International Streptomyces Project)	Amido de milho	10 g
	Extrato de levedura	4 g
	Extrato de Malte	10 g
	Dextrose	4 g
	Ágar	15 g
	Água destilada	1 L
CZAPECK concentrado	Dextrose	10 g
	Ágar	15 g
	Nitrato de sódio	3 g
	Fosfato de potássio dibásico anidro	1 g
	Cloreto de potássio	0,5 g
	Sulfato ferroso hidratado	0,01 g
	Água destilada	1 L

continuação...

Meio de cultura	Materiais	Quantidades
Sabouraud – Ágar	Peptona	10 g
	Dextrose	20 g
	Ágar	15 g
	Água destilada	1 L
Cereal - Sucrilho	Sucrilho	100 g
	Dextrose	4,6 g
	Água destilada	230 mL
Canjica	Canjica	100 g
	Dextrose	4,6 g
	Água destilada	230 mL
Arroz	Arroz	100 g
	Dextrose	4,6 g
	Água destilada	230 mL
Aveia	Aveia	100 g
	Dextrose	4,6 g
	Água destilada	230 mL

4.2. Cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum*

4.2.1. Preparo do pré-inóculo I

Com o auxílio de uma alça de platina, foi realizado a raspagem do microrganismo armazenado em um tubo de ensaio, mantido em geladeira (a 8 °C). Em seguida, o mesmo foi inoculado em outro tubo de ensaio contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA). O fungo foi cultivado durante sete dias, sem agitação, à temperatura ambiente (25 °C).

4.2.2. Técnica de OSMAC

Após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers e cultivado nos diferentes tipos de meios de cultura (líquido e sólido) descritos anteriormente. Em seguida, o fungo foi cultivado durante vinte e oito dias a temperatura ambiente (25 °C).

4.3. Obtenção de extratos

Após o período de 28 dias, o crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultivos (sólidos e líquidos) descritos anteriormente, foi interrompido adicionando-se 200 mL de acetato de etila (AcOEt) em cada erlenmeyer. Posteriormente, foi utilizado o aparelho ultrassônico para quebrar as células do micélio e em seguida manteve-se em repouso por 48 horas. Para os meios de cultura sólidos, os metabólitos secundários produzidos foram filtrados a vácuo com o auxílio de funil e papel de filtro. Em seguida, os extratos orgânicos obtidos foram concentrados em rotaevaporador a vácuo e transferidos para frascos limpos e previamente pesados.

Para os meios de culturas líquidos, os mesmos foram filtrados a vácuo com o auxílio de funil e papel de filtro, separando-se o extrólitos do micélio. Posteriormente, foi realizado uma repartição dos extrólitos obtido, e em seguida foram concentrados em rotaevaporador a vácuo. Por fim, os micélios foram submetidos a extração utilizando-se metanol absoluto. Os mesmos foram triturados com o auxílio do triturador ultra-turrax, filtrados, rotaevaporados e por fim, transferidos para frascos limpos e previamente pesados.

Figura 12. Procedimento experimental para obtenção dos extratos de *P. chrysogenum*.



Fonte: Dados do autor, 2020.

4.4. Espectrometria de massas

As análises metabolômicas foram realizadas na Universidade Federal de São Paulo (UNISFESP). Os extratos em AcOEt foram preparados para esta etapa diluindo-se o material sólido em álcool metílico (MeOH) grau HPLC para a concentração de 2 mg/mL, em seguida os mesmos foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido (1.5 mL). As amostras foram analisadas em um sistema de HPLC-MSMS.

O equipamento abrange um cromatógrafo líquido Nexera X2 (Shimadzu, Japão) e espectrômetro com analisador tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF), MicroTOF-QII (Bruker Daltonics, EUA), equipado com fonte eletrospray (ESI), operando no modo positivo de 71 ionização, com tempo de transferência de íons de 70 μ s e prepulse de 5 μ s. O intervalo de massas selecionado foi de m/z 50-1200, modo AutoMS, com energia de colisão variando de 20 - 65 eV de acordo com m/z 50 - 700, mantendo-se a energia constante em 65 eV para valores de massa acima de m/z 700. Foi adquirido o máximo de cinco íons precursores por ciclo. Os parâmetros de funcionamento do equipamento foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 4 bars, gás secante (nitrogênio) 9,0 L/min, temperatura da fonte 200 °C. Para calibração interna do sistema foi utilizada solução de formiato de sódio 10 nM em isopropanol/água (1:1 v/v).

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1mm, 2.6 μ m) (Phenomenex, EUA) mantida em 50 °C, com vazão de 0,35 mL/min. A fase móvel (A) foi constituída de água ionizada enquanto a fase (B) constituída de acetonitrila, ambas grau HPLC, contendo 20 mM de ácido fórmico como aditivo. Inicialmente foi aplicada eluição isocrática de 0 - 2 min em 15 % de (B), com posterior gradiente de eluição de 2-12 min de 15 % até 95 % de (B) e novamente eluição isocrática de 12-17 min a 95 % de (B). Logo, 5 μ L de amostra foram injetados em cada análise.

4.5. Análise por Molecular Networking

Os espectros dos íons presentes no extrato AcOEt de *Penicillium chrysogenum* obtido pela análise anterior (espectrometria de massas) foram analisados e organizados em redes moleculares usando a plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) (WANG *et al.*, 2016).

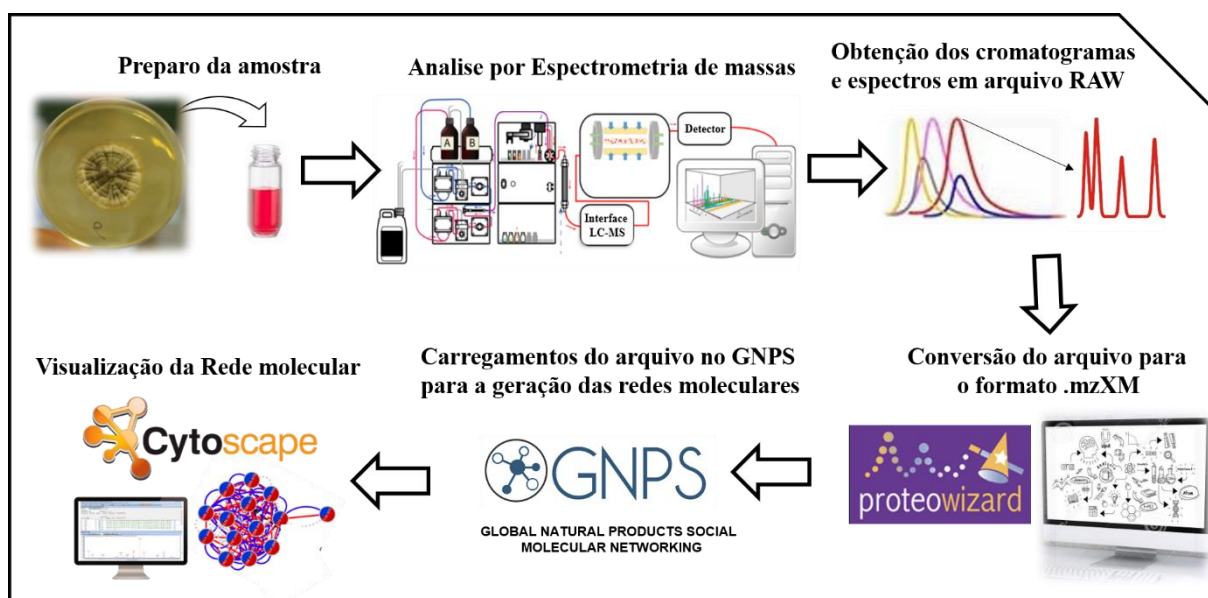
Os arquivos dos espectros foram convertidos para o formato mzXML utilizando o software Proteowizard versão 1.0. Após convertidos, os arquivos foram carregados diretamente na página do Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) para a geração das redes moleculares, bem como realizado a comparação com bibliotecas e interpretação das semelhanças espectrais. Os dados obtidos foram visualizados utilizando o Software Cytoscape

versão 3.7.0. Os parâmetros para a geração da rede molecular foram definidos da seguinte forma: a massa dos íons precursores com tolerância de 0,05 Da, tolerância de íons do produto de 0,5 Da e de fragmento, íons abaixo de 10 contagens foram removidos dos espectros de MS/MS. As redes moleculares foram geradas usando uma pontuação de cosseno de 0,6.

A desreplicação das moléculas previamente conhecidas foi baseada no agrupamento (rede molecular) fornecido pela ferramenta GNPS e interpretação manual dos espectros de varredura de íons produtos (MS/MS) em comparação com diversos artigos que exponham as fragmentações das substâncias em geral e de certas classes de alcaloides previamente publicados, bem como aqueles que previamente identificaram alcaloides em outras espécies dos gêneros de interesse.

Todos os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos e em experimentos de MS foram grau de pureza HPLC. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q®, modelo Synthesis.

Figura 13. Procedimento para a obtenção da rede molecular dos extratos de *P. chrysogenum*.



Fonte: Dados do autor, 2020.

4.6. Ensaios citotóxico in vitro dos extratos de *Penicillium chrysogenum*

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) do Centro de Pes-quisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador-BA. sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

4.6.1. Preparo das amostras e células

Os extratos foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL. As amostras foram testadas na concentração única de 50 µg/mL ou 25 µg/mL. Foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murinho) e HCT116 (carcinoma de colón humano) da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

4.6.2. Ensaio de citotoxicidade

Foi utilizado o ensaio do alamar blue para verificar o potencial citotóxico dos extratos, recentemente identificado como resazurina (ASLANTÜRK, 2018). O alamar blue é um indicador reduz-se em células em proliferação, onde a forma oxidada apresenta coloração azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Este, foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos sobre a proliferação de linhagens celulares tumorais HepG2 - carcinoma hepatocelular humano; B16-F10 - melanoma murinho; HCT116 - carcinoma de colón humano, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição. As células tumorais ou não tumorais foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL ou $0,7 \times 10^5$ células/mL. Também foram utilizadas as linhagens knockouts para estudar os mecanismos de apoptoses. A substância teste (0,09 a 50

$\mu\text{g/mL}$) dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço, utilizando o HTS (high-throughput screening), e encubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 5 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. As amostras foram testadas em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata (LIMA, *et al.*, 2018).

Para a determinação da proliferação celular foi calculado inicialmente o fator de correção R_0 do controle negativo (Figura 13A) Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. Posteriormente, utilizou-se o parâmetro R_0 para eliminar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea (Figura 13B).

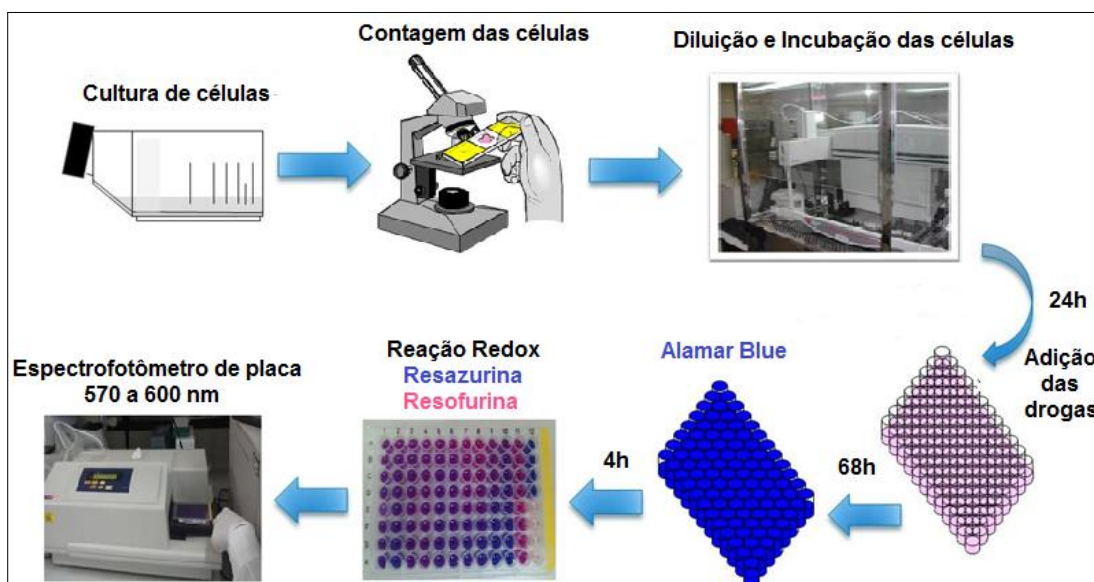
As amostras que obtiverem atividade citotóxica promissora foram registrados a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma 5.0 (GraphPad Software).

Figura 14. Equações para a determinação do R_0 (A) e para determinar a porcentagem de proliferação celular (B).

A $R_0 = \frac{AO_{LW}}{AO_{HW}}$	B $\% \text{ proliferação} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$
---	---

Fonte: AHMED, et al., 1994.

Figura 15. Procedimento experimental para o ensaio de citotoxicidade *in vitro*.



Fonte: MENEZES, 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

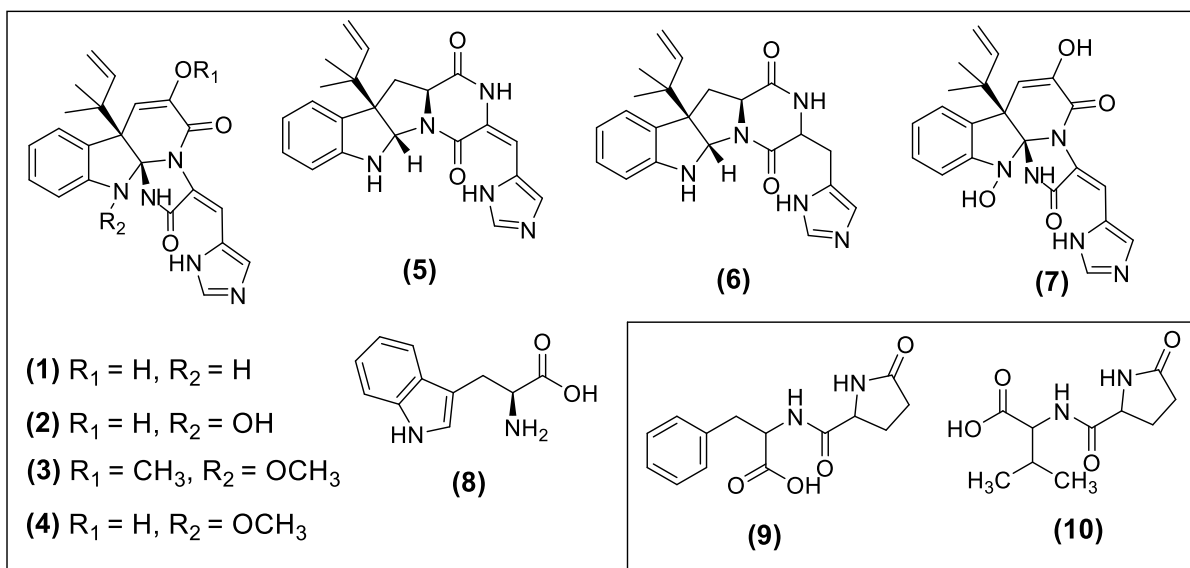
5.1. Identificação das substâncias presentes nos extratos de *P. chrysogenum* por LC-MS/MS e por meio da rede Molecular Networking (MN).

Com o propósito de identificar substâncias da espécie *P. chrysogenum*, os extratos foram submetidos inicialmente a análise por (LC-APCI-MS/MS) a fim de fazer um *screening* das 8 amostras em diferentes meios de culturas e obter seus respectivos cromatogramas e espectros MS/MS. Posteriormente, os espectros MS/MS das substâncias foram agrupados e carregados na plataforma GNPS e posteriormente visualizados a rede molecular através do software cytoscape.

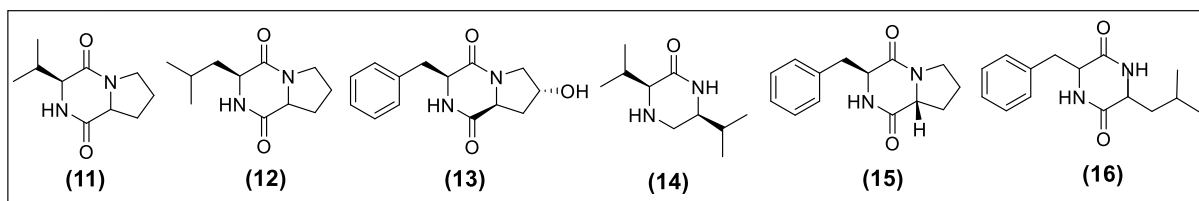
Em seguida, a análise da rede molecular dos extratos em geral desse fungo auxiliou na identificação de 16 metabólitos totais por meio do banco de dados da plataforma GNPS e por meio da interpretação manual dos espectros MS/MS com base na fragmentação das substâncias através de artigos publicados (KOZLOVSKY *et al.*, 1994; KOOLEN *et al.*, 2012; TOR *et al.*, 2006; PERVEEN *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; XING *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2009; STARK & HOFMANN, 2005; CHEN *et al.*, 2004; WANG, CUI & LI, 2016).

Dentre as 16 substâncias (Figura 15), identificou-se 8 alcaloides indólicos (**1-8**), dois peptídeos de piroglutamil (**9 e 10**) e seis alcaloides piperazinas (**11-16**). A tabela 3 e a figura 17 a 32 apresenta os espectros MS/MS utilizados para a identificação das substâncias (estruturas químicas, *m/z* e fragmentos e os cromatogramas dos 8 extratos (em diferentes meios de cultura) obtido pela análise LC-MS/MS são apresentados na figura 16.

Figura 16. Estruturas das substâncias identificadas nos extratos de *P. chrysogenum*.



Continuação



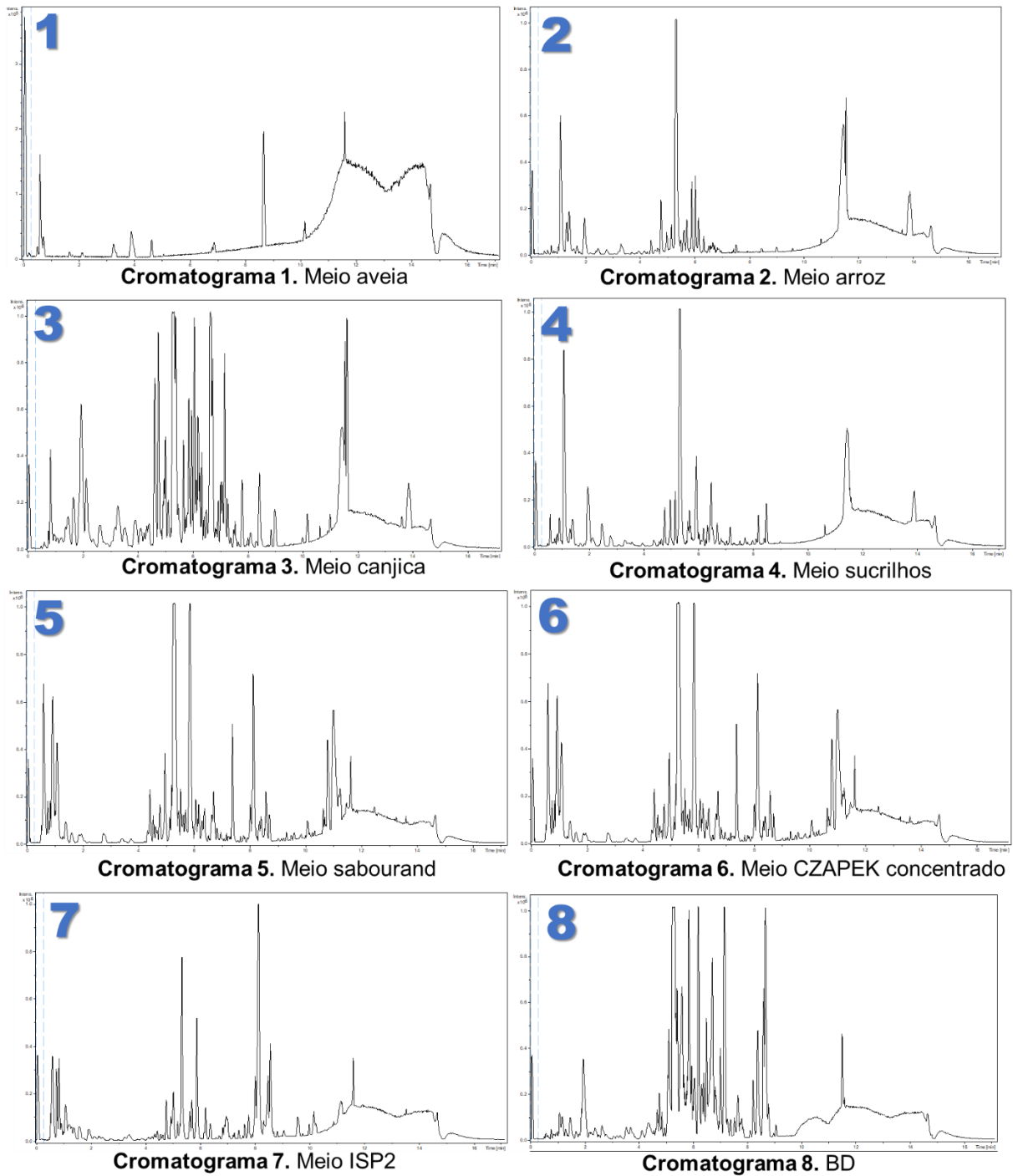
Legenda: (1) glandicolina A, (2) glandicolina B, (3) oxalina, (4) meleagrina, (5) roquefortina C, (6) roquefortina D, (7) neoxalina, (8) triptofano, (9) piroglutamilfenilalanina, (10) piroglutamilvalina, (11) ciclo(L-prolina-L-valina), (12) ciclo(L-leucina-L-prolina), (13) ciclo(L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina), (14) ciclo L-valina-L-leucina, (15) ciclo(L-fenilalanina-D-Prolina), (16) ciclo(fenilalanina-leucina) e (17) hidroquinidina.

Tabela 4. Substâncias identificadas através da análise da Rede molecular networking da fração de *P. chrysogenum*.

Substância	m/z	fragmentação	Ref.
Alcaloides indólicos			
(1) glandicolina A	404.1645	336, 319, 291	1
(2) glandicolina B	420.1634	351, 334, 289, 261,	[1-3]
(3) oxalina	448.2267	245, 151, 124, 96, 69	-
(4) meleagrina	434.1759	349, 417, 366, 349, 336, 303, 292, 275	-
(5) roquefortina C	390.1870	322, 193, 165	[2-5]
(6) roquefortina D	392.1460	350, 332, 305, 289, 193, 261, 246, 220	-
(7) neoxalina	435.2933	317, 255, 217, 155, 111, 89, 57, 45	-
(8) triptofano	205.1909	163, 149, 135, 123, 107, 93, 81, 67, 55	-
Dipeptídeos de piroglutamil			
(9) piroglutamilfenilalanina	277.1761	235, 217, 189, 175, 161, 147, 123, 95	-
(10) piroglutamilvalina	229.1039	227, 211, 196, 177, 169, 141, 113, 85, 68, 56, 45	-
Alcaloides piperazinas			
(11) ciclo(L-prolina-L-valina)	197.1248	169, 154, 141, 124, 98, 72, 70	[6-11]
(12) ciclo(L-leucina-L-prolina)	211.1414	183, 166, 155, 138, 86, 70, 138, 127, 114, 154, 127, 70	[6-11]
(13) ciclo(L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina)	261.1195	233, 215, 187, 120, 86, 68	-
(14) ciclo L-valina-L-leucina	213.1587	185, 168, 140, 86, 72	[8-10]
(15) ciclo(L-fenilalanina-D-prolina)	245.1244	217, 172, 154, 120, 103 70	[8-10]
(16) ciclo(fenilamina-leucina)	261.1535	233, 216, 188, 120, 86	[9]

FONTE: [1] ALI, et al., 2013; [2] KOZLOVSKY, et al., 1994; [3] KOOLEN, et al., 2012; [4] TOR, et al., 2006; [5] PERVEEN, et al., 2017; [6] SILVA, et al., 2017; [7] XING, et al., 2008; [8] RYAN, et al., 2009; [9] STARK & HOFMANN, 2005; [10] CHEN, et al., 2004; [11] WANG, CUI & LI, 2016.

Figura 17. Cromatogramas obtidos da espécie *P. chrysogenum* em diferentes meios de culturas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

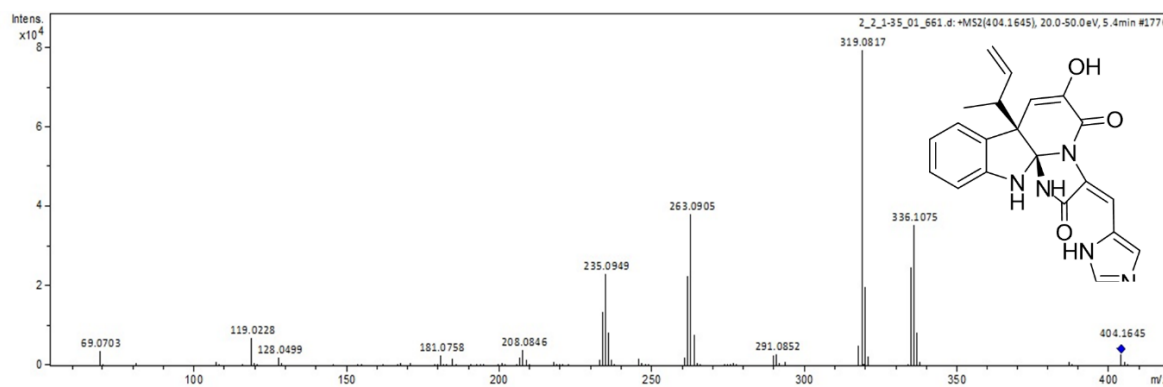
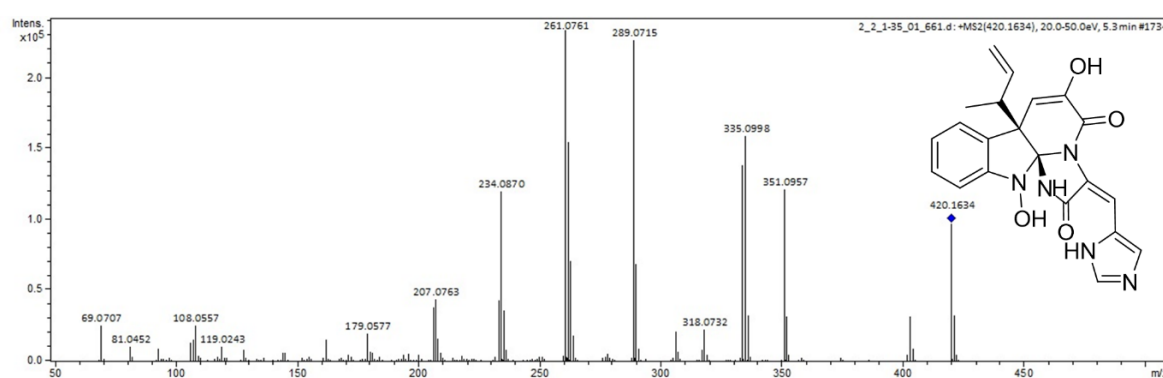
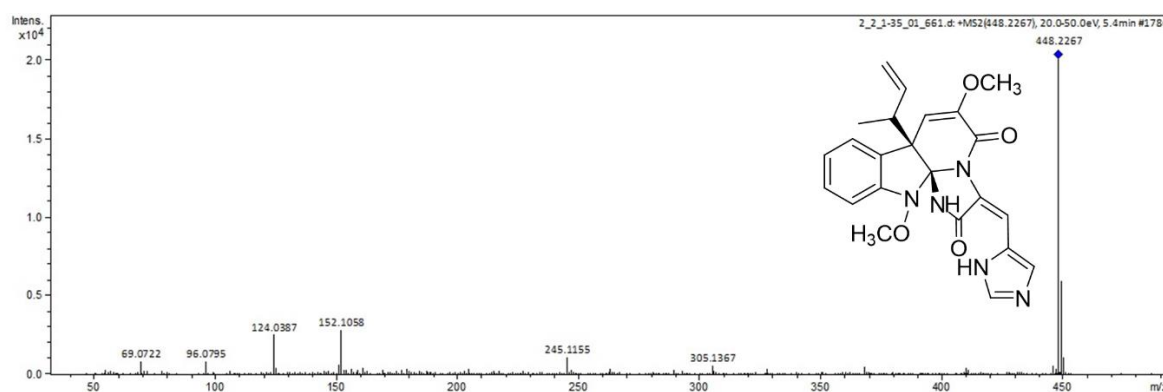
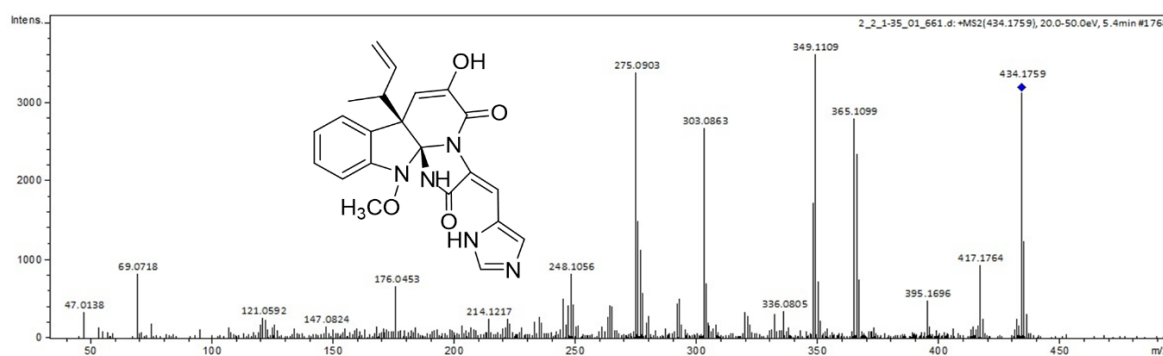
Figura 18. Espectro MS/MS da glandicolina A (1) extraído do meio de cultura BD**Figura 19.** Espectro MS/MS da glandicolina B (2) extraído do meio de cultura BD.**Figura 20.** Espectro MS/MS da oxalina (3) extraído do meio de cultura BD.**Figura 21.** Espectro MS/MS da meleagrina (4) extraído do meio de cultura BD.

Figura 22. Espectro MS/MS da roquefortina C (5) extraído do meio de cultura BD.

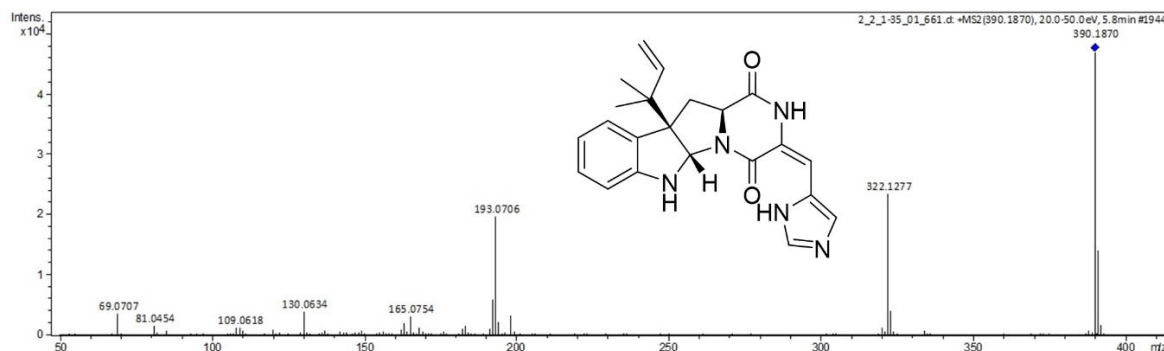


Figura 23. Espectro MS/MS da roquefortina D (6) extraído do meio de cultura BD.

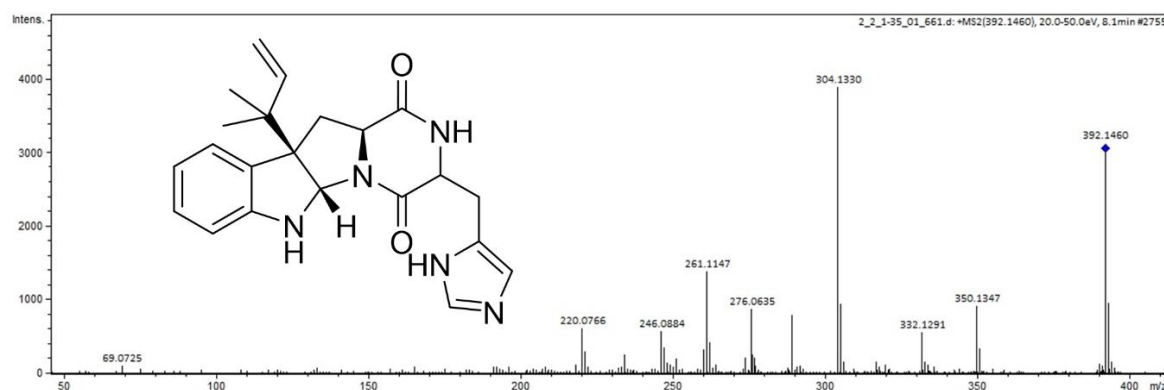


Figura 24. Espectro MS/MS de neoxalina (7) extraído do meio de cultura BD.

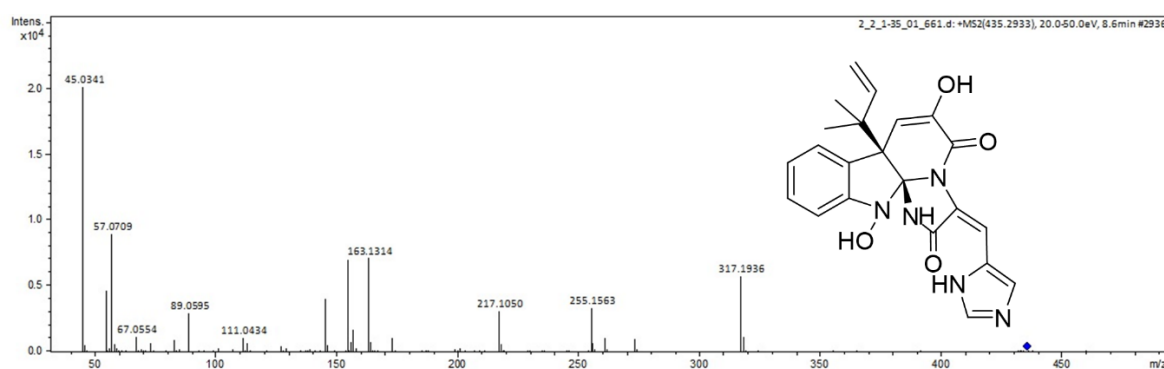


Figura 25. Espectro MS/MS de triptofano (8) extraído do meio de cultura BD.

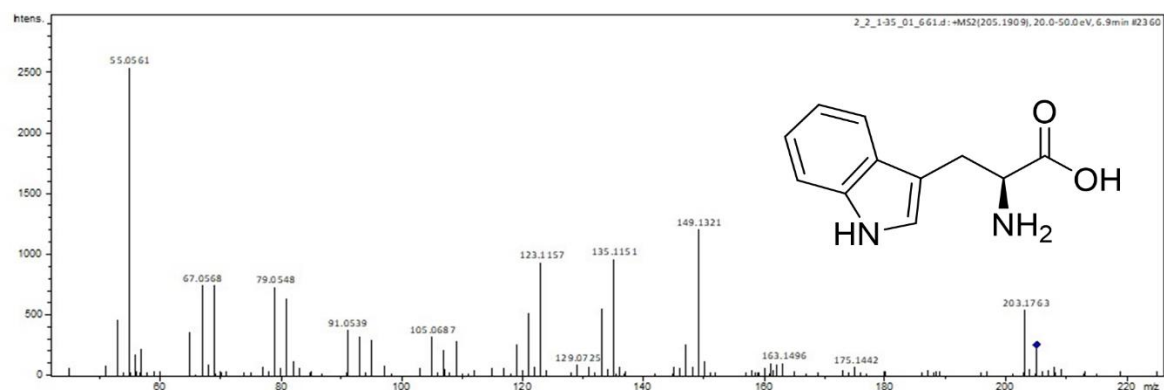


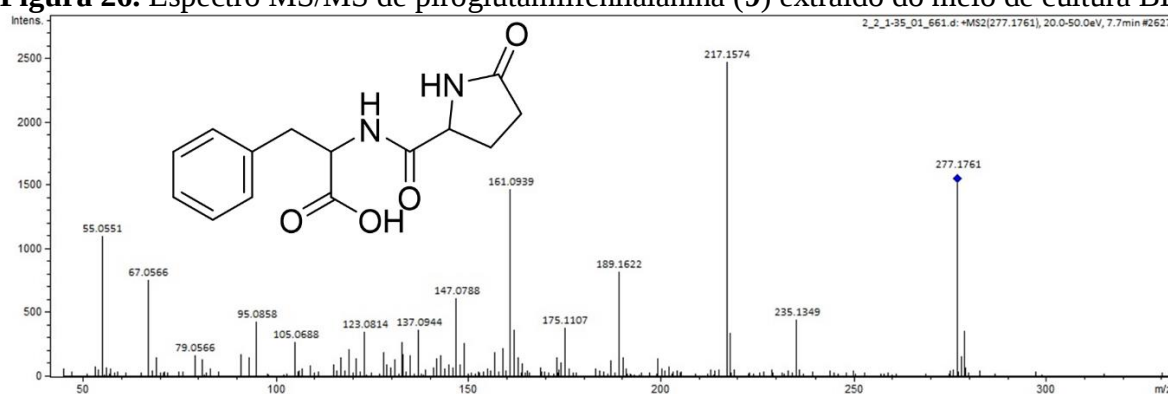
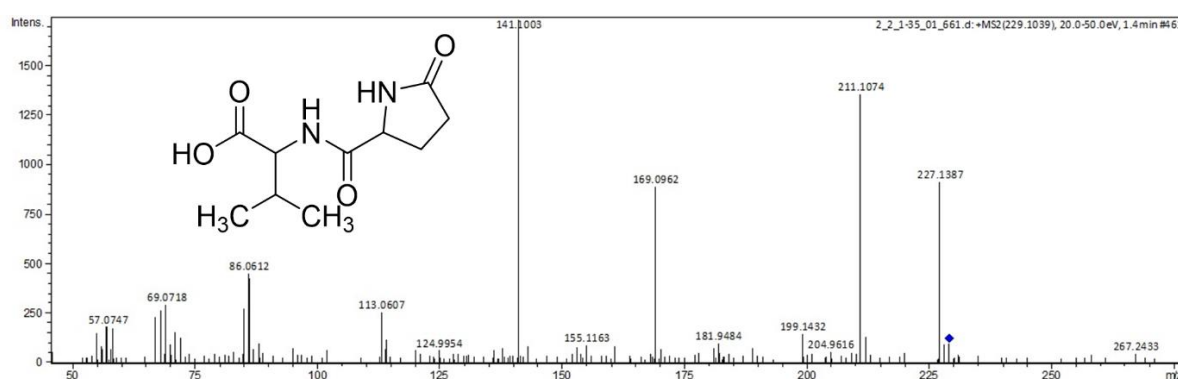
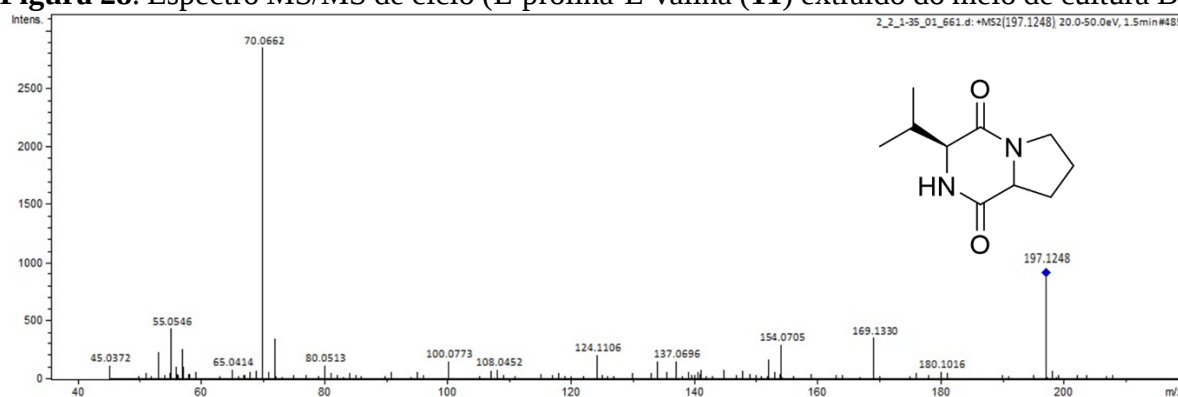
Figura 26. Espectro MS/MS de piroglutamilfenilalanina (**9**) extraído do meio de cultura BD.**Figura 27.** Espectro MS/MS de piroglutamilvalina (**10**) extraído do meio de cultura BD.**Figura 28.** Espectro MS/MS de ciclo (L-prolina-L-valina (**11**) extraído do meio de cultura BD.

Figura 29. Espectro MS/MS de ciclo (L-leucina-L-prolina) (**12**) extraído do meio de cultura BD.

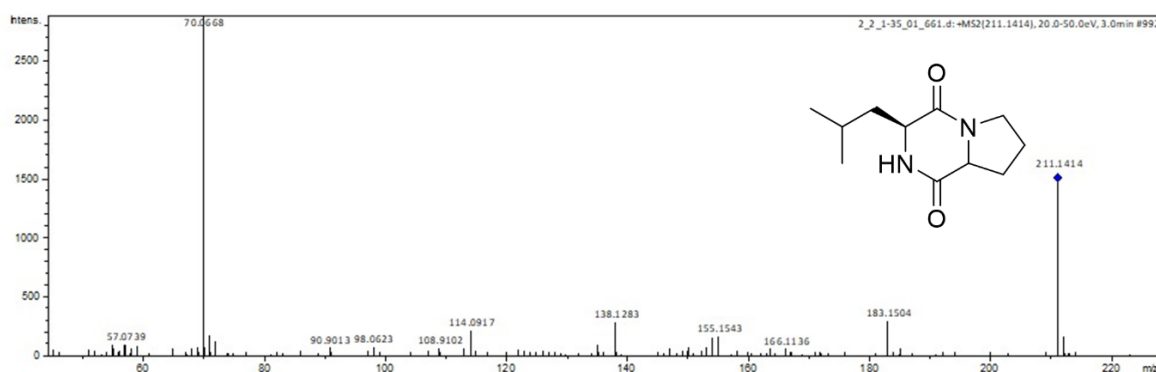


Figura 30. Espectro MS/MS de ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (**13**) extraído do meio de cultura BD.

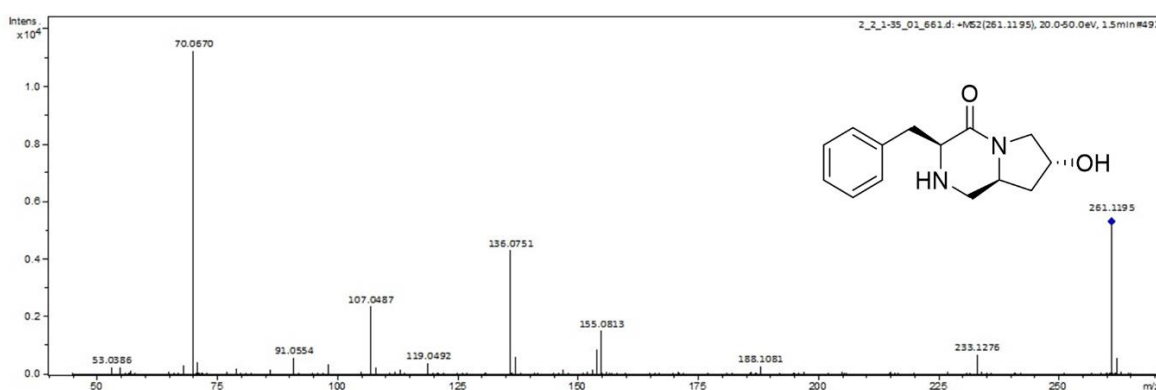


Figura 31. Espectro MS/MS de ciclo valina-leucina (**14**) extraído do meio de cultura BD.

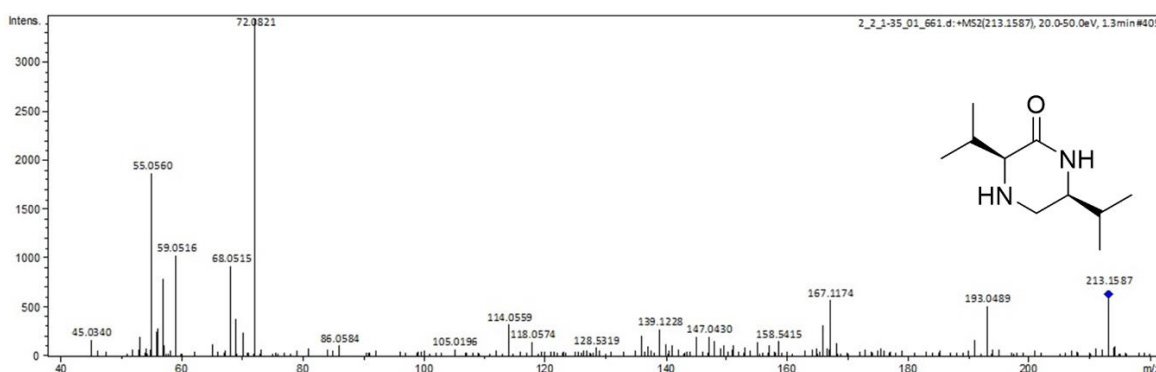


Figura 32. Espectro MS/MS de ciclo (L-fenilalanina-D-prolina) (**15**) extraído do meio de cultura BD.

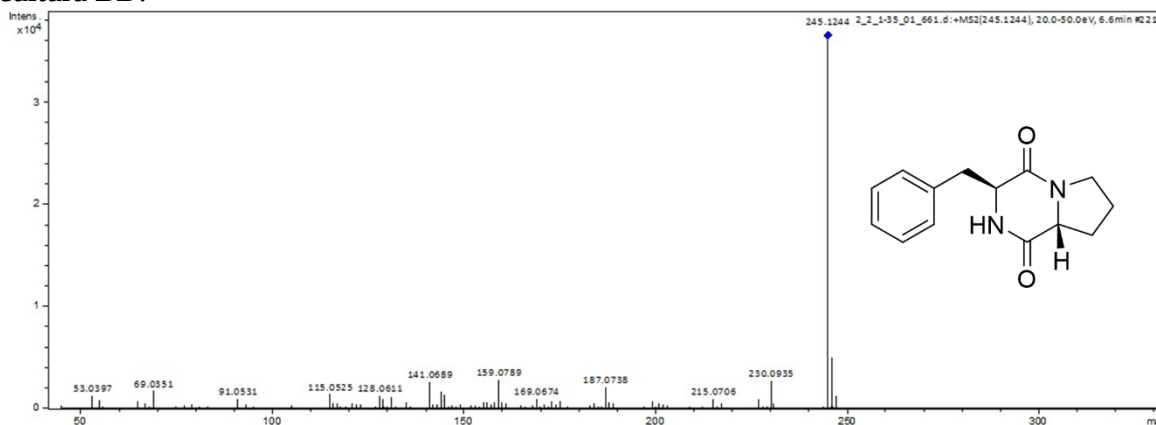
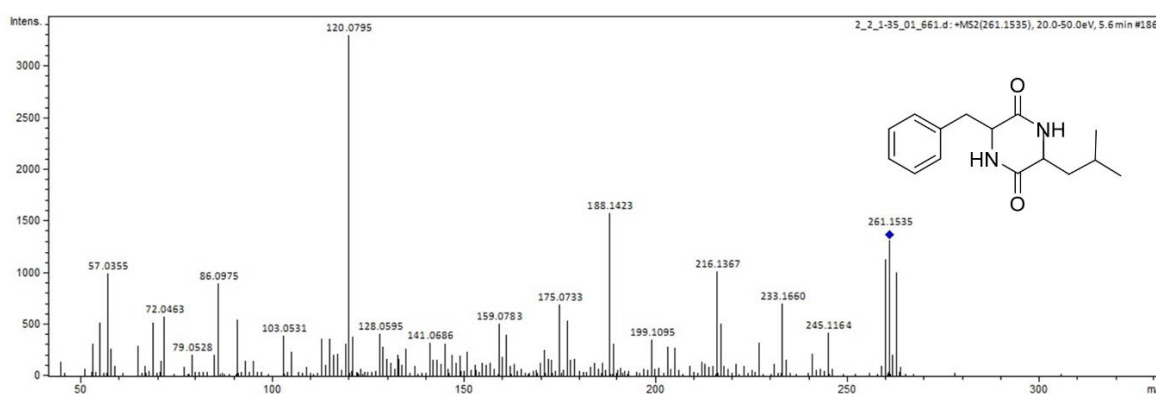
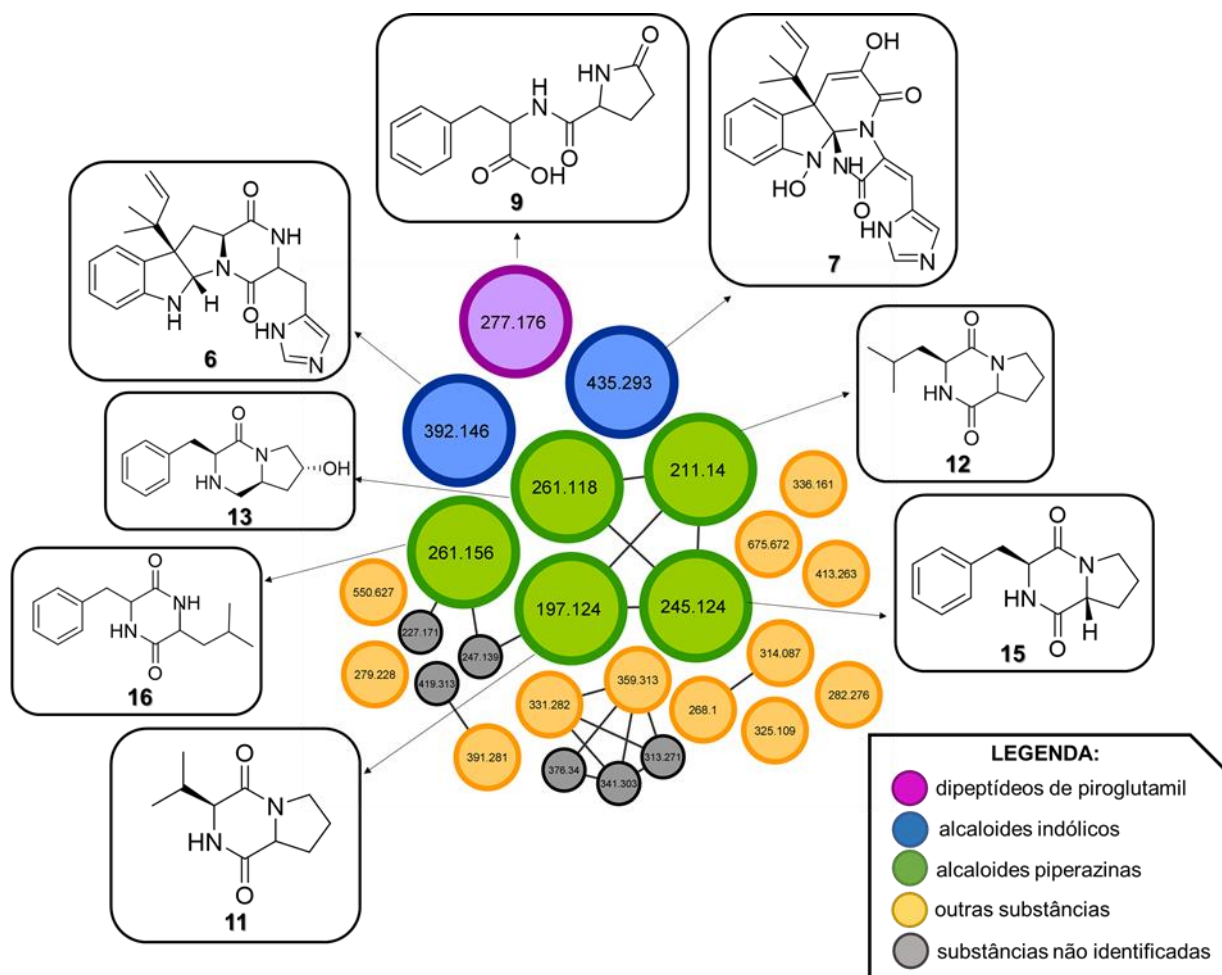


Figura 33. Espectro MS/MS de ciclo (fenilalanina-leucina) (**16**) extraído do meio de cultura BD.



O mapa das redes moleculares individuais para as 8 amostras de *P. chrysogenum* geradas pelo GNPS (Figura 33-40) através dos espectros MS/MS foi construído apresentando vários nós conectados. Através da rede molecular do extrato preparado em meio aveia (Figura 33) é possível visualizar o agrupamento de alguns clusters, bem como clusteres individuais contendo apenas um nó. Esse extrato apresentou 8 substâncias, sendo possível de ser visualizado na rede molecular um cluster individual (um nó) mostrando um dipeptídeo de glutamyl (**9**), dois clusters individuais com dois nós mostrando dois alcalóides indólicos (**6** e **7**), e um cluster maior com 7 nós conectados, com a visualização de quatro alcalóides piperazinas identificados (**11**, **12**, **13**, **15** e **16**). É importante mencionar que os íons em cor cinza são nós resultante de substâncias que não foram possíveis de identificar e os cluster agrupado e individuais contendo nós em cor laranja constituem outras substâncias de outras classes (substâncias não nitrogenadas).

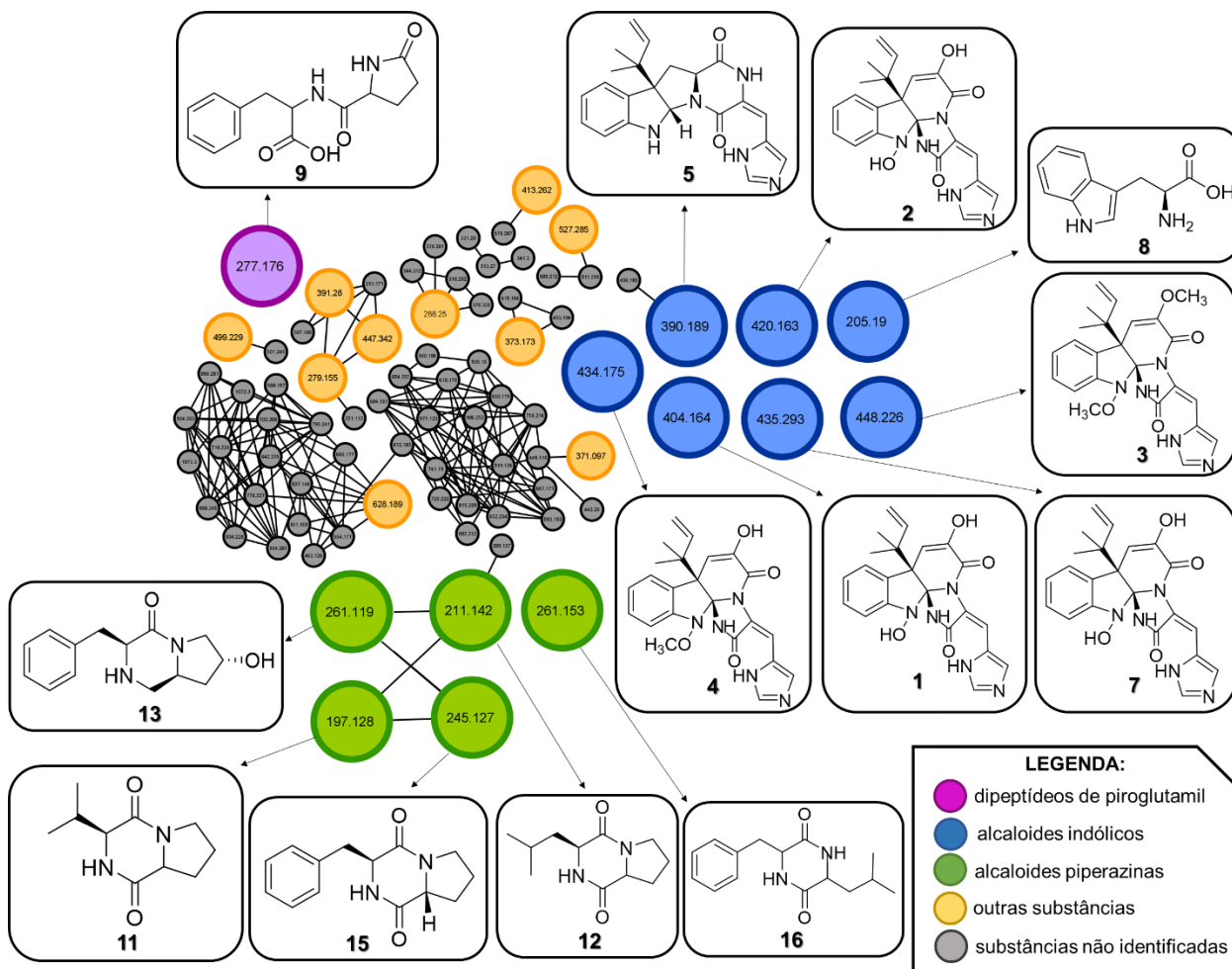
Figura 34. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio aveia apresentando as 8 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

Na rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio arroz (Figura 34) foi identificado 12 substâncias, sendo o meio mais eficiente em relação à produção de metabólitos secundários quando comparado ao meio anterior (meio aveia). Na rede molecular é possível observar 7 nós individuais correspondentes aos alcaloides indólicos (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7** e **8**) e 1 peptídeo (**9**). Os clusters em verde correspondente as piperazinas apresentaram agrupamento semelhante a rede molecular anterior (Figura 33) mostrando as substâncias **11**, **12**, **13**, **15** e **16**.

Figura 35. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio arroz apresentando as 12 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

No extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio canjica (Figura 35), foi possível identificar seis alcaloides indólicos (1, 2, 4, 5, 6 e 8), bem como os alcaloides piperazinas (11, 12, 13, 14, 15, 16) e dois peptídeos (9 e 10). Vale ressaltar que no meio canjica apresentaram duas substâncias a mais e as substâncias identificadas quando comparados ao meio anterior (arroz). Além disso, é possível observar que o perfil dos clusters apresentado em meio canjica é semelhante a alguns conjuntos de clusters em meio arroz.

Figura 36. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio canjica apresentando as 14 substâncias identificadas.

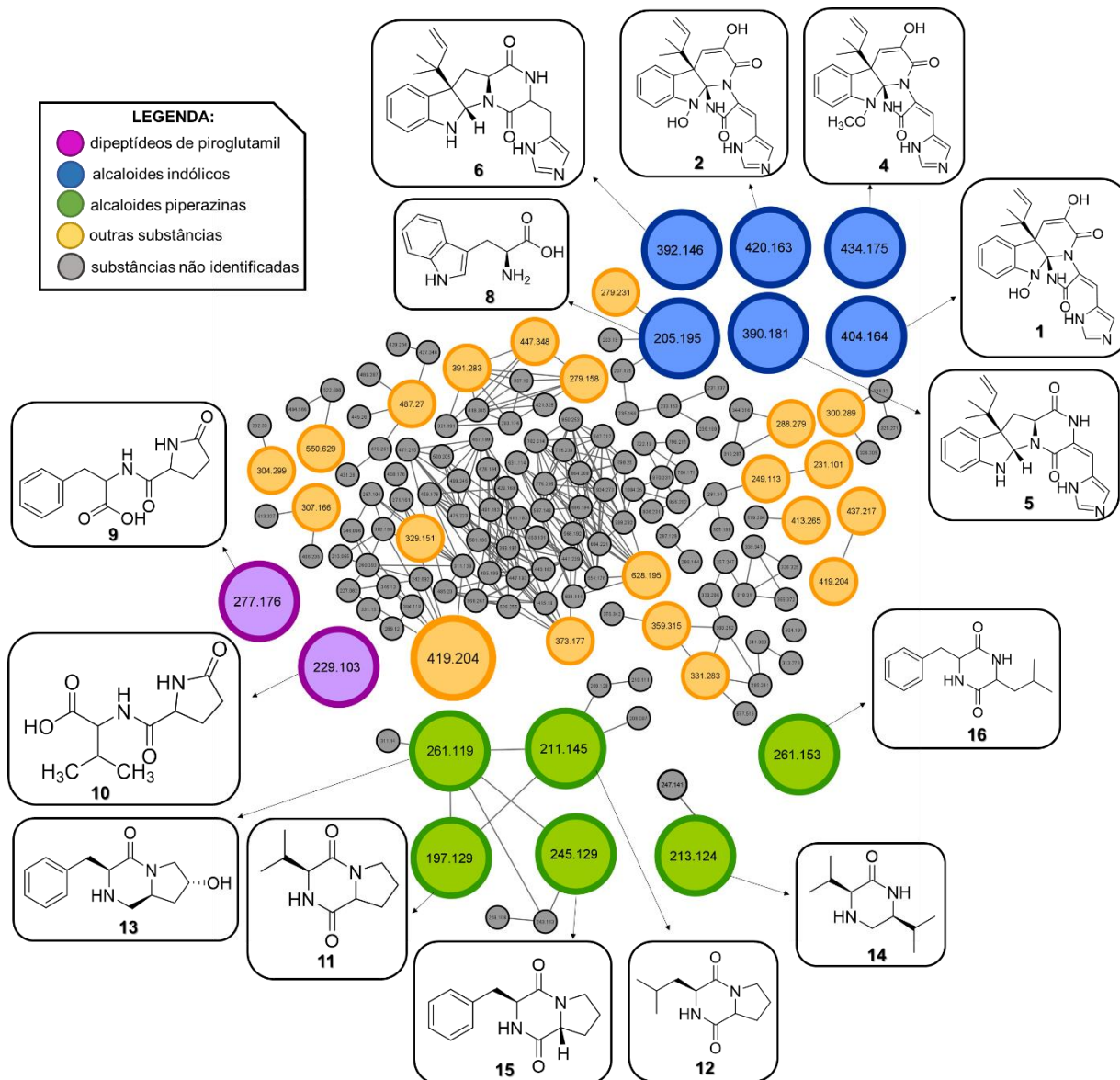
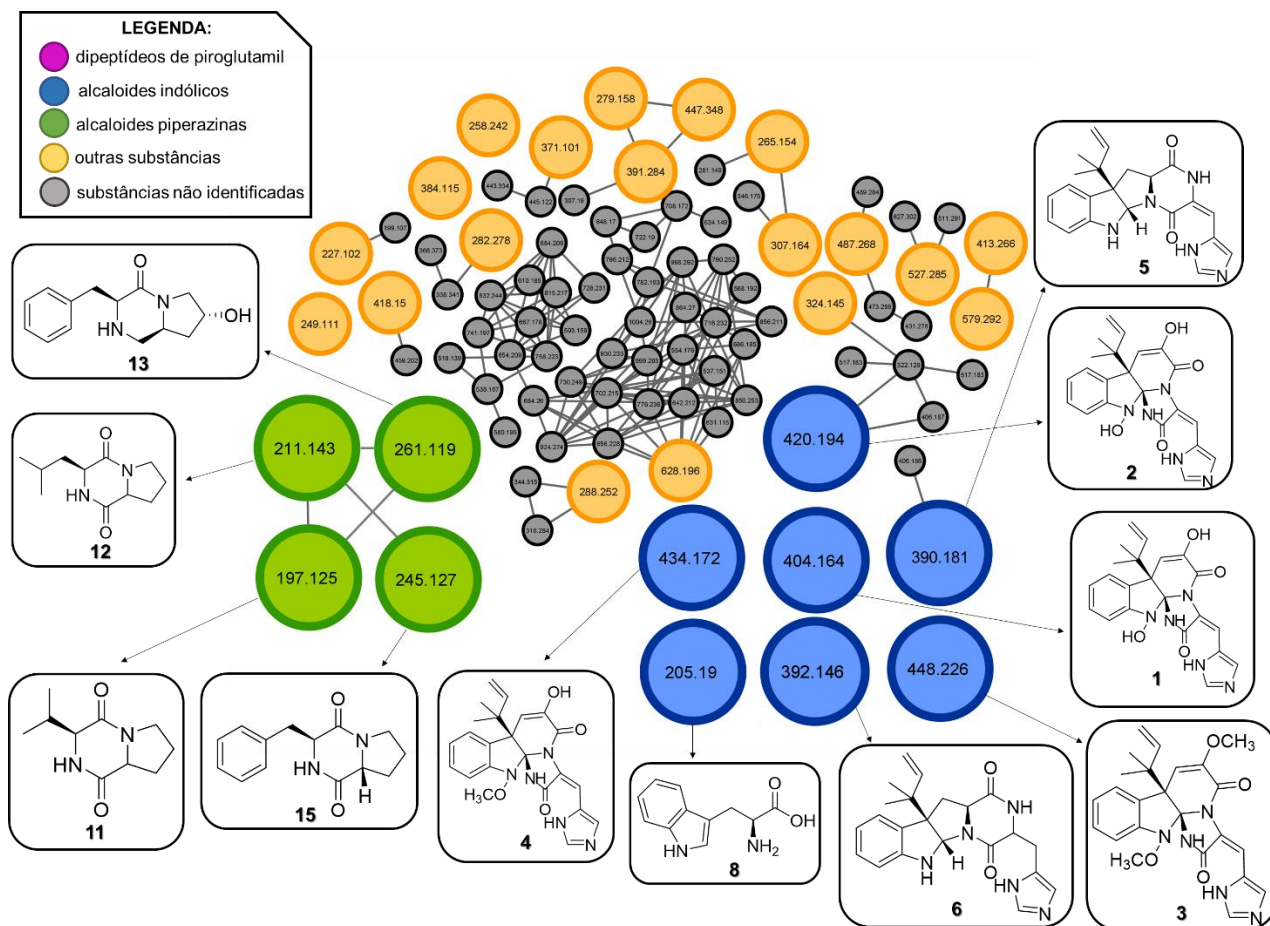


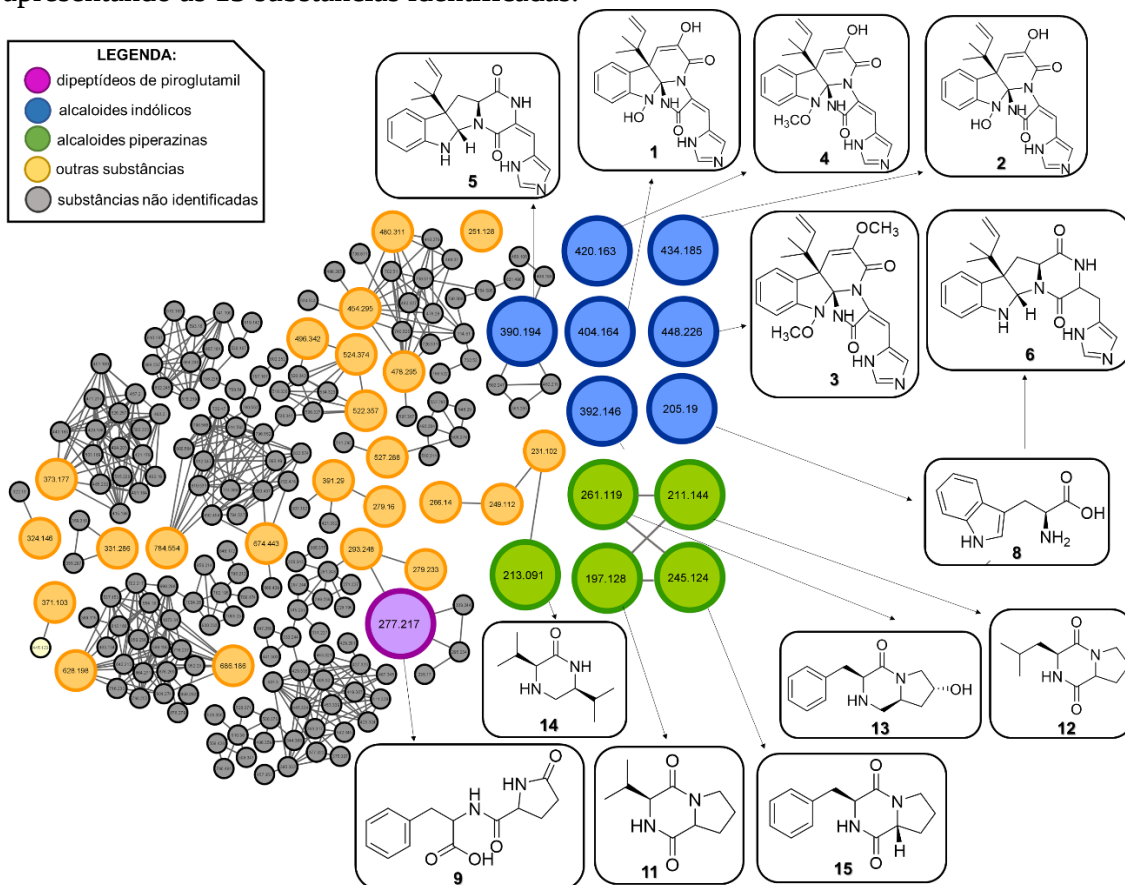
Figura 37. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio sucrrilhos apresentando as 11 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

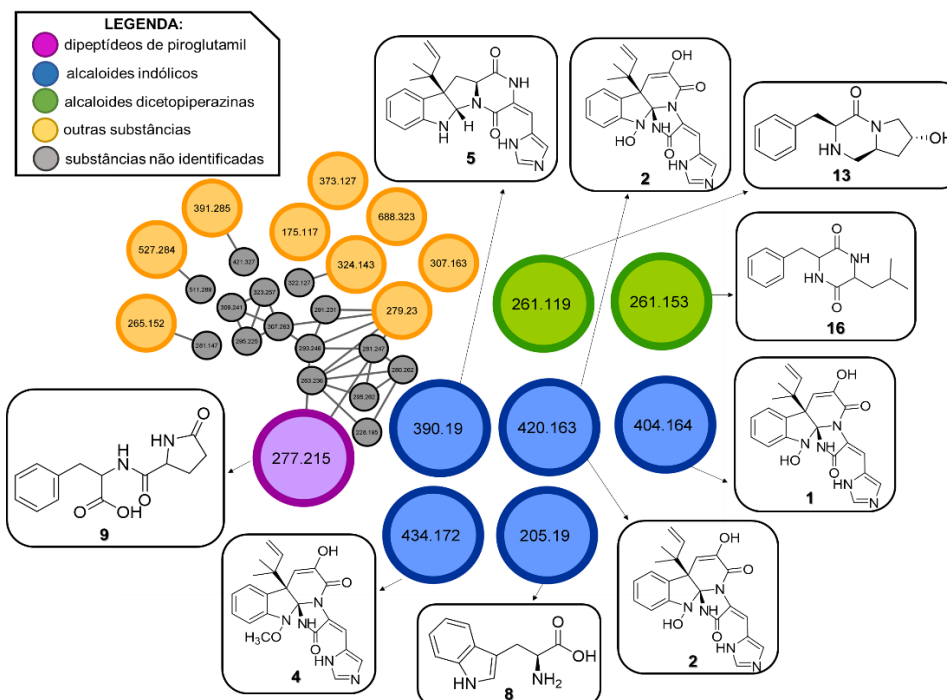
Através da análise da rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio sabourand (Figura 37) foi possível identificar 13 substâncias, sendo o meio mais eficiente em relação à produção de metabolitos secundários quando comparado ao meio aveia e sucrrilhos. Dentre as substâncias identificadas pela rede molecular constatou-se a presença de cinco alcaloides piperazinas (**11-15**), um dipeptideo (**9**) e sete alcaloides indólicos (**1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8**). A rede molecular da amostra preparada em meio CZAPEK concentrado (Figura 38) apresentou apenas 8 substâncias, sendo cinco alcaloides indólicos (**1, 2, 4, 5, e 8**) representados por nós individuais, assim como dois alcaloides piperazinas (**11 e 16**), e um cluster com vários nós não identificados contendo um dipeptídeo conhecido (**9**).

Figura 38. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio sabourand apresentando as 13 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

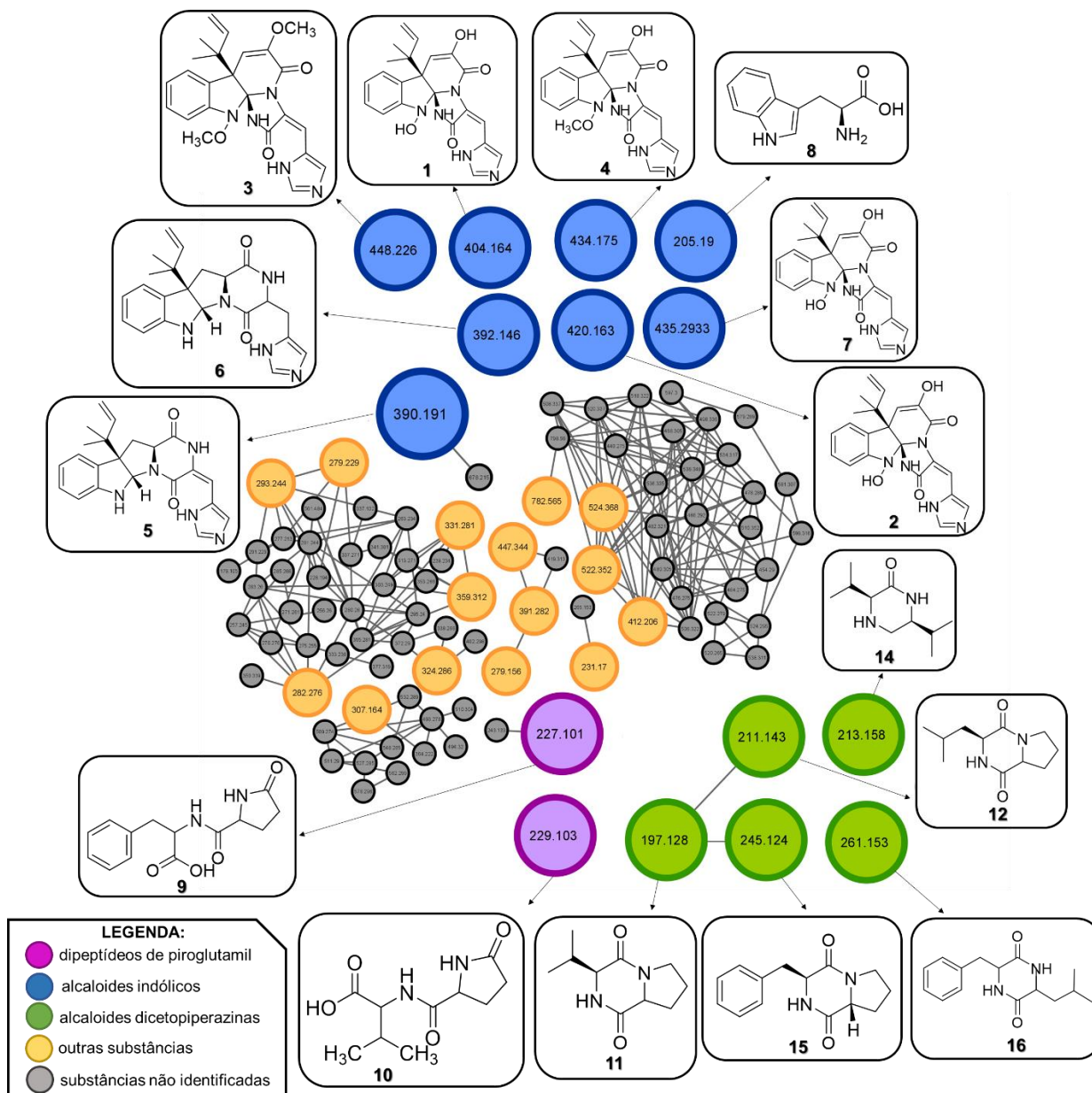
Figura 39. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio CZAPEK concentrado apresentando as 13 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

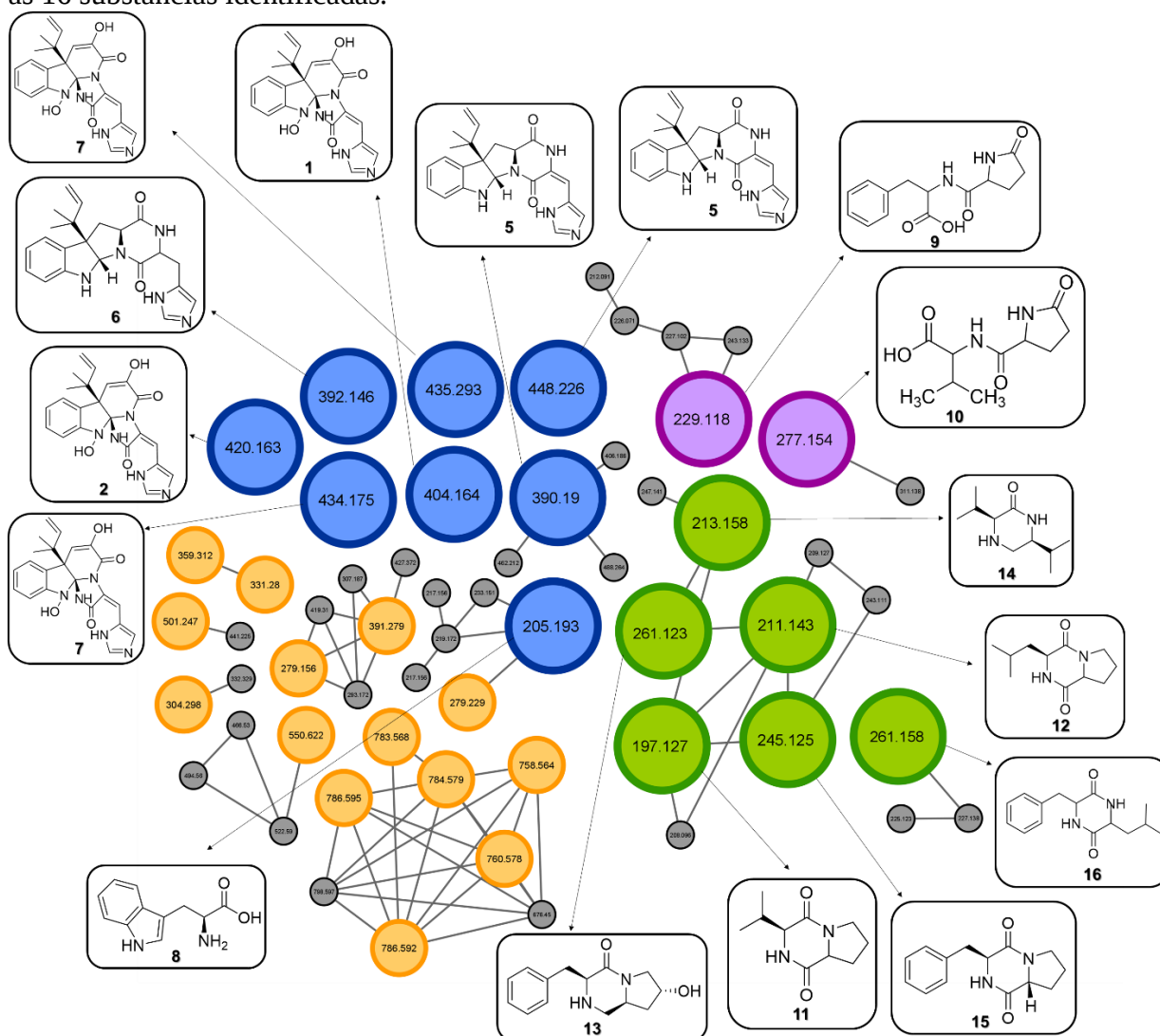
As redes moleculares correspondentes aos extratos em meio ISP2 (Figura 39) e BD (Figura 40) apresentaram-se como os meios mais eficientes para a produção de substâncias de *P. chrysogenum*. O extrato em ISP2 apresentou 15 substâncias, enquanto o extrato em meio BD apresentou 16 metabólitos, sendo o meio mais significativo dentre todos os meios analisados.

Figura 40. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio ISP2 apresentando as 15 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

Figura 41. Rede molecular do extrato de *P. chrysogenum* preparado em meio BD apresentando as 16 substâncias identificadas.



Fonte: Dados do autor, 2021.

A produção de substâncias empregando diferentes meios de culturas foi analisado, sendo possível comprovar a biossíntese preponderante das substâncias glandicolina A, glandicolina B, meleagrina, roquefortina C na maioria dos extratos de *P. chrysogenum*. A tabela 4 apresenta as substâncias produzidas nos respectivos meios de culturas, bem como seu tempo de retenção (análise cromatográfica). Além disso, foi comprovado que dentre todos os extratos analisados, a amostra preparada em meio BD foi o mais promissor no sentido de biossintetizar todas as substâncias identificadas pela análise espectrométrica e por rede Molecular Networking. O extrato preparado em meio ISP2 foi o segundo mais promissor na produção das substâncias, sendo comprovado apenas a ausência da biossíntese da substância ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina).

Tabela 5. Comparação das substâncias presentes nos 8 extratos em meios de culturas diferentes de *P. chrysogenum*.

SUBSTÂNCIA	MEIO DE CULTURA (Tempo de retenção em Min)
glandicolina A (1)	arroz (5.4), canjica (5.4), sucrilhos (5.4), sabourand (5.4), CPZAPEK (5.4), ISP2 (5.4) e BD (5.4)
glandicolina B (2)	arroz (5.3), canjica (5.2), sucrilhos (5.9), sabourand (5.3), CPZAPEK (5.3), ISP2 (5.3) e BD (5.3)
oxalina (3)	arroz (6.3), sucrilhos (6.3), sabourand (6.3), ISP2 (6.3) e BD (5.4)
meleagrina (4)	arroz (4.9), canjica (4.9), sucrilhos (4.9), sabourand (4.9), CPZAPEK (5.3), ISP2 (5.3) e BD (5.4)
roquefortina C (5)	arroz (5.9), canjica (5.8), sucrilhos (5.9), sabourand (5.8), CPZAPEK (5.9), ISP2 (6.0) e BD (5.8)
roquefortina D (6)	aveia (11.5), canjica (5.5), sucrilhos (7.1), sabourand (4.7), ISP2 (4.8) e BD (8.1)
neoxalina (7)	aveia (8.7), ISP2 (9.0) e BD (8.6)
triptofano (8)	arroz (0.6), canjica (6.9), sucrilhos (0.6), sabourand (0.6), CPZAPEK (0.7), ISP2 (9.0) e BD (6.9)
piruglutamilfenilalanina (9)	aveia (8.5), arroz (8.7), canjica (8.3), sabourand (3.7), CPZAPEK (8.1), ISP2 (8.7) e BD (7.7)
piroglutamilvalina (10)	canjica (7.6), ISP2 (1.4) e BD (1.4)
ciclo L-prolina-L-valina (11)	aveia (1.7), arroz (1.8), canjica (5.1), sucrilhos (1.7), sabourand (1.6), ISP2 (1.6) e BD (1.5)
ciclo L-leucina-L-prolina (12)	aveia (3.8), arroz (3.3), canjica (3.3), sucrilhos (3.3), sabourand (3.6), ISP2 (3.2) e BD (3.0)
ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13)	aveia (6.5), arroz (3.7), canjica (2.6), sucrilhos (1.5), sabourand (0.7), CPZAPEK (6.5) e BD (1.5)
ciclo L-valina-L-leucina (14)	canjica (6.7), sabourand (6.7), ISP2 (5.1) e BD (1.3)
ciclo fenilalanina-D-prolina (15)	aveia (4.6), arroz (4.7), canjica (4.6), sucrilhos (4.7), sabourand (6.1), ISP2 (7.1) e BD (6.6)
ciclo fenilalanina-leucina (16)	aveia (1.5), arroz (1.5), canjica (5.5), CPZAPEK (0.7), ISP2 (6.5) e BD (5.6)

Fonte: Dados do autor, 2021.

Dentre os alcaloides identificadas nos extratos da espécie fúngica desse trabalho, alguns foram relatados em estudos empregando outras espécies do gênero *Penicillium*. Com base na revisão de Frisvad (*et al.*, 2004) a roquefortina C (5) foi produzida amplamente por diversas espécies do gênero, sendo o *P. bialowiezense*, *P. brevicompactum*, *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. atramentosum*, *P. carneum*, *P. concentricum*, *P. confertum*, *P. coprobium*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. farinosum*, *P. expansum*, *P. flavigenum*, *P. glandicola*, *P. granulatum*, *P. griseofulvum*, *P. hirsutum*, *P. corymbiferum*, *P. hordei*, *P. marinum*, *P. melanoconidium*, *P. paneum*, *P. persicinum*, *P. radiculicola*, *P. roqueforti*, *P. sclerotigenum*, *P. tulipae*, *P. venetum*, *P. vulpinum*, bem como foi produzido pela espécie *P. chrysogenum* (espécie em estudo) (MADY, *et al.*, 2016; KOSALKOVÁ, *et al.*, 2015; FRISVAD, *et al.*, 2004).

A glandicolina A (1) foi produzida pela espécie *P. glandicola* (KOZLOVSKY, *et al.*, 1994) e a glandicolina B foi biossintetizada pelas espécies *P. glandicola* (VINOKUROVA, *et al.*, 2003), *P. ssp* (KOOLEN, *et al.*, 2012), bem como em *P. chrysogenum* (NICOLETTI & TRINCONE, 2016; ALI, *et al.*, 2013; GARCÍA-ESTRADA, *et al.*, 2011; VINOKUROVA, *et al.*, 2003). Também foram produzidas na espécie *P. chrysogenum* as substâncias: glandicola B (2) (ALI, *et al.*, 2013), oxalina (3) e meleagrina (4) (GARCÍA-ESTRADA, *et al.*, 2011), roquefortina D (6) (ALI, *et al.*, 2013) e neoxalina (7) (MARTIN & LIRAS, 2016). Foi identificado o triptofano (8) no extrato do fungo em estudo, sendo um precursor biossintético dos alcaloides indólicos. Com isso, não é possível evidenciar a importância e contribuição desse metabólito como contribuição em inédita, visto que este é uma peça fundamental na síntese de alcaloides indólicos.

Além disso alguns alcaloides piperazinas foram produzidas por outras espécies desse gênero. O trabalho de Quaglia (*et al.*, 2020) mostra que o ciclo (L-prolina-L-valina) (11) foi produzido pelas espécies *P. solitumi*, *P. crustosum*, *P. venetum*, *P. brevicompactum* e *P. glabrum*, inclusive na espécie *P. chrysogenum*. Além disso, esse constituinte foi isolado de amostras provenientes da espécie *P. purpurogenum* (WANG, CUI & LI, 2016), *P. bilaiae* (CAPON, *et al.*, 2007) e em outras espécies de *Penicillium sp* (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

A substância ciclo (L-leucina-L-prolina) (12) foi produzida pela espécie *P. purpurogenum* (WANG, CUI & LI, 2016), *P. citrinum* (TUNES, *et al.*, 2019), bem como na espécie *P. chrysogenum* (VISAMSETTI, *et al.*, 2016). O ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (13) foi produzido pelas espécies *P. terrestre* (HUI, *et al.*, 2010) e *P. canescens* (BERTINETTI, *et al.*, 2009).

Não constam relatos da produção das substâncias: ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (13), ciclo L-valina-L-leucina (14), ciclo (L-fenilalanina-D-prolina), ciclo (L-

fenilalanina-D-prolina) (15), ciclo (fenilamina-leucina) (16) e os peptídeos piroglutamilfenilalanina (9) e piroglutamilfenilvalina (10) sobre a espécie *P. chrysogenum*. Dessa forma, essas substâncias identificadas por LC-MS/MS e pela rede MN são contribuições inéditas para a espécie em estudo.

5.2. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos de *P. chrysogenum*.

O resultado da atividade citotóxica dos extratos de *P. chrysogenum* utilizando os meios de culturas arroz, canjica, BD, ISP2 e cereal, encontram-se apresentados na tabela 5.

Tabela 6. Resultado da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos de *P. chrysogenum*.

extratos	Atividade (%)	
	HepG2	B16F10
MMSRG-048 - arroz	5,5 ± 3,8	13,4 ± 3,8
MMSRG-048 – canjica	25,8 ± 3,4	4,1 ± 1,9
MMSRG-048 – BD	32,6 ± 6,9	4,1 ± 5,8
MMSRG-048 – ISP2	63,9 ± 3,8	20,1 ± 11,3
MMSRG-048 – cereal	37,6 ± 8,4	0,2 ± 0,1

Legenda: HepG2 - carcinoma hepatocelular humano; B16-F10 - melanoma murinho;

Através da análise de citotoxicidade, observou-se que os todos os extratos não apresentaram atividade de inibição considerável frente à linhagem HepG2 e B16F10. Adicionalmente, os extratos apresentaram-se inativos frente à linhagem HCT116. Embora, o extrato preparado em meio de cultura ISP2 apresentou valor em porcentagem maior em relação as demais amostras para HepG2 e B16F10, não é possível evidenciar a atividade citotóxica *in vitro*, visto que os resultados não alcançaram inibição satisfatória para realização da microdiluição dos extratos e posteriormente serem comparadas pelo parâmetro do IC₅₀. Com base, no programa de triagem de amostras citotóxicas utilizado pelo LETI-CPqGM-FIOCRUZ e dados da literatura (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001), extratos ou frações que apresentam valores de CI₅₀ < 30 µg.mL⁻¹ são consideradas promissoras na investigação de propriedades antitumorais. Dessa forma, não foi realizado a análise com as amostras para obter seus respectivos IC₅₀.

Possivelmente, os metabólitos secundários identificados pela análise Molecular Networking tenham apresentado baixa concentração nos extratos de *P. chrysogenum*, sendo que a citotoxicidade é decorrente da ação de metabólitos, dentre eles, a classe dos alcaloides. A

citotoxicidade contra células tumorais é uma das propriedades biológicas mais comumente relatadas nos alcaloides, essa propriedade biológica tem sido amplamente estudada visando futuras aplicações medicinais através da sua utilização para eliminar e/ou regredir a proliferação de células cancerígenas (ANISZEWSKI, 2007).

Nesse sentido, substâncias alcaloidicas indólicas apresentam atividade citotóxica comprovada (WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Com base na busca nas principais bases de dados, foram encontrados estudos com alguns dos constituintes químicos identificados pela rede molecular de *P. chrysogenum* apresentam atividades citotóxicas relatadas na literatura, tais como a roquefortina C (RASMUSEN *et al.*, 2011), glandicolina B (CHENG *et al.*, 2019) e ciclo (L-valina-prolina) (NISHANTH *et al.*, 2014) frente a células tumorais.

Com isso, fica evidente que a produção dessas substâncias pelo fungo *P. chrysogenum* reportadas na literatura com potencial citotóxico, possivelmente tenham sido biossintetizada em baixas concentrações, tendo como resultado de porcentagens total entre 0,2 a 63,9 % de inibição das células. Portanto, é favorável que sejam realizadas análises posteriores sobre o isolamento fitoquímico para essa espécie. É possível ressaltar que muitas espécies do gênero *Penicillium* apresentam atividades citotóxicas proveniente de seus extratos tais como *P. islandicum* (ABDEL-HADY, *et al.*, 2016), *P. chermesinum* (PRACHYA, *et al.*, 2019), *Penicillium citrinum* (OLIVEIRA FILHO, *et al.*, 2020), *P. brocae* (MENG, *et al.*, 2014), dentre outras espécies desse gênero.

6. CONCLUSÃO

Através da análise LC-MS/MS e por rede molecular foram identificadas 16 substâncias dos extratos de *P. chrysogenum*, sendo oito alcaloides indólicos (glandicolina A (**1**), glandicolina B (**2**), oxalina (**3**), meleagrina (**4**), roquefortina C (**5**), roquefortina D (**6**), neoxalina (**7**), triptofano (**8**)), dois peptídeos de piroglutamil (piroglutamilfenilalanina (**9**), piroglutamilvalina (**10**)), seis piperazinas (ciclo (L-prolina-L-valina) (**11**), ciclo (L-leucina-L-prolina) (**12**), ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (**13**), ciclo L-valina-L-leucina (**14**), ciclo (L-fenilalanina-D-Prolina) (**15**) e ciclo (fenilamina-leucina) (**16**)). Foi comprovado que o meio mais eficiente frente a produção de metabolitos secundários foi o meio BD, na qual apresentou 16 substâncias conforme a análise por rede molecular. Os extratos preparados em diferentes meios e cultura de *P. chrysogenum* não apresentaram potencial citotóxico ativo. Possivelmente, os metabólitos secundários identificados tenham apresentado baixas concentrações nos extratos, visto que a citotoxicidade é decorrente da ação de metabólitos, dentre eles, a classe dos alcaloides.

É válido ressaltar que as substâncias identificadas por LC-MS/MS e pela rede MN tais como as piperazinas **13**, **14**, **15** e **16** e os peptídeos **9** e **10** identificados na espécie *P. chrysogenum* são contribuições inéditas para a espécie em estudo. Dessa forma, é possível concluir que a espécie em estudo apresenta metabólitos secundários que são responsáveis pelo potencial citotóxico (conforme a literatura), sendo necessário o prosseguimento de outros estudos com essa cepa fúngica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HADY, H.; ABDEL-WARETH, M. T. A.; EL-WAKIL, E. A.; HELMY, E. A. **Identification and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Penicillium islandicum* and *aspergillus tamaris* ethyle acetate extracts.** WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, v. 5, n. 9, p. 2021-2039, 2016.

AGRIOS, G. N. **Plant Patology.** New York: Academic Press, 3 ed. p. 40, 1988.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. **A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay.** Journal of Immunological Methods. v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. **Exploration of industrially important pigments from soil fungi.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p. 1631–1643, 2016.

ALI, H.; RIES, M. I; NIJLAND, J. G; LANKHORST, P. P; HANKEMEIER, T.; BOVENBERG, R. A.; VREEKEN, R. J.; DRIESSEN, A. J. **A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*.** PLoS One. v.12; n. 8, p. 1-12, 2013.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. **Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

AMARAL, R. G.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, L. N.; SEVERINO P.; CARVALHO, A. A. **Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision.** Clinical Oncology, v. 4, n. 5, 2019.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids- Secrets of life (Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role).** Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, 5 ed. 334 p, 2007.

ASLANTÜRK, O. S. **In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages.** IntechOpen, v. 1, p. 1-17, 2018.

BÉRDY, J. **Bioactive Microbial Metabolites.** The Journal of Antibiotics, v. 58, n. 1, p. 1- 26, 2005.

BERTINETTI, B. V.; PEÑA, N. I.; CABRERA, G. M. **An Antifungal Tetrapeptide from the Culture of *Penicillium canescens*.** Chemistry & Biodiversity, v. 6, n. 8, p. 1178–1184, 2009.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy.** Oregon Medical Press, Minnesota, USA, 1st ed. p. 25, 2001.

BONNIER, F. M. **Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models.** Toxicology in Vitro, v. 29, n. 1, p. 124-131, 2015.

BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P. C. **“Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies”**. Natural Product Reports, v. 31, n. 6, p. 718, 2014.

BRAHMACHARI, G.; LASKAR, S. **A very simple and highly efficient procedure for N-formylation of primary and secondary amines at room temperature under solvent-free conditions**. Tetrahedron Letters, v. 51, p. 2319-2322, 2010.

BUTLER, M. S. **The role of natural product chemistry in drug discovery**. Journal of Natural Products, v. 67, p. 2141-2153, 2004

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. **Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CAPON, R.J.; STEWART, M.; RATNAYAKE, R.; LACEY, E.; GILL, J.H. **Citromycetins and bilains A–C: New aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp.** J. Nat. Prod., v. 70, p. 1746–1752, 2007.

CHEN, B. D. **The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn.** Science of the Total Environment, v. 379, p. 226-234, 2007.

CHEN, Y. H.; LIOU, S. E.; CHEN, C. C. **Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence**. Eur. Food Res. Technol., v. 218, p. 589–597, 2004.

CHENG, Z., LI, Y.; XU, W.; LIU, W.; LIU, L.; ZHU, D.; KANG, Y.; LUO, Z.; LI, Q. **Three new cyclopiane-type diterpenes from a deep-sea derived *Penicillium* sp. YPGA11 fungus and their effects against human esophageal carcinoma cells**. Bioorganic Chemistry, v. 91, p. 1-5, 2019.

CHOWDHARY, K.; NUTAN, K.; AZUCENA, G.C.; CABRERA, M. R. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 467-485, 2012.

COS, P. **Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”**. Journal of Ethnopharmacology, v. 106, p. 290–302, 2006.

CUETO, P. R J.; KAUFFMAN, C.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. **Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge**. Journal of Natural Products, v. 64, p. 1444-1446, 2001

DEMAIN, A. L. **Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 41, p. 185-201, 2014.

DEVARI, S. **Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC-ESI-MS/MS analysis**. Phytochemistry, v. 98, p. 183-189, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. London: West Sussex John Wiley & Sons, 3 ed., 539 p. 2009.

DORRESTEIN, P. C. **Mass spectrometry of small molecules and natural products**. Natural Product Reports, v. 31, n. 6, p. 704-705, 2014.

DUNCAN, K. R. **Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species**. Chem. Biol. v. 22, n. 4, 460–471, 2015.

DUTTA, S.; SUSHWETA, M.; SUKANYA S., SHATADAL G., PARAMES C. S. **Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer**. Food and Chemical Toxicology, p. 240-255, 2019.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. **Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana***. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, p.1081-1085, 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. 2010.

FRISVAD, F.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T.; SAMSON, R. **Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium***. Stud Mycol, v. 49, p. 201-242, 2004.

GARCIA-ESTRADA, C. **A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *penicillium chrysogenum***. Chem Biol, v. 18, p. 1499–1512, 2011.

GIAQUINTO, P. C.; VOLPATO, G. L. **Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma coruscans***. Acta Ethologica, v. 8, p. 65–69 2005.

GREVE, H. **Fungal metabolites: Structural diversity as incentive for anticancer drug development**. Phytochemistry Reviews, v. 9, p. 537–545, 2010.

GUNATILAKA, A. A. **Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence**. Journal of Natural Products, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B. N. **Antifungal antibiotics** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 58, p. 46–57, 2002.

HANSON, J. R. **Natural Products: The Secondary Metabolites**. 2003

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos**. In In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, 2004.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. **Identification and nomenclature of the genus *Penicillium***, v. 78, p. 343-371, 2014

HUI, L.; JIAN, C.; ZHI-WEI, D.; HUA-RONG, H.; WE-HAN, L. **Secondary metabolites from marine derived fungus *Penicillium terrestre***. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, v. 19, n. 6, p. 482-486, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 120 p. 2019.

ISAH, T. **Anticancer alkaloids from trees: development into drugs**. Pharmacognosy Reviews, v 10, n. 20 p. 90, 2016.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. **A review: natural products from plant associated endophytic fungi**. Journal of Microbiology Biotechnology Research, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KHARWAR, R. N. **Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges** Natural Product Reports, v. 28, p. 1208-1228 2011.

KINGSTON, D. G. I. **Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation**. Journal of Natural Products, v. 74, p. 496–511, 2011

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. L. **An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. AN ENDOPHYTIC FUNGUS ISOLATED FROM *Mauritia flexuosa* L. f.** Quimica Nova, v, 35, n. 4, p. 771-774, 2012.

KOSALKOVÁ, K. **The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium Chrysogenum***. Biochimie, v. 91, p. 214-225, 2009.

KOSALKOVÁ, K. **A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrin in three different *Penicillium roqueforti* strains**. Applied Microbiology and Biotechnology, n. 99, n. 18, p. 7601-7612, 2015.

KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N.; RESHETILOVA, T. A.; SAKHAROVSKY, V. G.; BASKUNOV, B. P.; SELEZNYOV, S. G. **New metabolites of *Penicillium glandicola* var. *glandicola* – glandicolin A and B**. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya 30: 410-414. 1994.

LIMA, E.; ALVEZ, R. F.; ELIA, G. M. A.; ANUNCIACÃO, T. A.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. S.; SOARES, M. B. P.; CARDOZO, M. N. D.; COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; BEZZERRA, D. P. **Antitumor Effect of the Essential Oil from the Leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae)**. Molecules, v. 23, n. 11, p. 2974, 2018.

MADY, M. **The indole alkaloid meleagrin, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 24, n. 2, p. 113-122, 2016.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES FILHO, E. **Dicitrinol, a citrinin dimer, produced by *Penicillium janthinellum***. Helvetica Chimica Acta, v. 94, p. 835-841, 2011.

MARTIN, K. F.; LIRAS, P. **Evolutionary formation of gene clusters by reorganization: the meleagrins/roquefortine paradigm in different fungi.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 1579–1587, 2016.

MENEZES, L. R. A. **Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica do caule de *Xylopia laevigata* (Annonaceae).** Dissertação - Mestrado em Química, Universidade Federal de Sergipe-SE, 2015.

MENG, L. H.; LI, X. M.; LV, C. T.; HUANG, C. G.; WANG, B. G. **Brocazines A–F, Cytotoxic Bisthiodiketopiperazine Derivatives from *Penicillium brocae* MA-231, an Endophytic Fungus Derived from the Marine Mangrove Plant *Avicennia marina*.** *Journal of Natural products*, v. 77, n. 8, p. 1921–1927, 2014.

MOLINARI, G. **Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives.** *Pharmaceutical Biotechnology- Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 655, p.13-27, 2009.

MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C. Y. S.; NAZRE, M. **Vinca Alkaloids,** *International Journal of Preventive Medicine*, v. 4, n. 11, p. 1231–1235, 2013.

MUGISHIMA, T. **Absolute stereochemistry of citrinadins A and B from marine-derived fungus.** *Journal of Organic Chemistry*, v. 70, n. 23, p. 9430-435, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI, M.A. **Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos.** *Infarma*, v. 19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.

NICOLETTI, R.; TRINCONI, A. **Bioactive Compounds Produced by Strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of Marine Origin.** *Mar Drugs*, v. 14, n. 2, p. 1-35, 2016.

NISHANTH, S. K.; NAMBIAN, B.; DILEEP, C. **Three bioactive cyclic dipeptides from the *Bacillus* sp. N strain associated with entomopathogenic nematode.** *Peptides*, v. 53, p. 59–69, 2014.

O'BRIEN, J.; IAN, W., T. O.; FRANÇOIS P. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, C. M. **Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** *Journal of Biosciences*, v. 64, n. 11-12, p. 824-830, 2009.

OLIVEIRA FILHO, J. W. **Cytogenotoxic evaluation of the acetonitrile extract, citrinin and dicitrinin-A from *Penicillium citrinum*.** *DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, p. 1-10, 2020.

OVERY, D. P.; NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. **Roquefortine/oxaline bio- synthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness.** J Chem Ecol, v. 31, p. 2373–2390, 2005.

OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. **Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution**, v. 55, p. 113–128, 2010.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 129 p. 2010.

PERVEEN, I.; RAZA, M. A.; IQBAL, T.; NAZ, I.; SEHAR, S.; AHMED, S. **Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum* ; endophyte of *Ferula sumbul*.** Microbial Pathogenesis, v. 110, p. 214–224, 2017.

PETIT, P.; LUCAS, E. M. F.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, J. A. **Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil.** Electron J Biotechn, v. 12, p. 8–9, 2009.

PIMENTA, E. F. **Use of Experimental Design for the Optimization of the Production of New Secondary Metabolites by Two *Penicillium* Species.** Journal of Natural Products, v. 73, n. 11, p. 1821-1832, 2010.

PINTO, A. C.; SILA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** Química Nova, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** Springer, New York, 2009.

PONGCHAROEN, W. **Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44.** Journal of Natural Products, v. 69, p. 856-858, 2006

PONGCHAROEN, W. **Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14.** Phytochemistry, v. 69, p. 1900-1902, 2008.

PRACHYA, S.; WATTANASIRI, C.; PANSANIT, A. **Cytotoxic endophyte from *Camellia oleifera* Abel - *Penicillium chermesinum* NR121310.** Mycology, p. 1–6, 2019.

QUAGLIA, M.; SANTINELLIA, M.; SULYOKB, M.; ONOFRIA, A.; COVARELLIA, L.; BECCARIA, G. ***Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* species associated with dried date fruits collected in the Perugia (Umbria, Central Italy).** International Journal of Food Microbiology, v. 322, p. 1012, 2020.

QUINN, R. A.; LOUIS, F. N.; OLIVER, V.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI E.; DORRESTEIN, P. C. **Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAGHUNATH, R. **Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungus isolated from *Taxus baccata*.** Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, v.3, p. 342-351, 2012.

RASMUSSEN, R. R.; RASMUSSEN, P. H.; LARSEN, T. O.; BLADT, T. T.; BINDERUP, M. L. ***In vitro* cytotoxicity of fungi spoiling maize silage**. Food and Chemical Toxicology, v. 49, n. 1, p. 31–44, 2011.

ROWAN, D. D. **Lolitrems, peramine and paxilline – mycotoxins of the ryegrass endophyte interaction**. Agriculture, Ecosystem and Environment, v. 44, p.103-122, 1993.

RYAN, L. A. M.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K.; KOEHLER, P. **Detection and Quantitation of 2,5-Diketopiperazines in Wheat Sourdough and Bread**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 20, p. 9563–9568, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites**. Mycological Research, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SILVA, G. H. **Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae)**. Química Nova, v. 33, n. 10, p. 2038-2041, 2010.

SILVA, M. M.; **A Simple Defined Medium for the Production of True Diketopiperazines in *Xylella fastidiosa* and Their Identification by Ultra-Fast Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry**. Molecules, v. 22, n. 6, p. 1-15, 2017.

STARK, T.; HOFMANN, T. **Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*)**. J. Agric. Food Chem., v. 53, p. 7222–7231, 2005.

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

STROBEL, G. A. **Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons**. Natural Product Reports, v. 31, p. 259-272, 2014.

SUDHA, V. **Biological properties of Endophytic Fungi**. Brazilian Archives of Biology and Technology., Curitiba, v. 59, 2016.

SUDO, K.; SUDO, K.; KONNO, K.; SHIGETA, S.; YOKOTA, T. **Inhibitory effects of podophyllotoxin derivatives on Herpes simplex virus replication**. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, v. 9, p. 263-267, 1998.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J. M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann K. Editor. Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. London: Academic Press, p. 71–133, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. **Total de páginas: ex: 501 p.**

TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: A rich source of functional metabolites**. Natural Product Reports, v. 18, p. 448-459, 2001.

TOR, E. R.; PUSCHNER, B. P.; FILIGENZI, M. S.; TIWARY, A. K.; POPPENGA, R. H. **LC-MS/MS Screen for Penitrem A and Roquefortine C in Serum and Urine Samples.** Analytical Chemistry, v. 78, p. 4624-4629, 2006.

TSUDA, M. **Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*.** Org Lett, v. 6, n. 18, p. 3087-3089, 2004.

TUNES, L. G.; GONCALVES, V. N.; BUENO, D. N.; ZANI, C. L.; ROSA, L. H.; COTA, B. B. **Diketopiperazine alkaloids produced by the endophytic fungus *Penicillium citrinum* and evaluation of their antileishmanial activity.** African Journal of Microbiology Research, v. 13, n. 28, p. 562-567, 2019.

USUI, T. **Pharmaceutical prospects of phytoestrogens.** Endocrine Journal, v. 53, p. 7-20, 2006.

VERMA, V.C.; LOBKOVSKY, E.; GANGE, A.G.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. **Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L.** The Journal of Antibiotics, v. 64, p. 427-431, 2011.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Quimica Nova, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2006.

VINOKUROVA, N. G.; BOÏCHENKO, L. V.; ARINBASAROV, M. U. **Formation of alkaloids from *Penicillium* species fungi during growth on wheat kernels.** Prikl. Biokhim. Mikrobiol., v. 39, p. 457-460, 2003.

VISAGIE, C. M. ***Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from in house dust samples collected around the world.** Studies in Mycology 78:63–139, 2014.

VISAMSETTI, A.; RAMACHANDRAN, S. S.; KANDASAMY, D. ***Penicillium chrysogenum* DSOA associated with marine sponge (*Tedania anhelans*) exhibit antimycobacterial activity.** Microbiological Research, v. 185, p. 55-60, 2016.

WANG, C.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; HE, X. **Cytotoxic Indole Alkaloids against Human Leukemia Cell Lines from the Toxic Plant *Peganum harmala*.** Toxins, 7(11), 4507–4518, 2015.

WANG, M. **Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data With Global Natural Products Social Molecular Networking.** Nature Biotechnology, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WANG, N.; CUI, C. B.; LI, C. W. **A new cyclic dipeptide penicimutide: the activated production of cyclic dipeptides by introduction of neomycin-resistance in the marine-derived fungus *Penicillium purpurogenum* G59.** Archives of Pharmacal Research, v. 39, n. 6, p. 762–770, 2016.

XIE, Z. L., LI, H. J.; WANG, L. Y.; LIANG, W. L.; LIU, W.; LAN, W. J. **Trichodermaerin, a new diterpenoid lactone from the marine fungus *Trichoderma erinaceum* associated with the sea star *Acanthaster planci*.** Natural Product Communications, v. 8, n. 1, p. 67-68, 2013.

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

YOSHIHARA, T.; KOSHINO, S. T. H.; SAKAMURA, S.; SHIMANUKI, T.; SATO, T.; TAJIMI, A. **Three fungitoxic cyclopentanoid sesquiterpenes from stromata of *Epichloe typhina*.** Tetrahedron Letters, v. 26, p. 5551-5554, 1985.

ZHANG, B. J.; TENG, X. F.; BAO, M. F.; ZHONG, X. H.; NI, L.; CAI, X. H. **Cytotoxic indole alkaloids from *Tabernaemontana officinalis*.** Phytochemistry, v. 120, p. 46–52, 2015.

8. APÊNDICE

Figura 42. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio arroz.

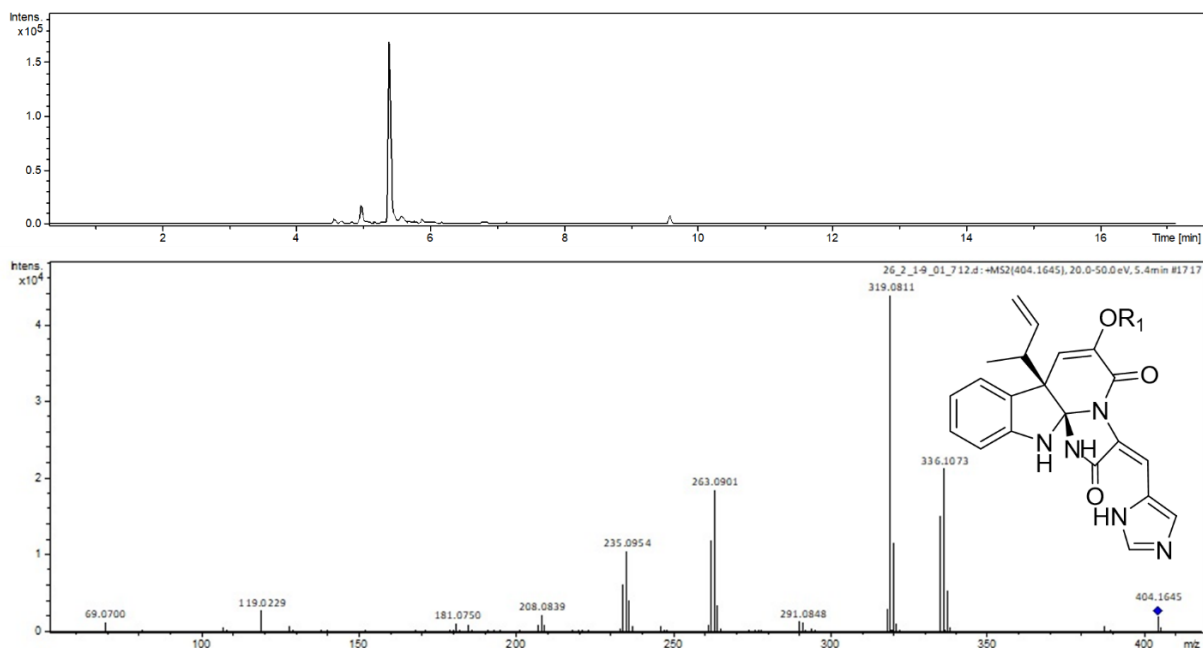


Figura 43. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio arroz.

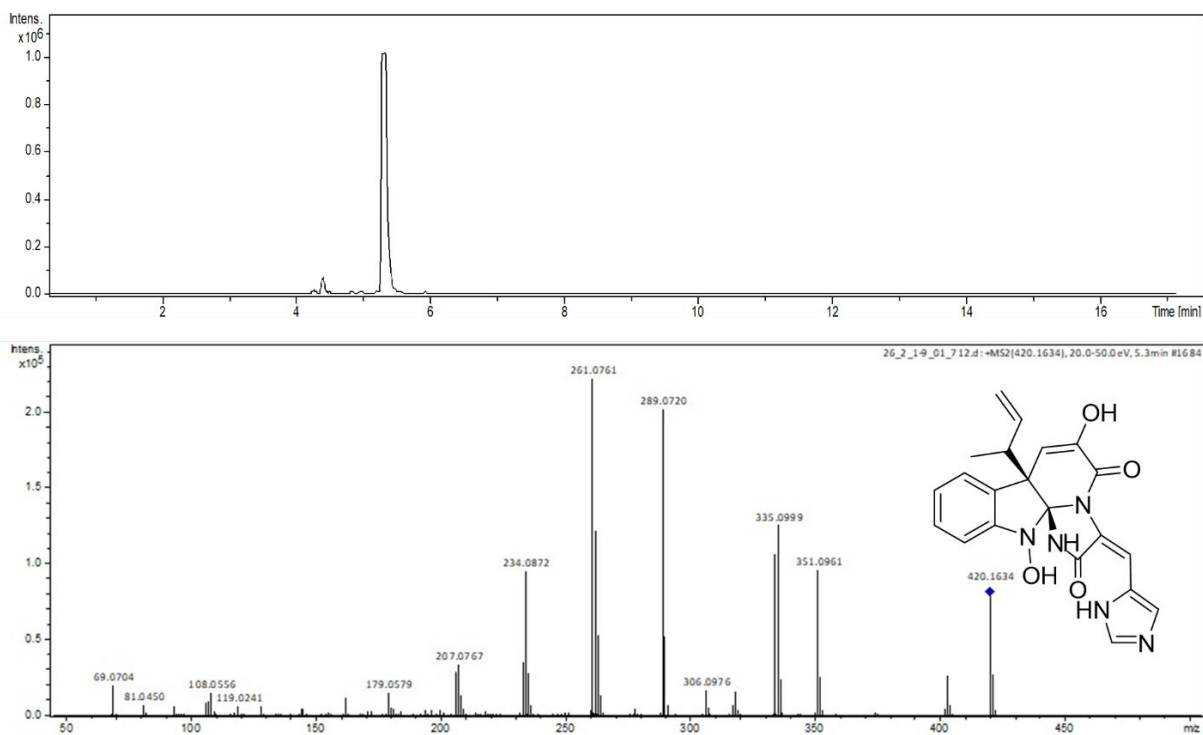


Figura 44. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do Oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio arroz.

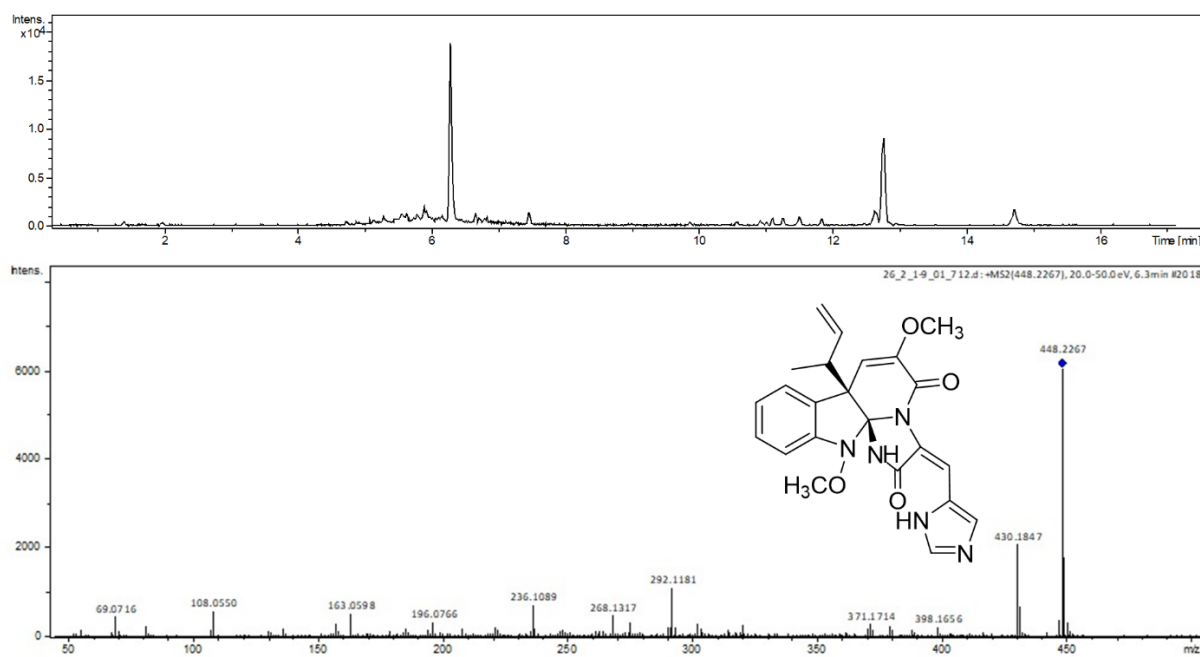


Figura 45. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio arroz.

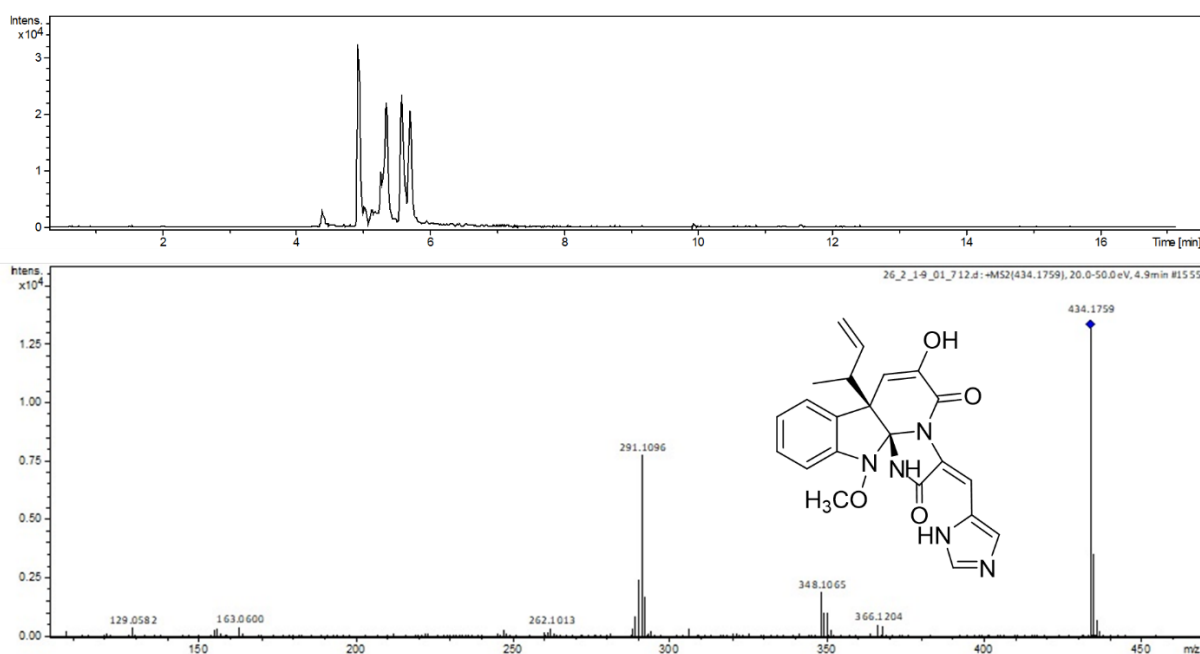


Figura 46. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio arroz.

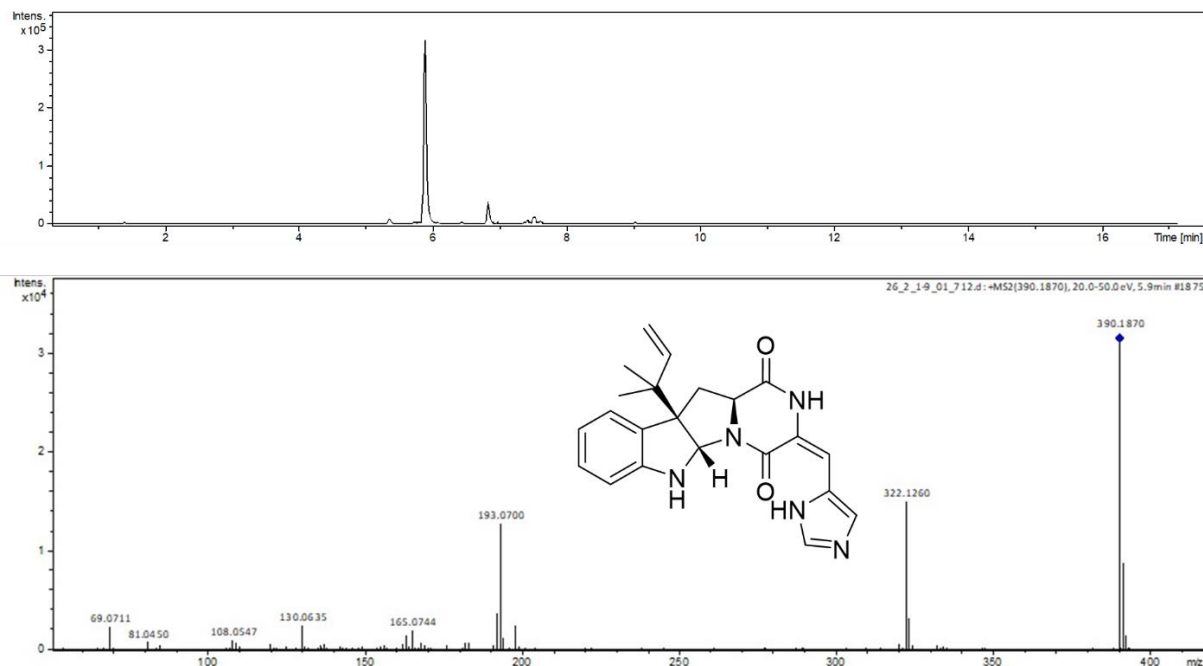


Figura 47. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio arroz.

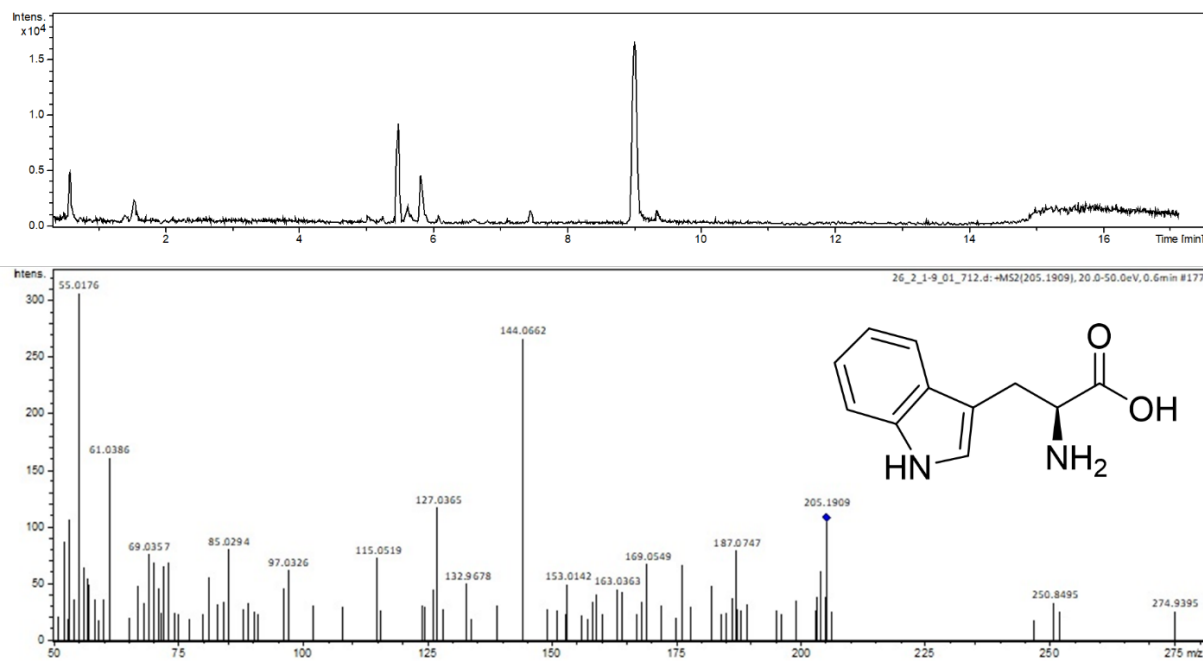


Figura 48. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (**9**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

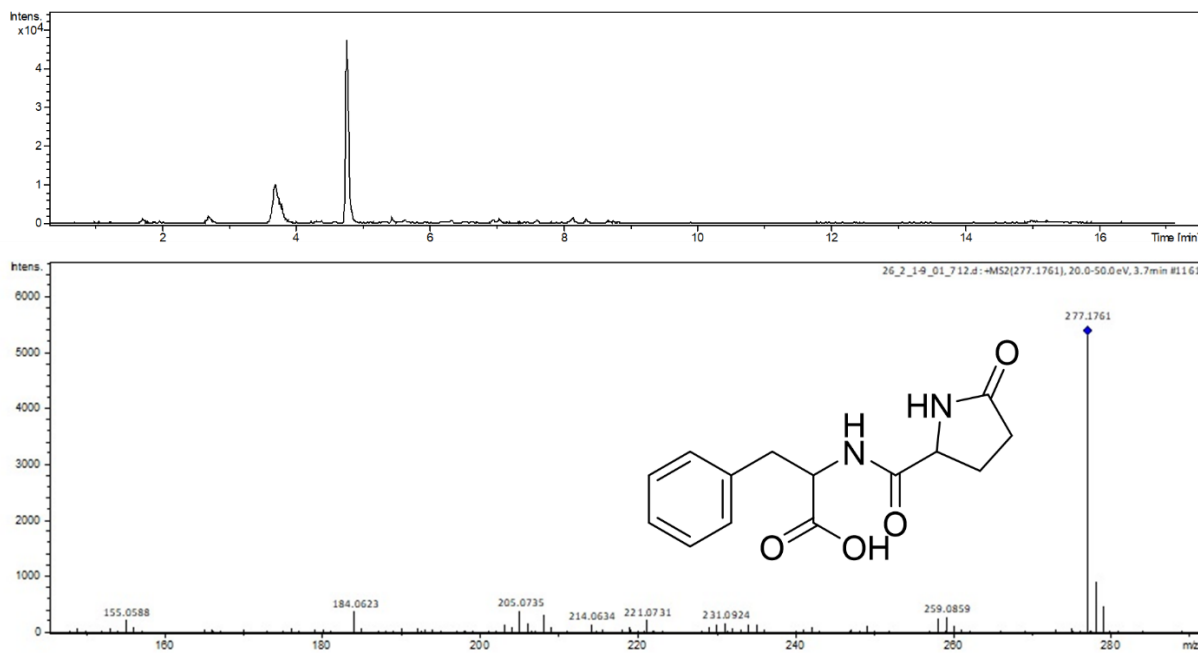


Figura 49. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da Ciclo L-prolina-L-valina (**11**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

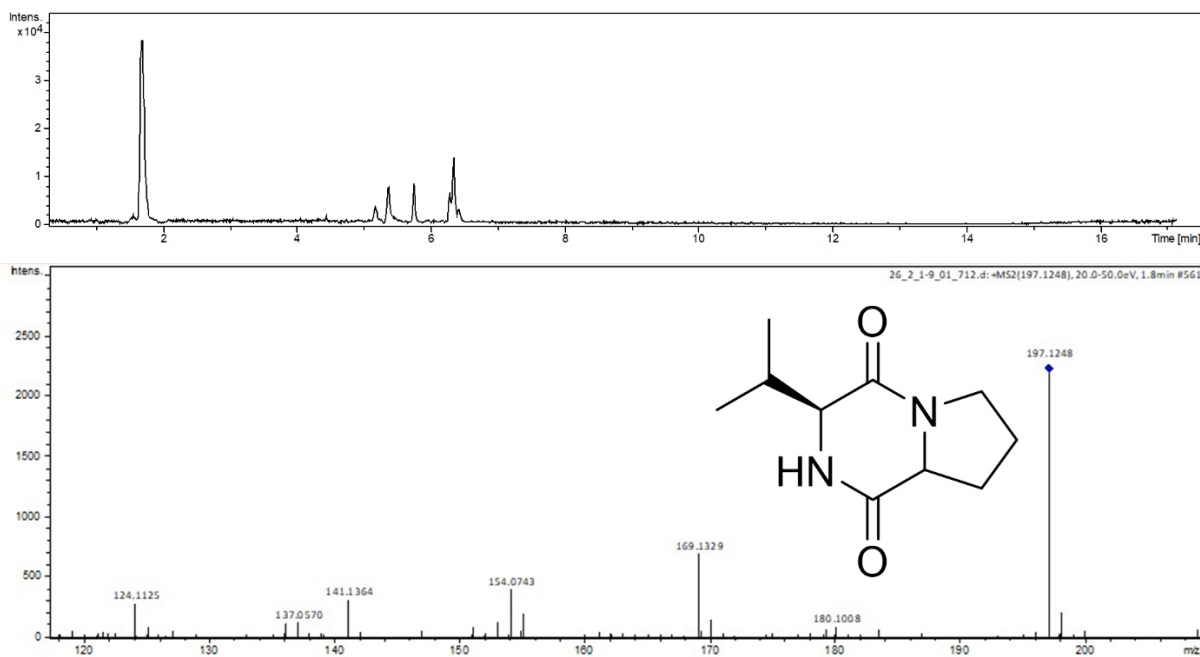


Figura 50. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (**12**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

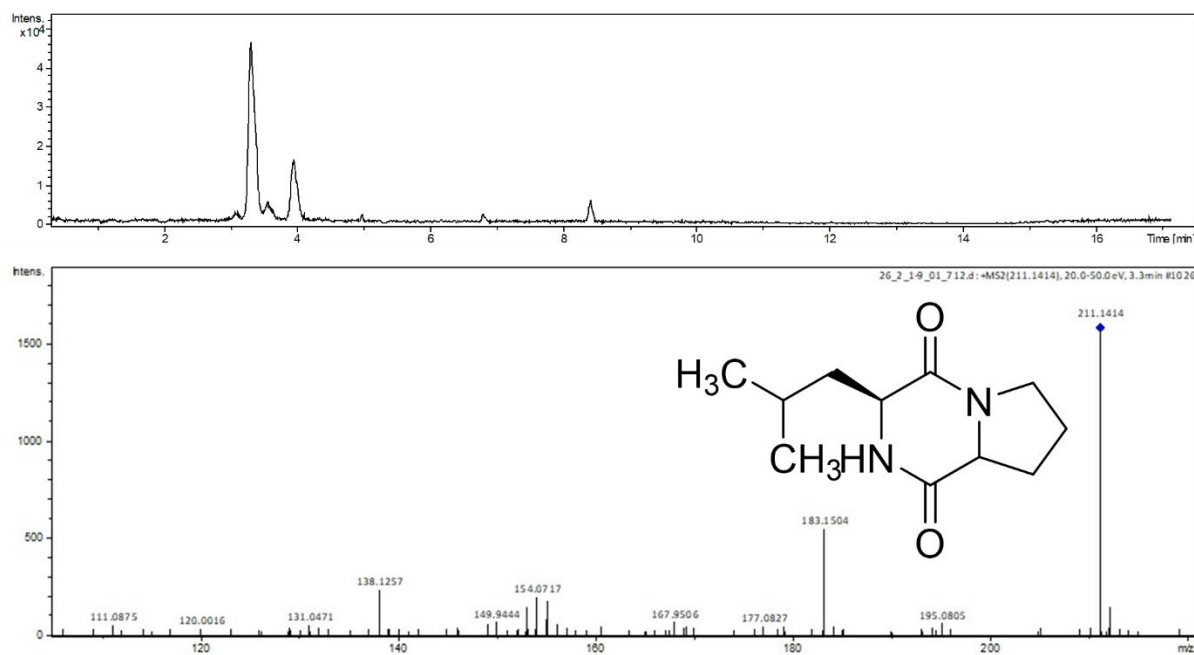


Figura 51. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina (**13**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

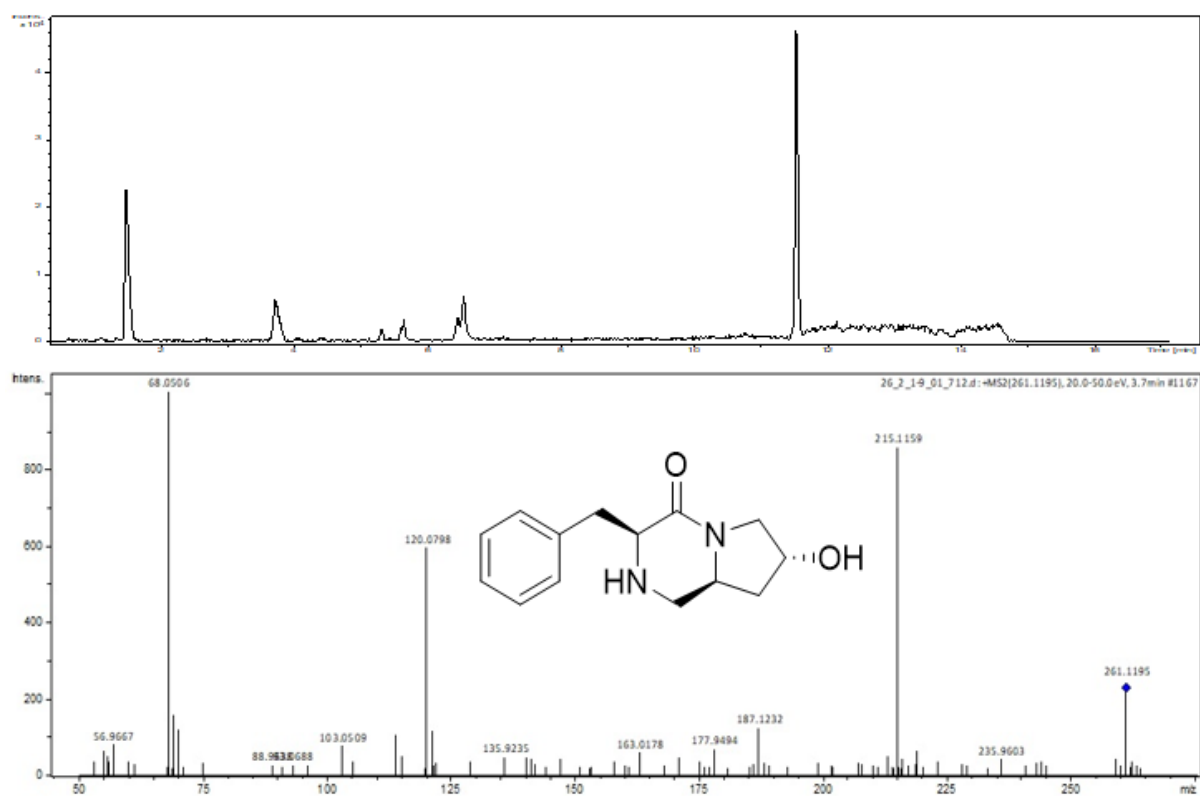


Figura 52. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-D-prolina (**15**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

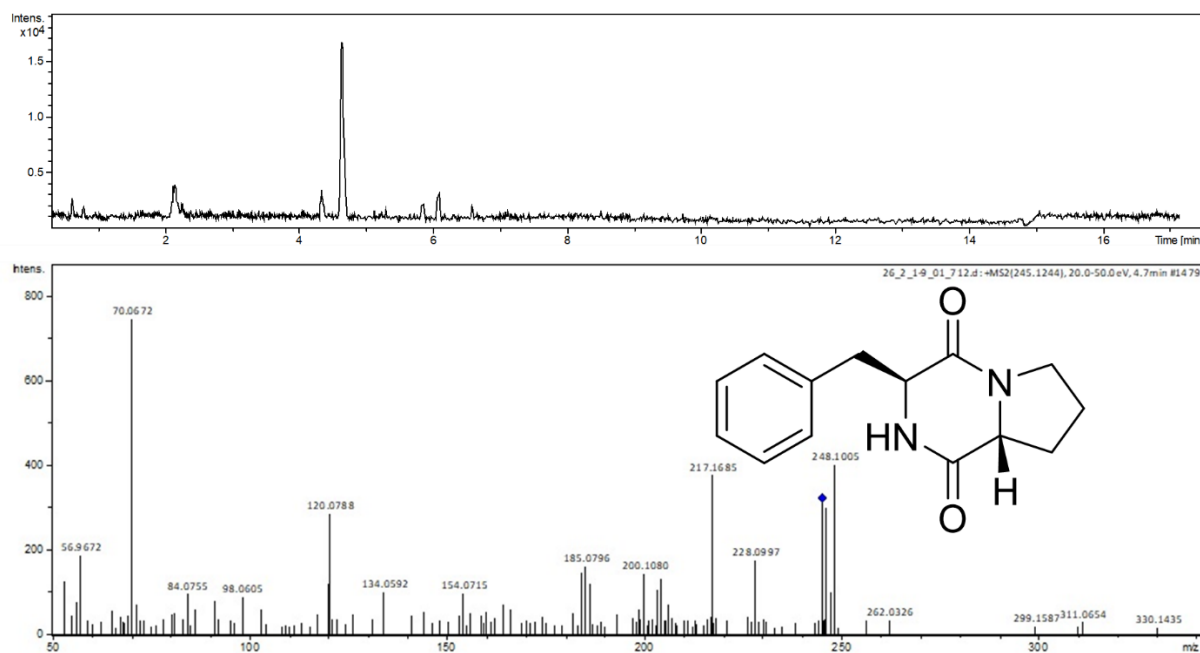


Figura 53. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilamina-leucina (**16**) obtido do extrato preparado em meio arroz.

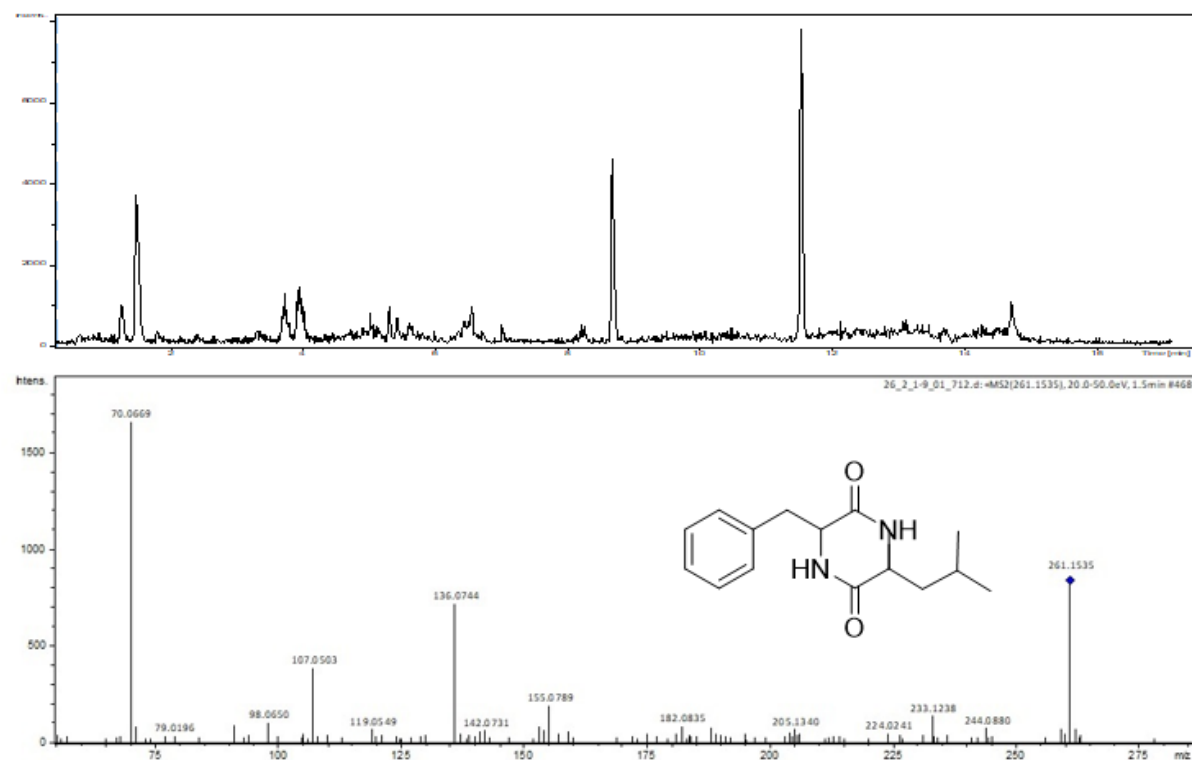


Figura 54. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio aveia.

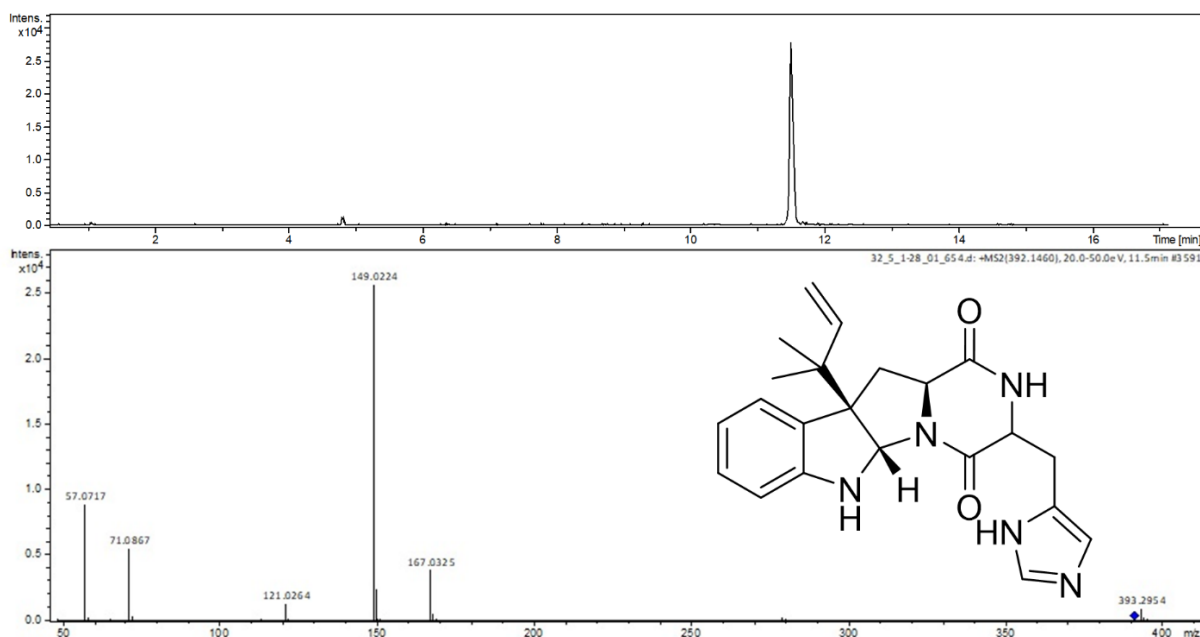


Figura 55. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio aveia.

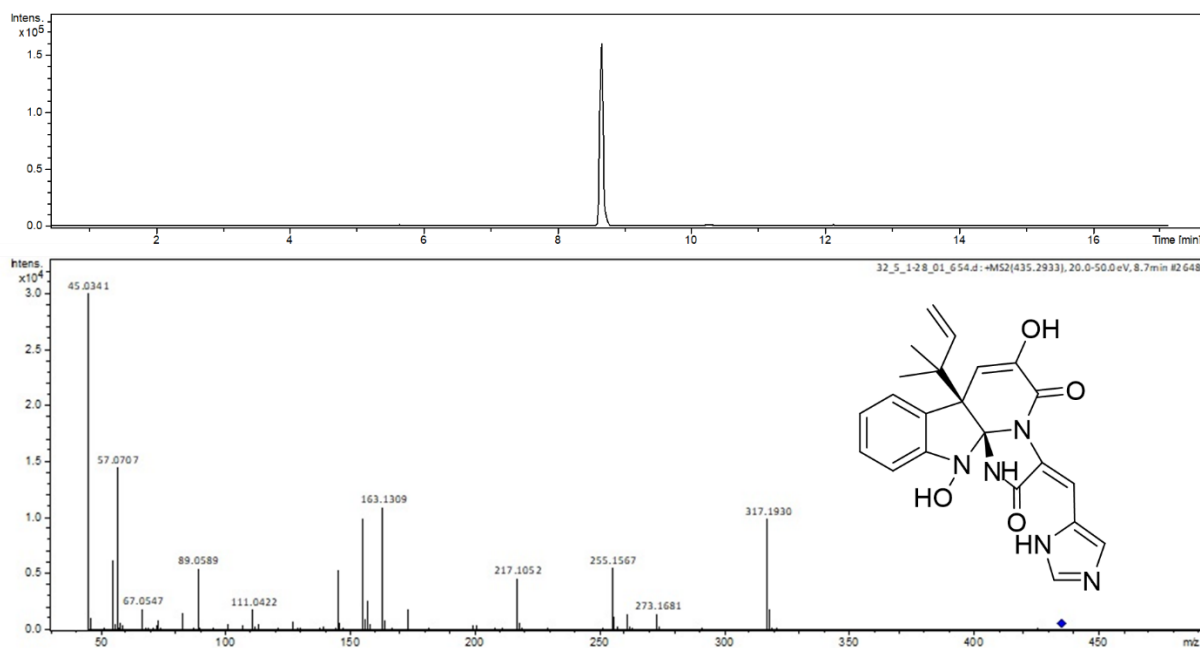


Figura 56. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) do piruglutamil-fenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio aveia.

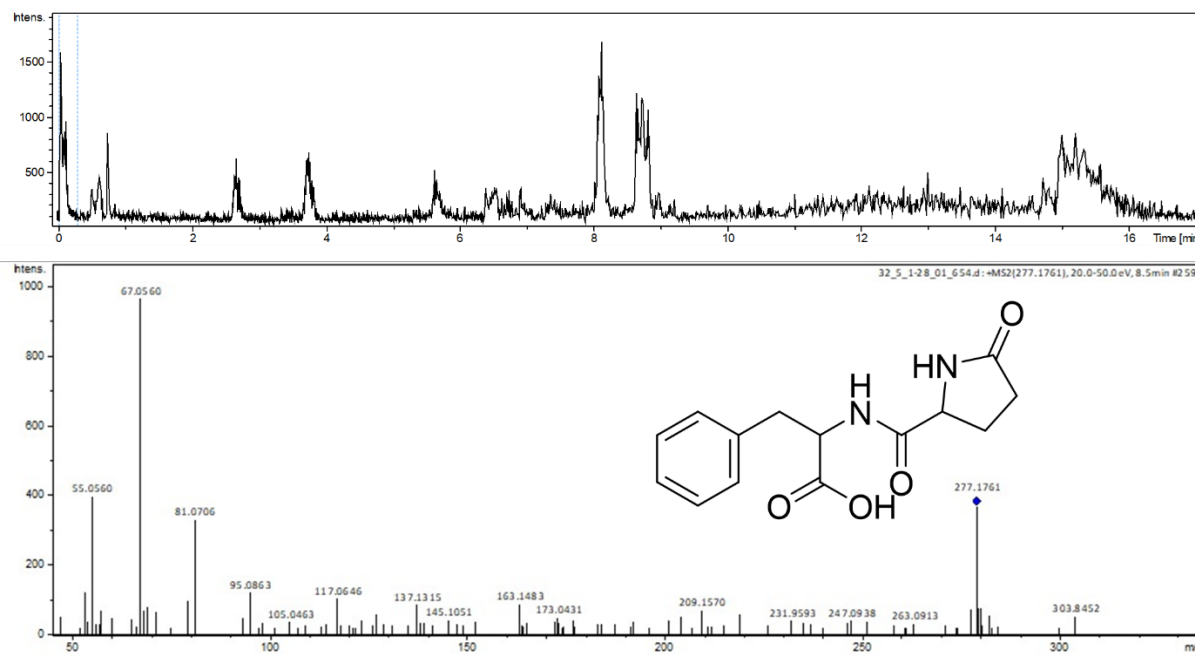


Figura 57. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio aveia.

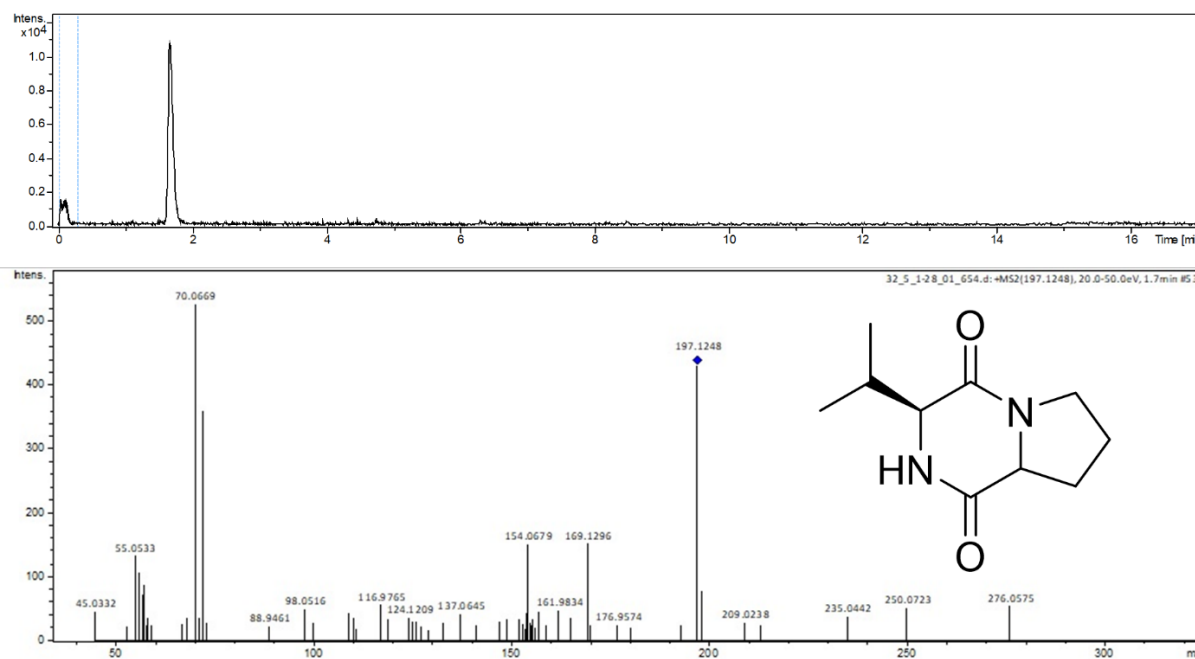


Figura 58. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina) (**13**) obtido do extrato preparado em meio aveia.

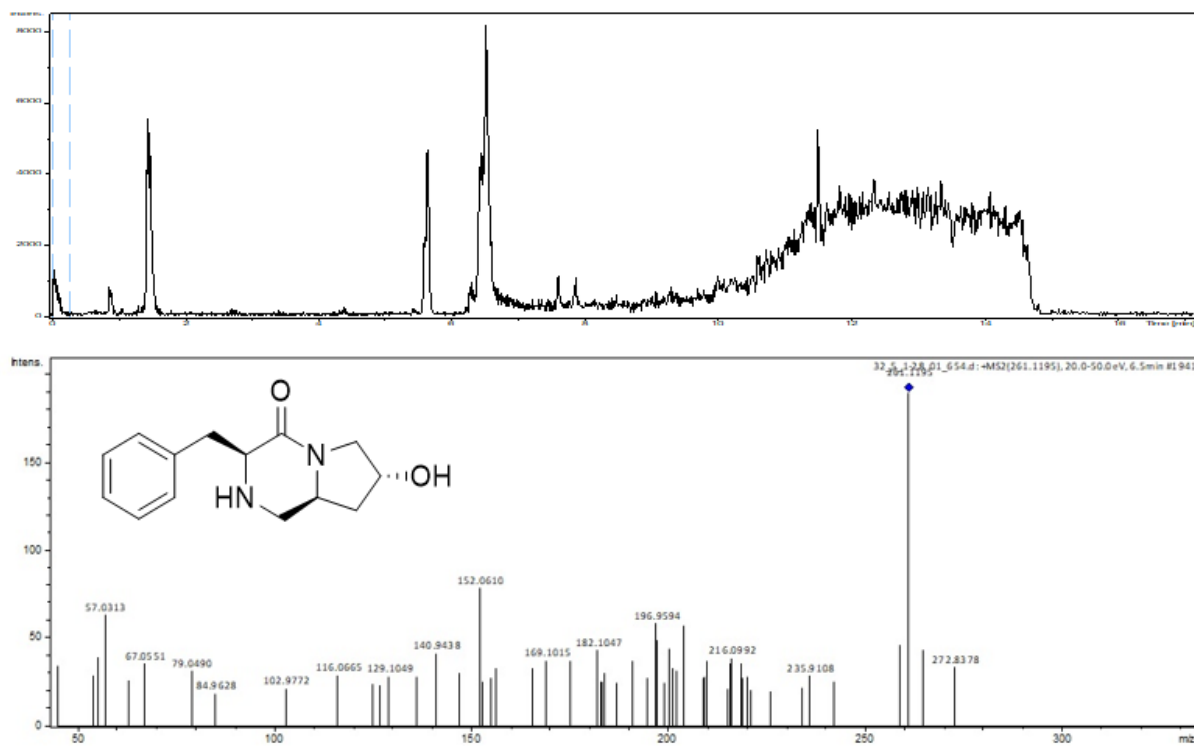


Figura 59. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-D-prolina (**15**) obtido do extrato preparado em meio aveia.

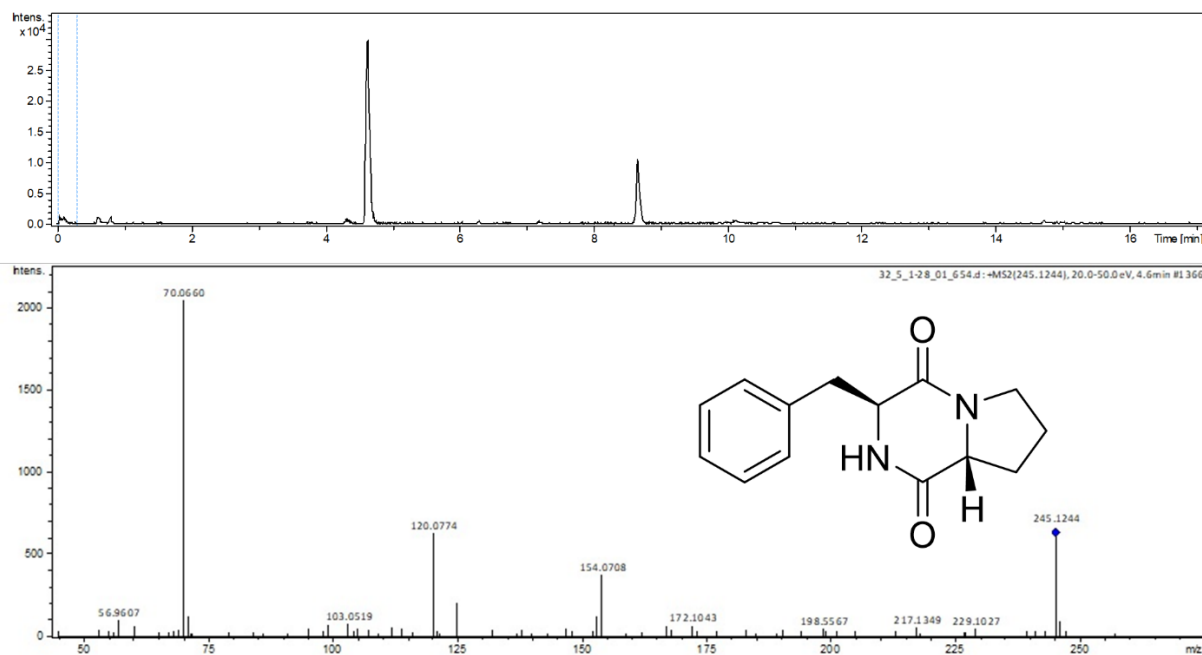


Figura 60. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-fenilalanina-L-leucina (**16**) obtido do extrato preparado em meio aveia.

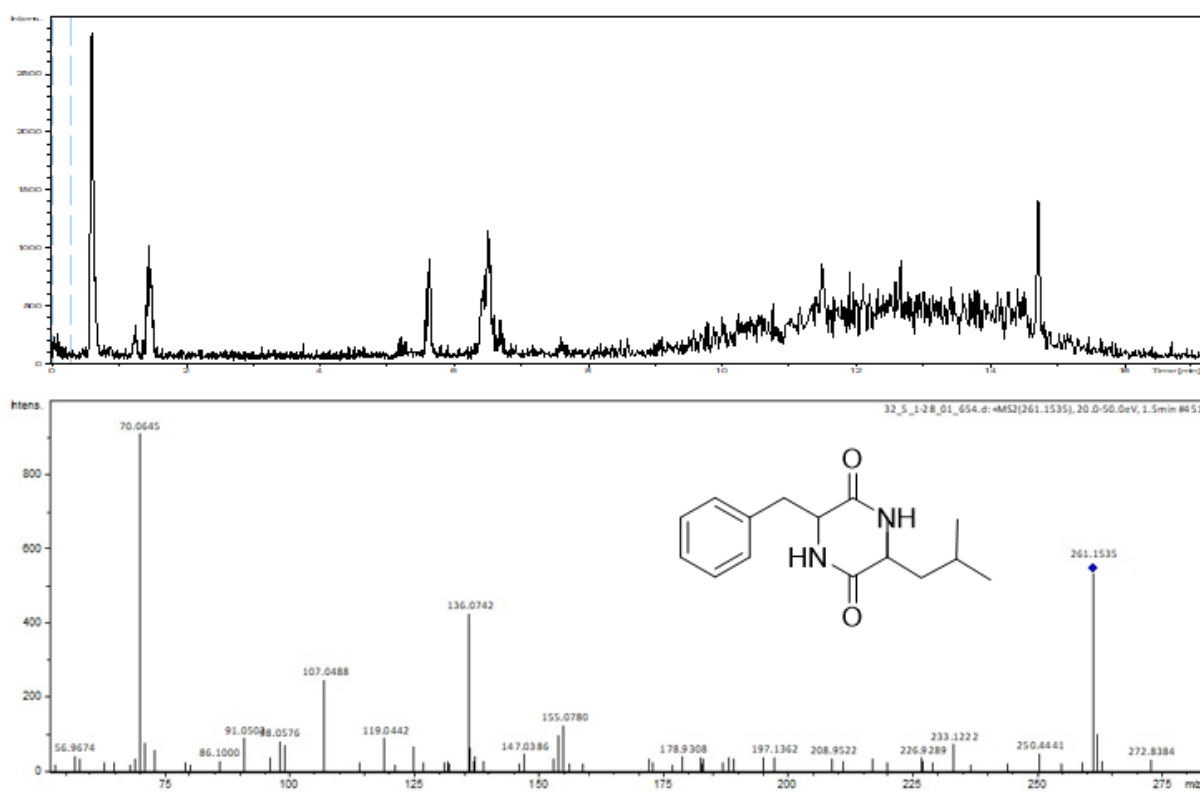


Figura 61. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (**1**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

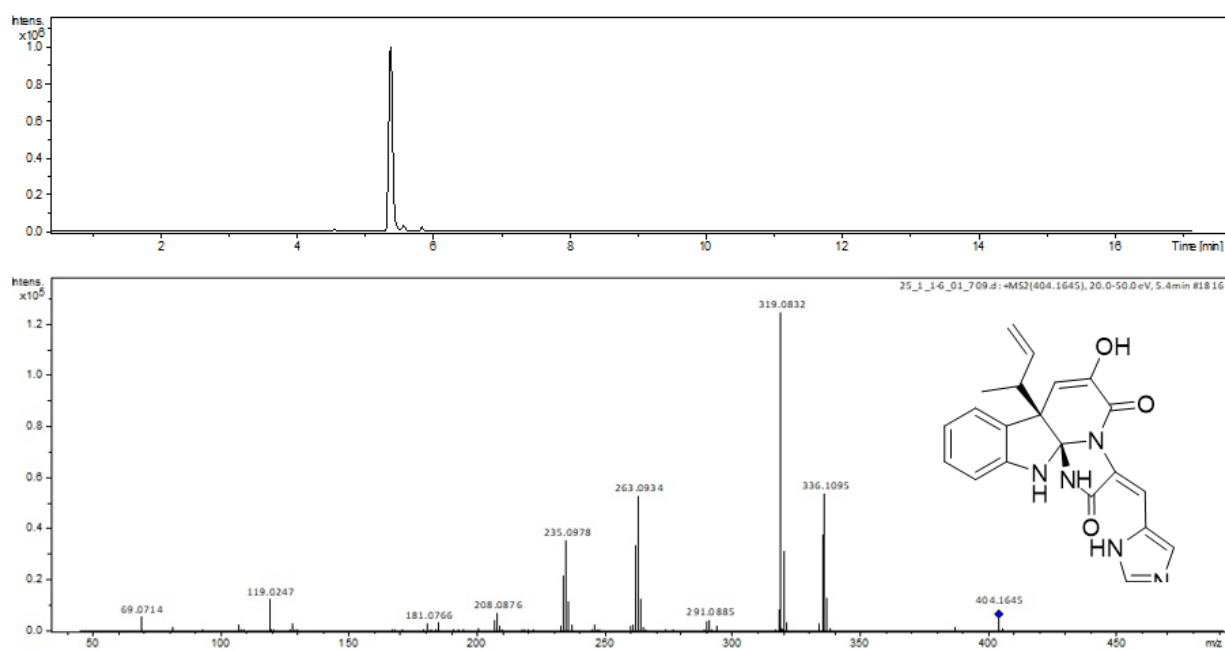


Figura 62. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio canjica.

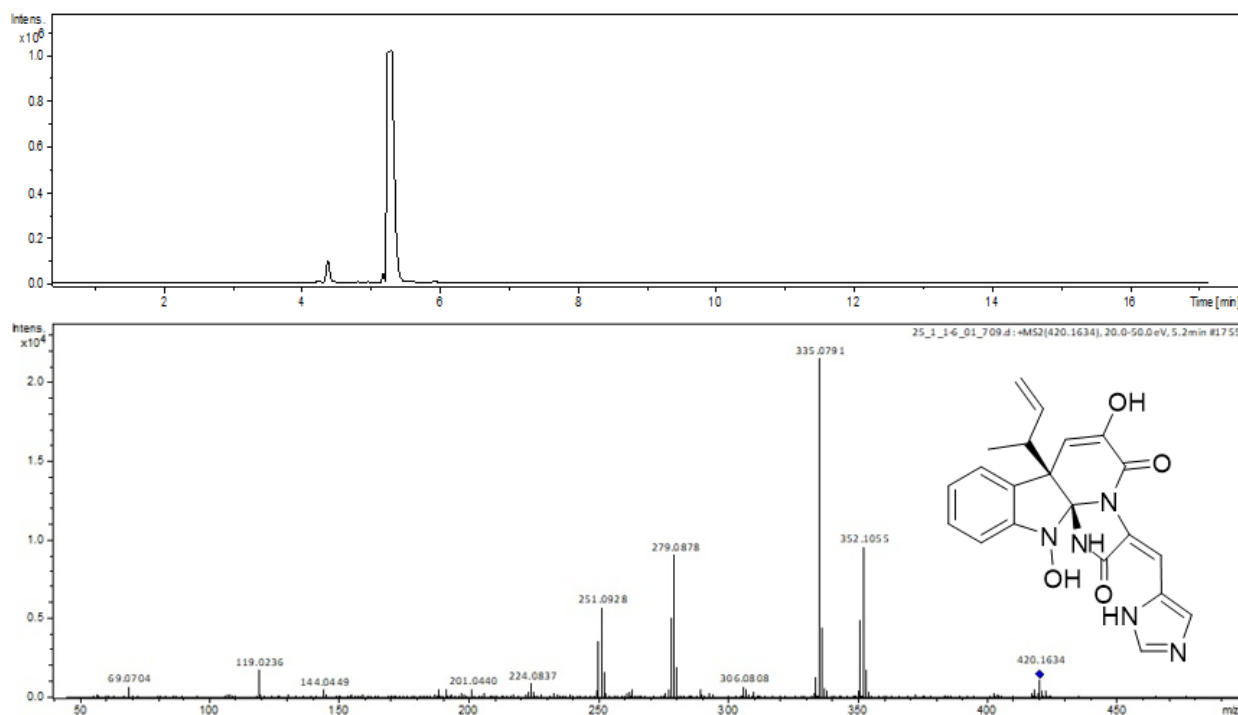


Figura 63. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio canjica.

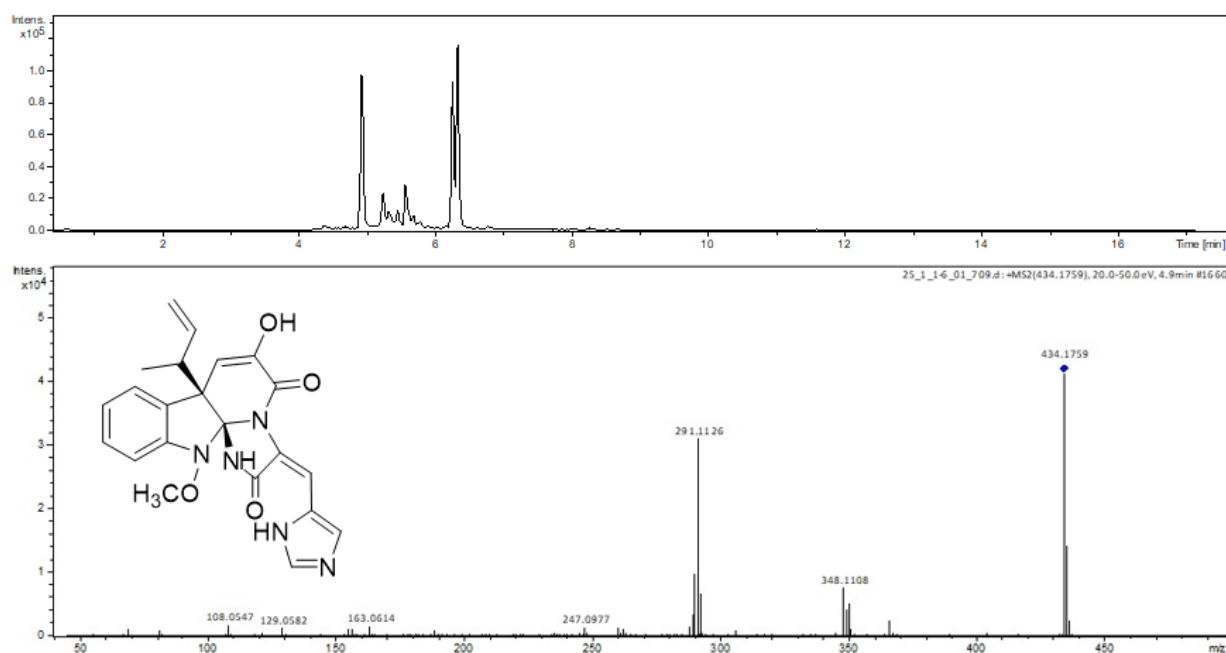


Figura 64. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio canjica.

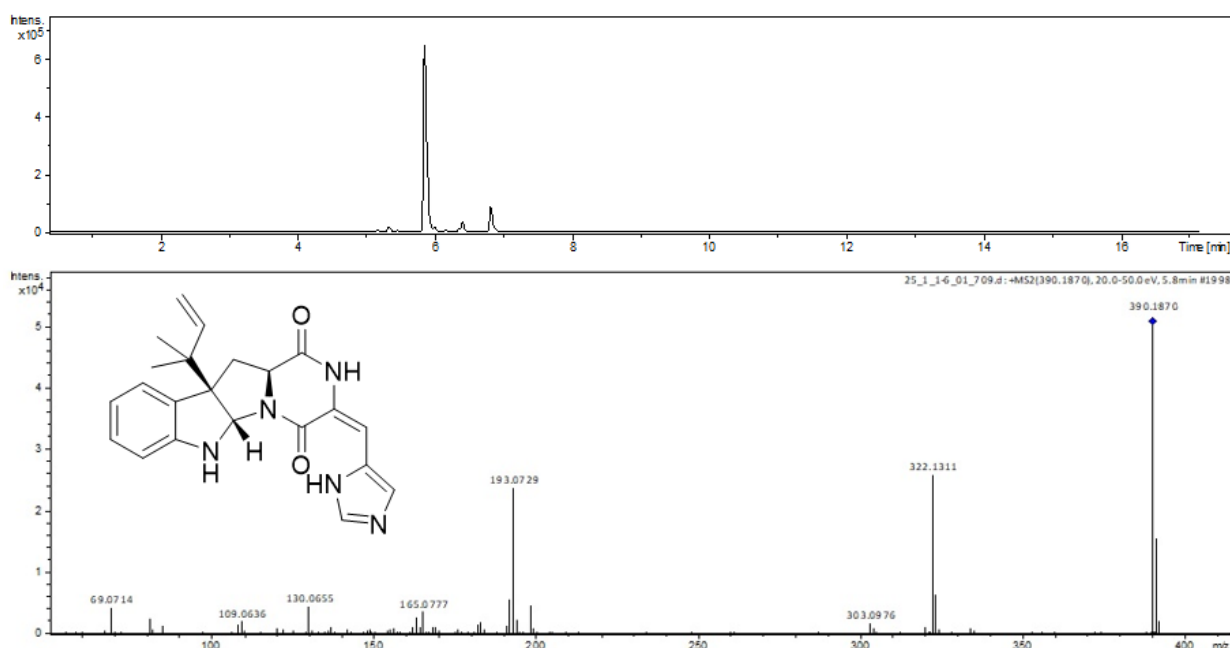


Figura 65. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio canjica.

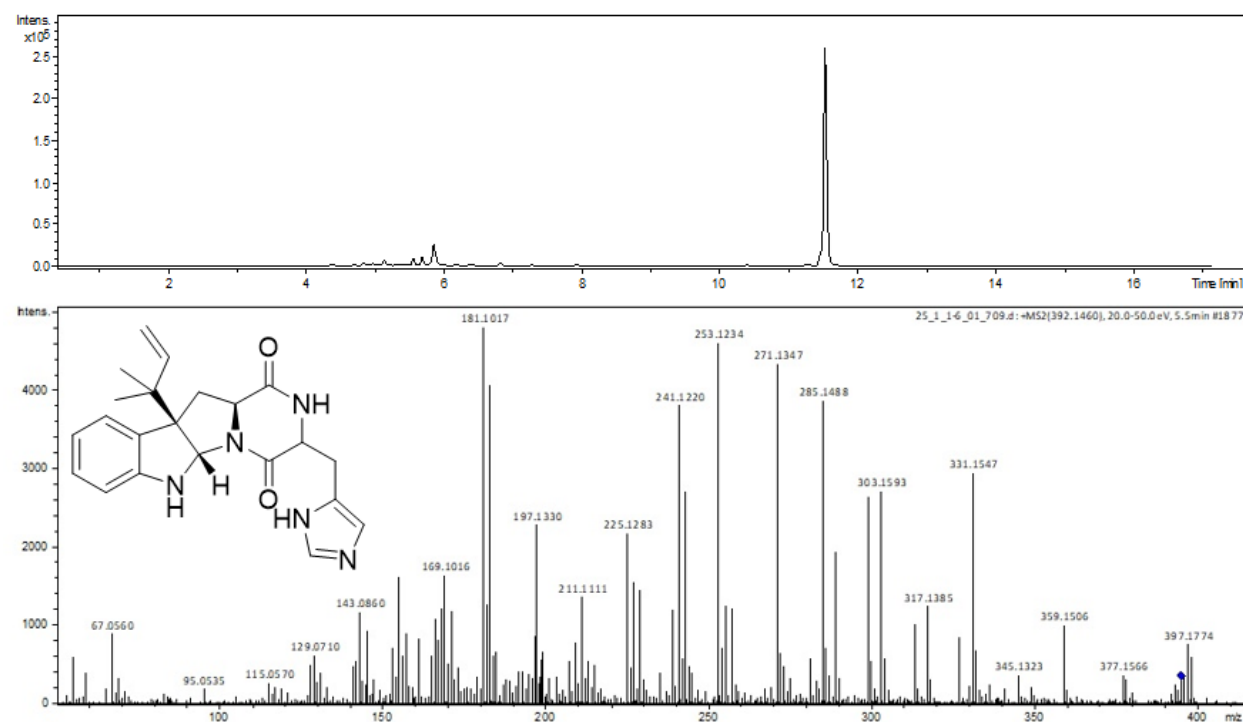


Figura 66. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (**8**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

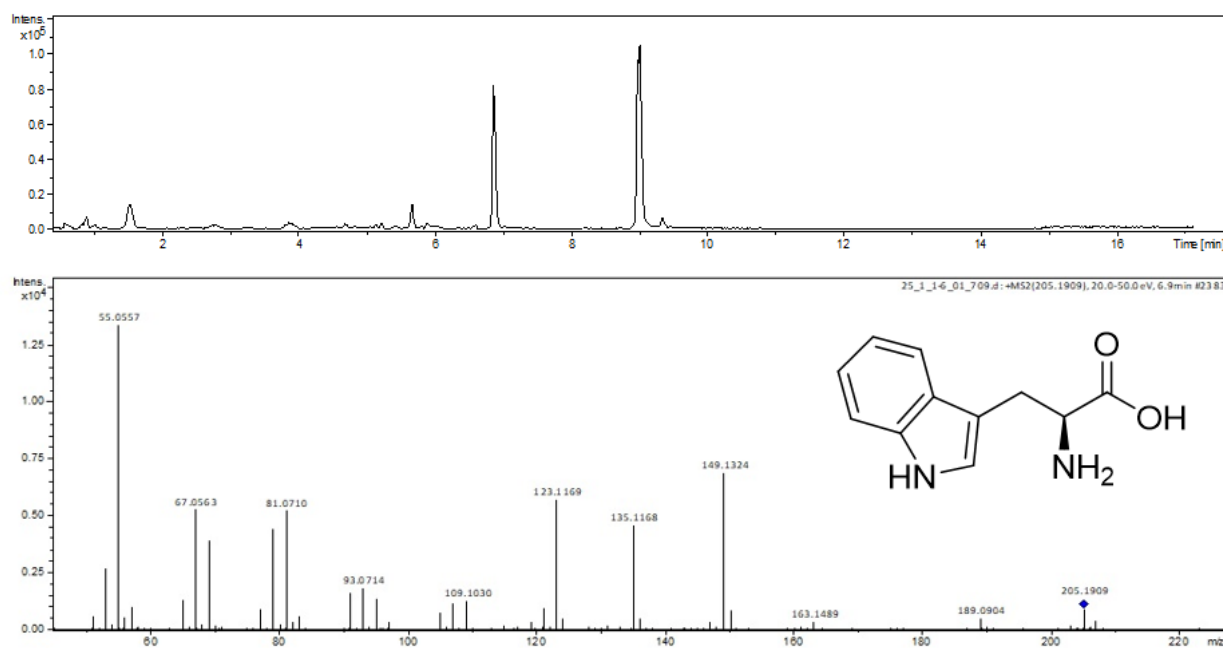


Figura 67. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamil-fenilalanina (**9**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

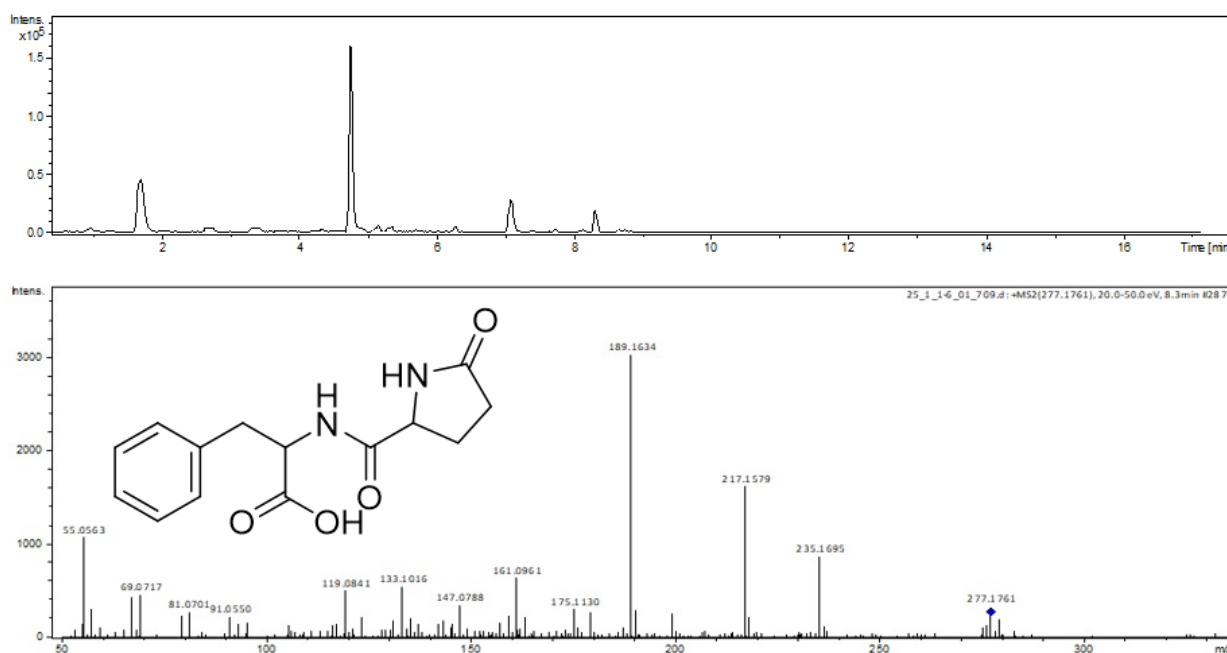


Figura 68. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (**10**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

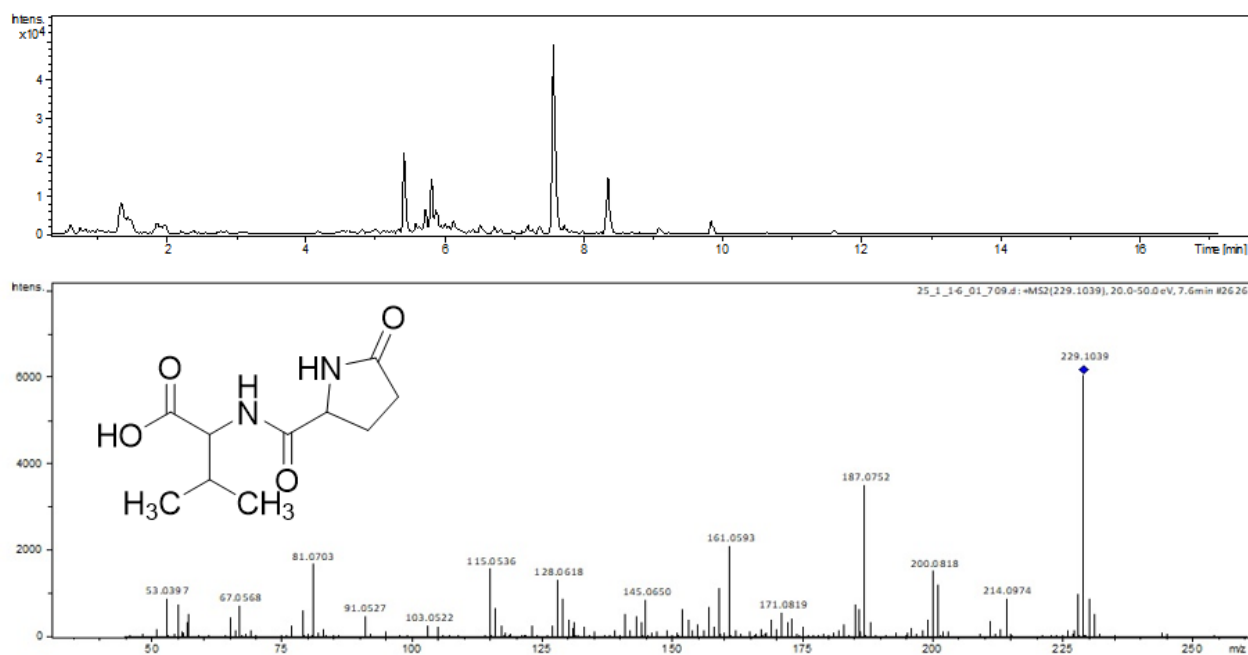


Figura 69. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (**11**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

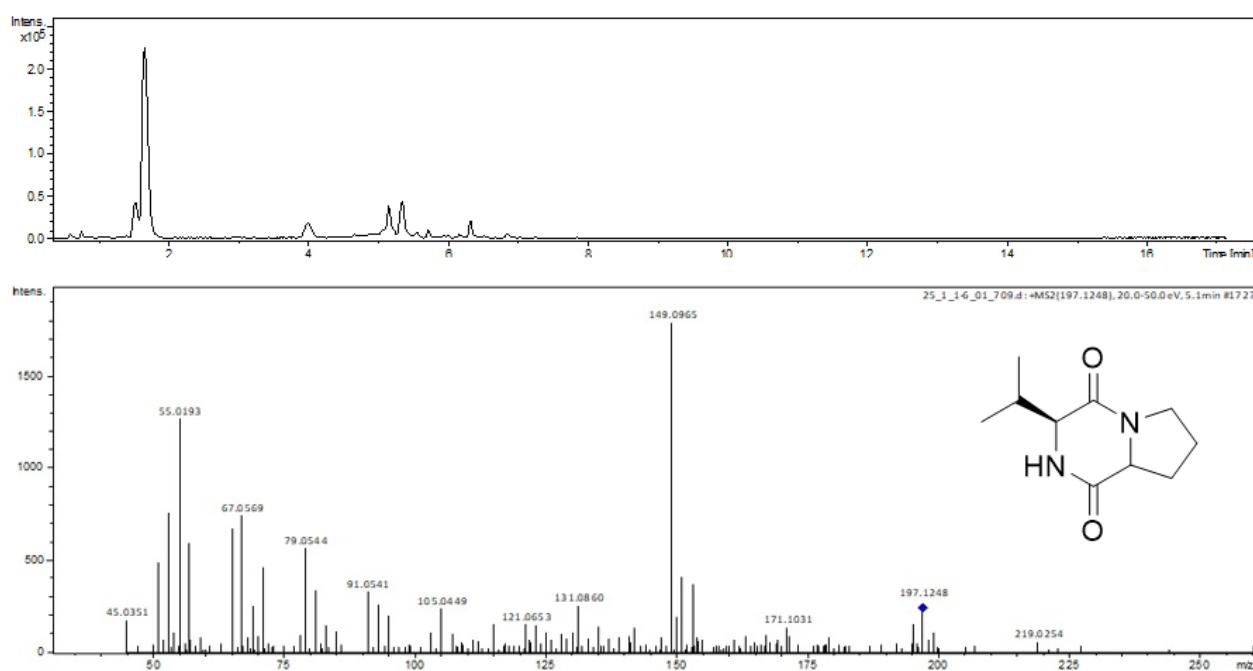


Figura 70. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (**12**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

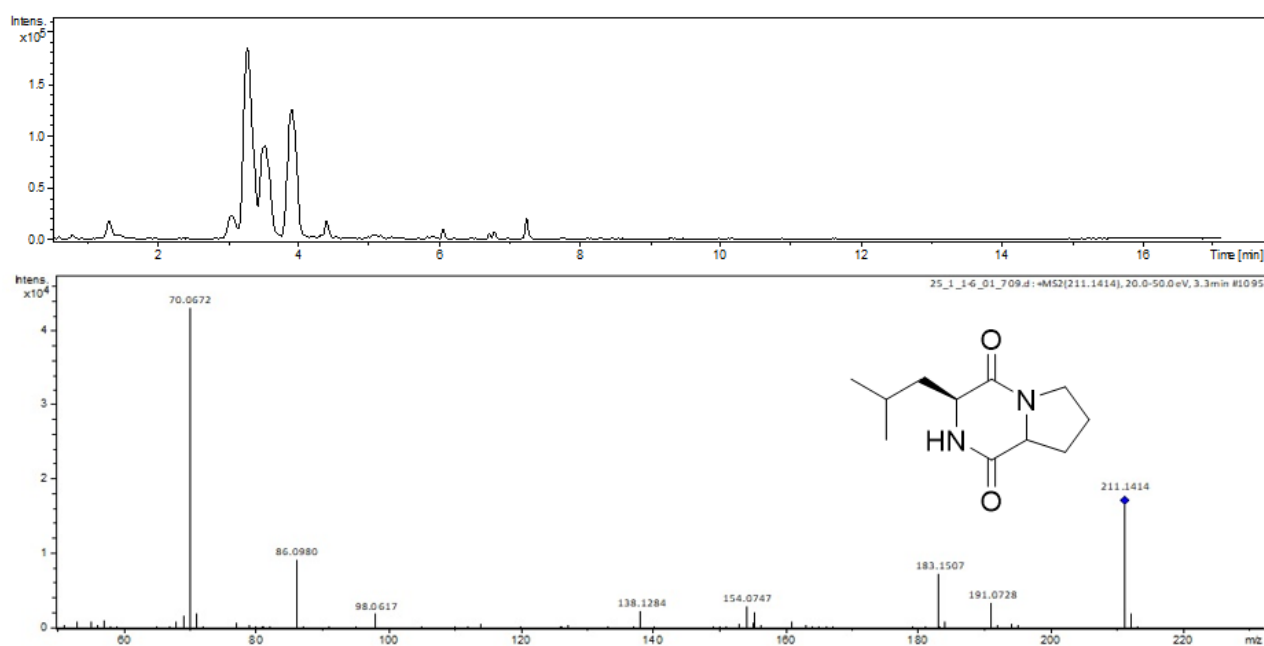


Figura 71. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (**13**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

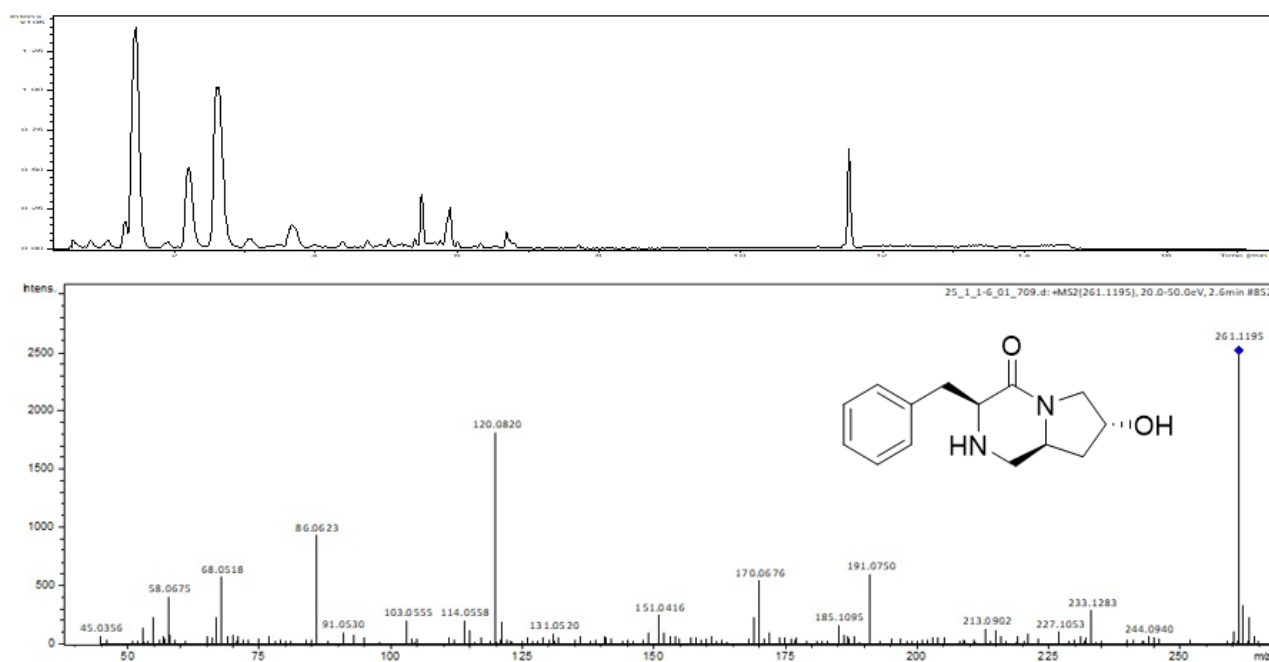


Figura 72. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio canjica.

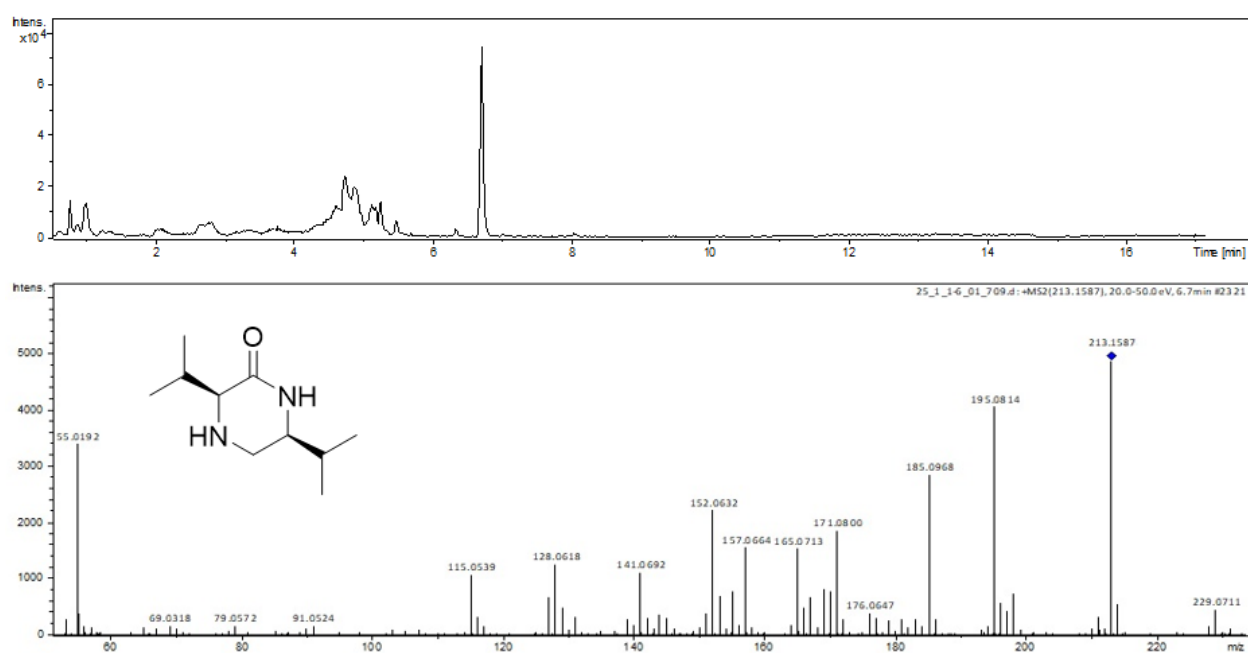


Figura 73. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio canjica.

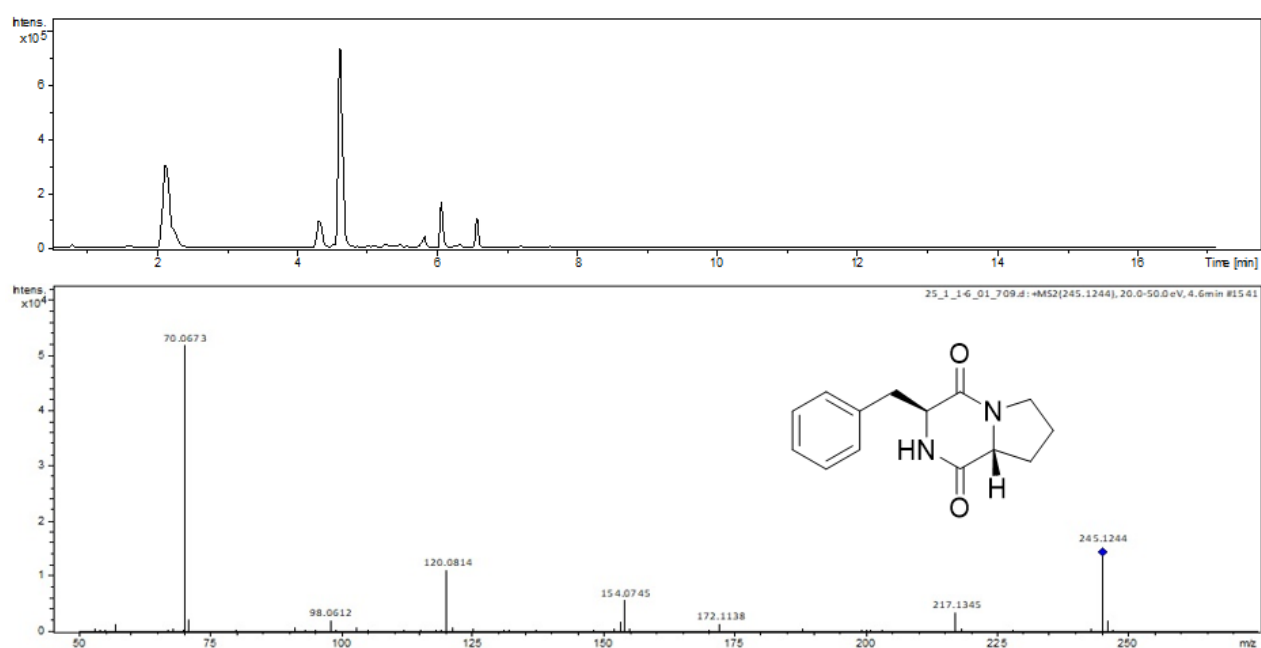


Figura 74. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (**16**) obtido do extrato preparado em meio canjica.

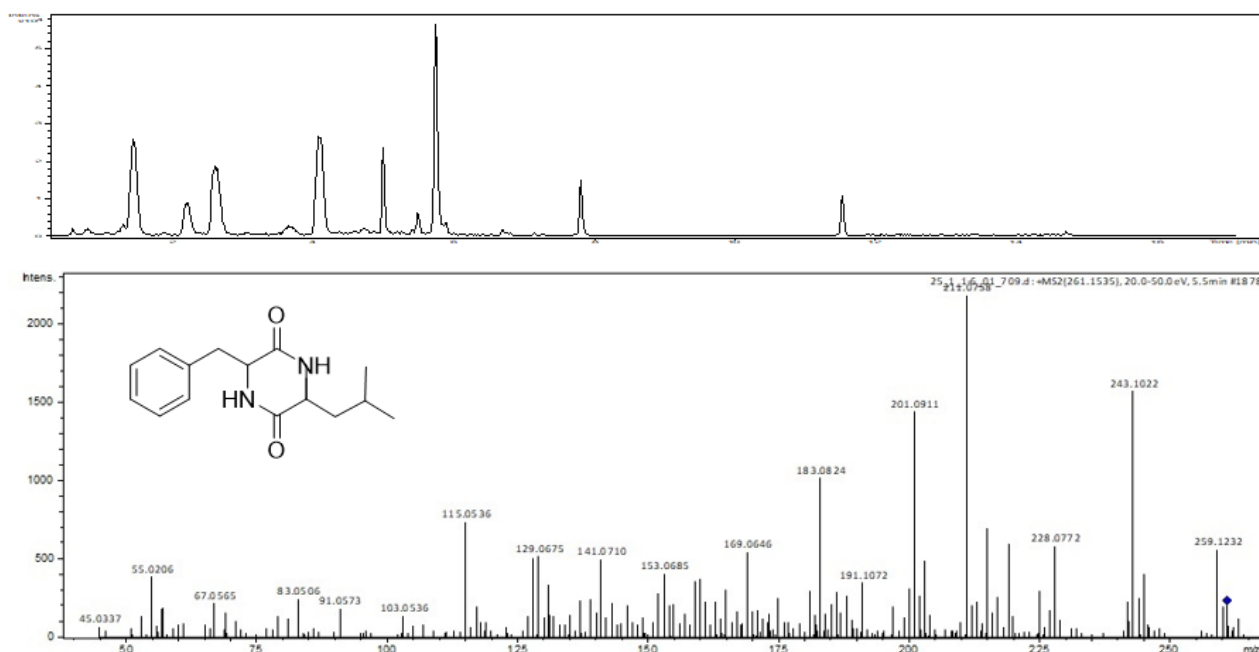


Figura 75. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (**1**) obtido do extrato preparado em meio sucrlho.

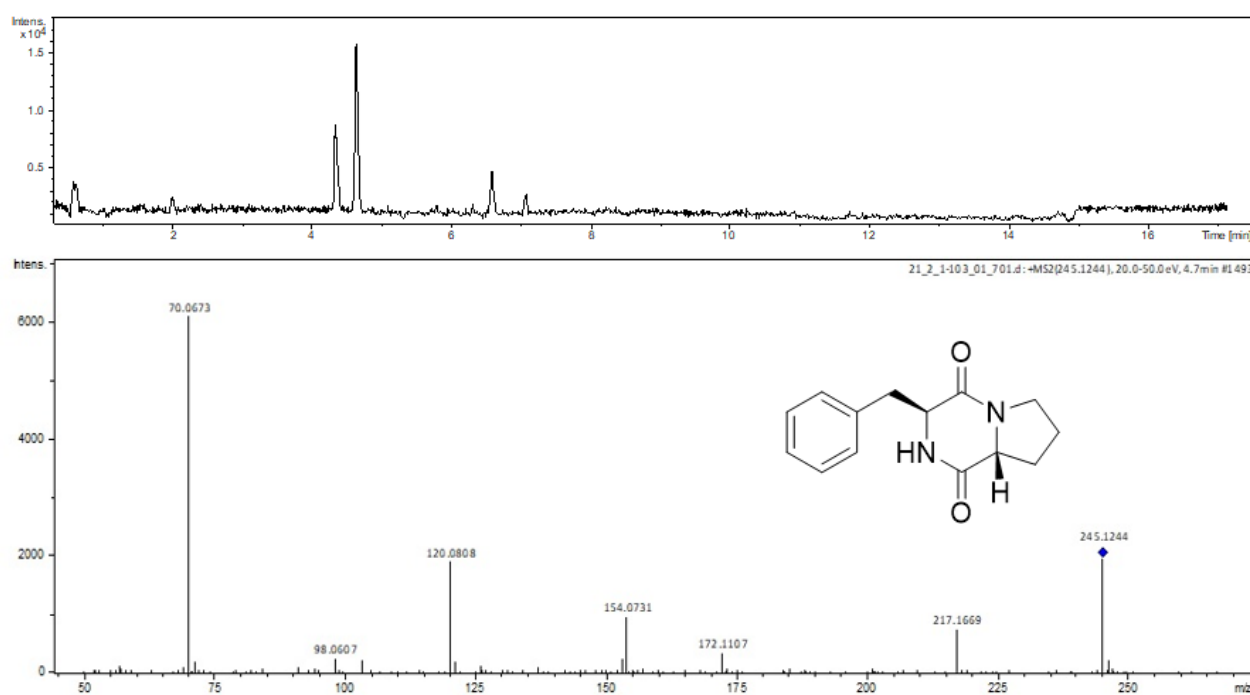


Figura 76. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio sucralho.

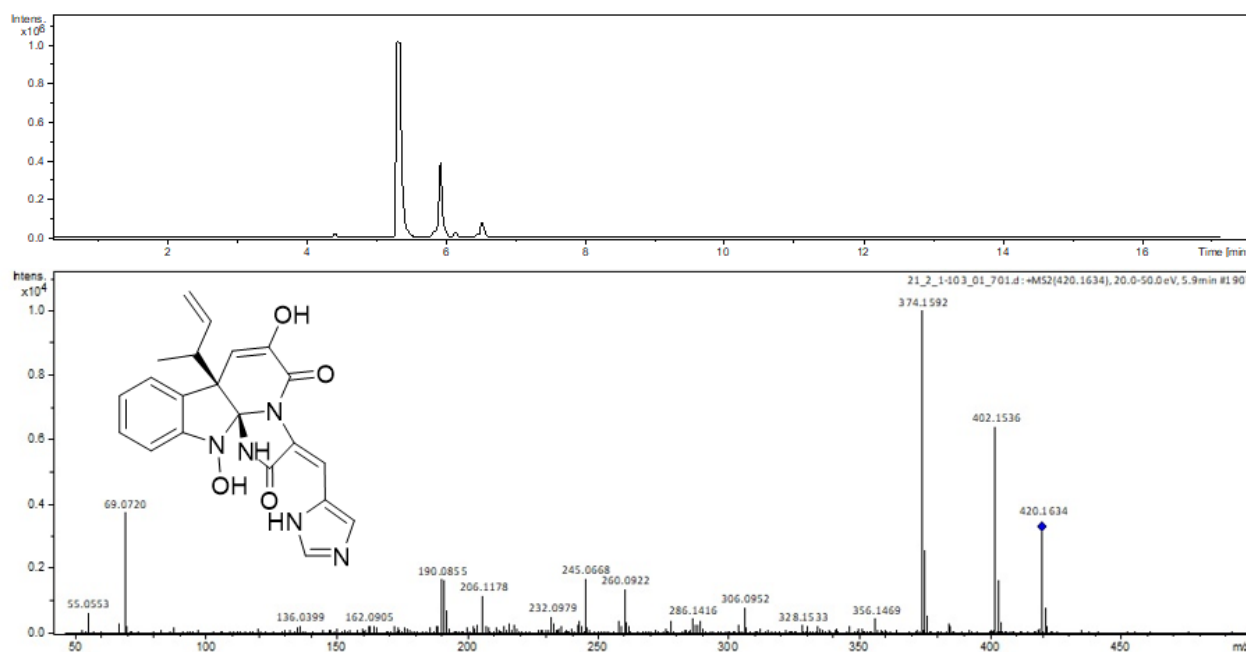


Figura 77. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio sucralho.

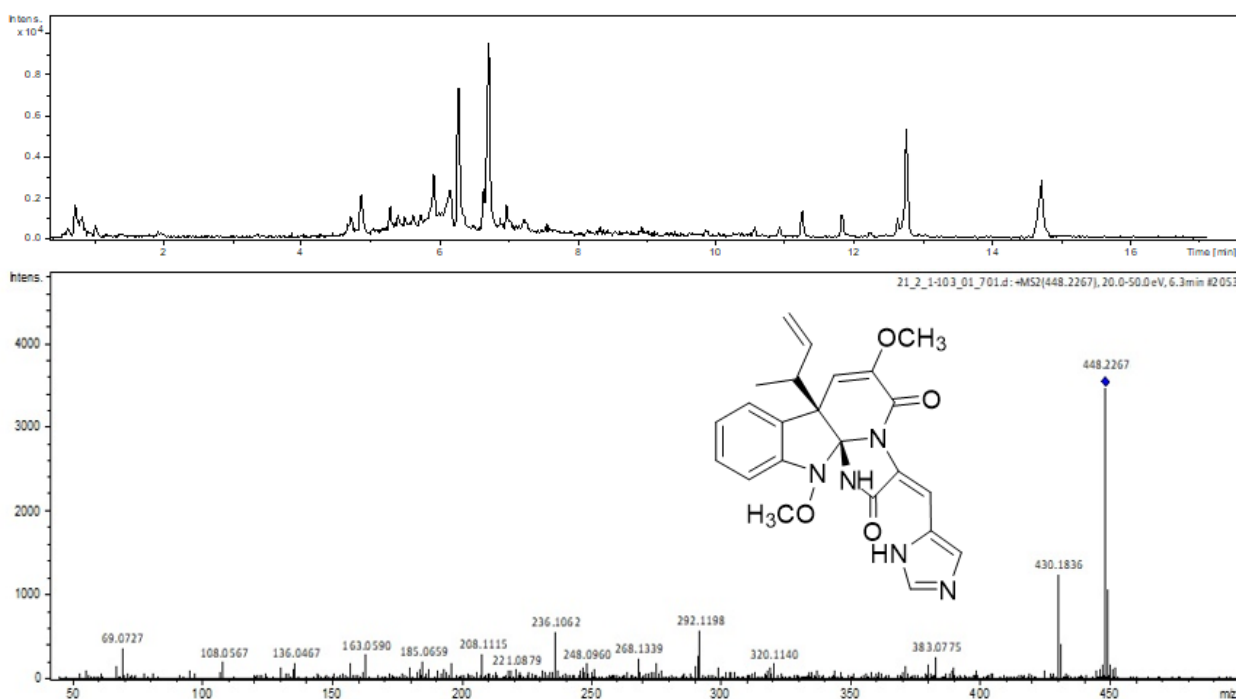


Figura 78. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (**4**) obtido do extrato preparado em meio sucrílio.

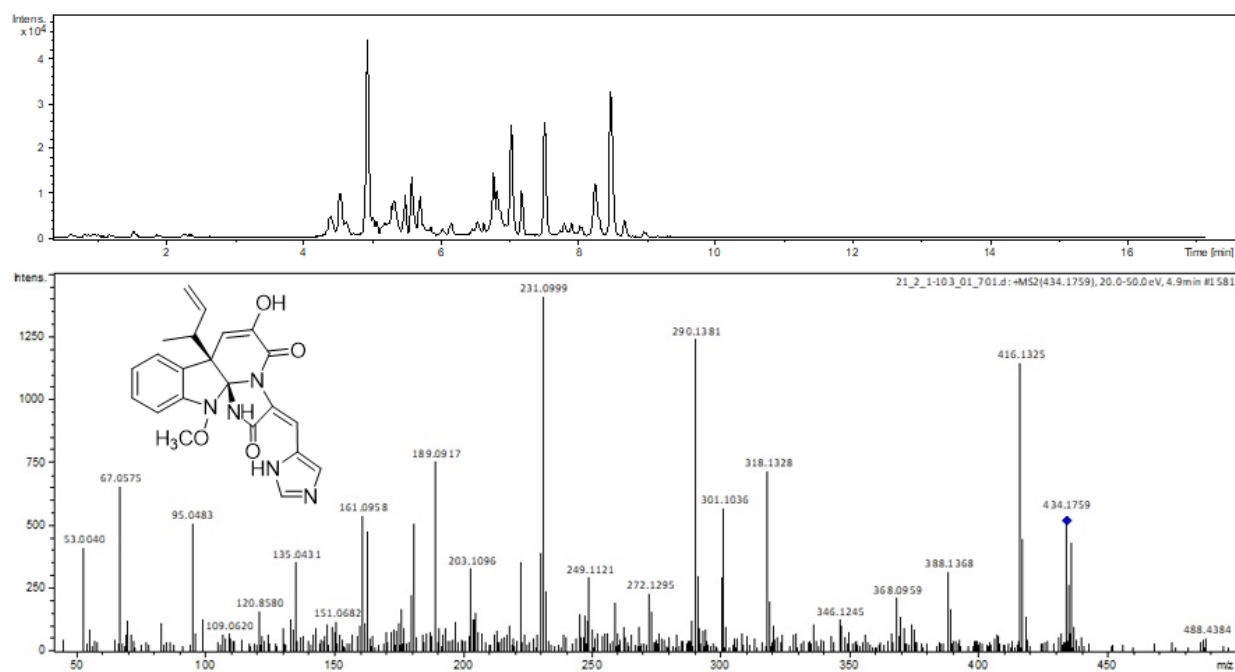


Figura 79. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (**5**) obtido do extrato preparado em meio sucrílio.

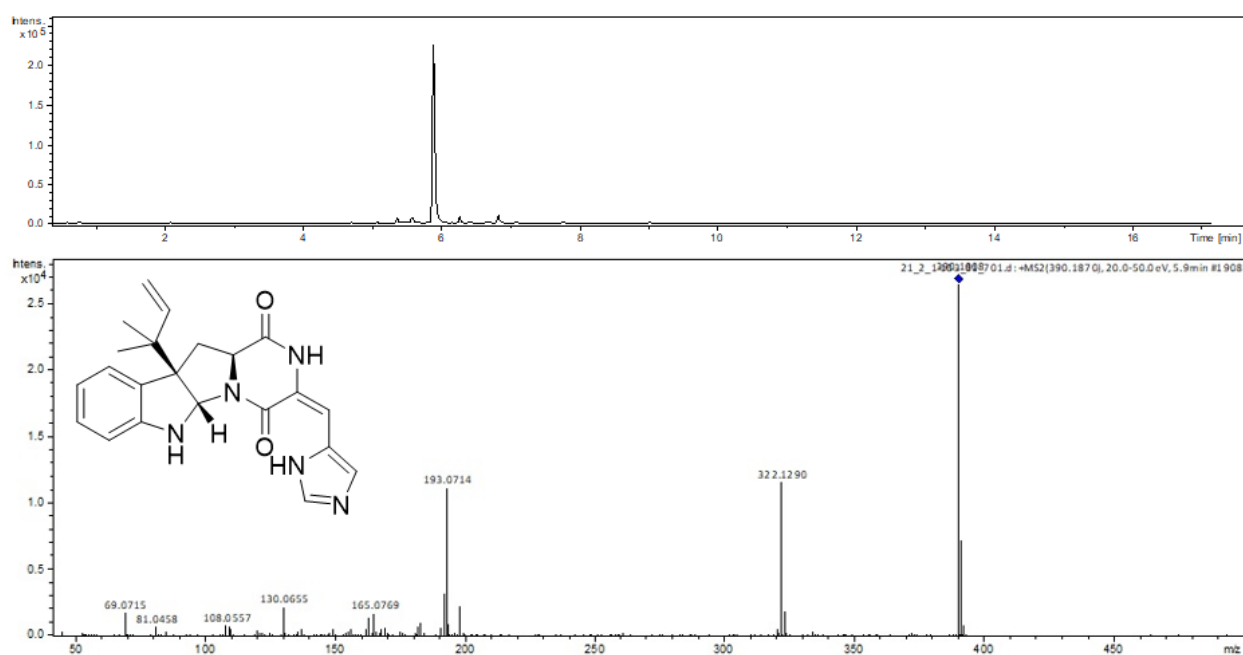


Figura 80. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (**6**) obtido do extrato preparado em meio sucrílio.

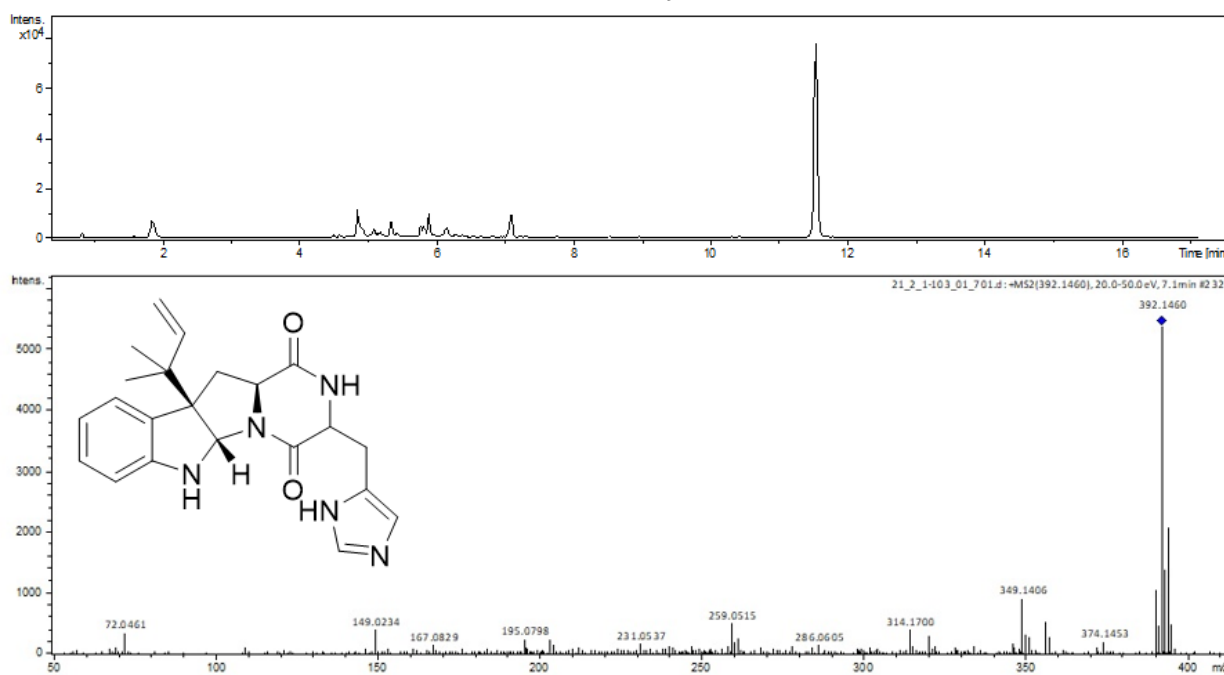


Figura 81. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (**8**) obtido do extrato preparado em meio sucrílio.

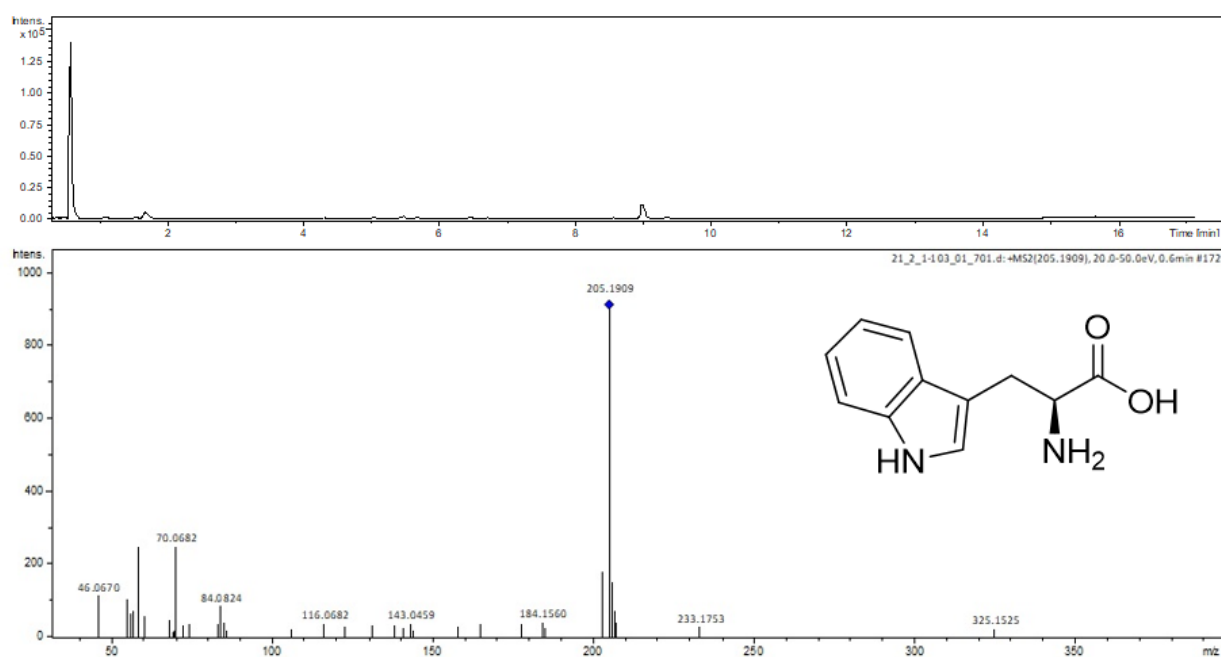


Figura 82. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.

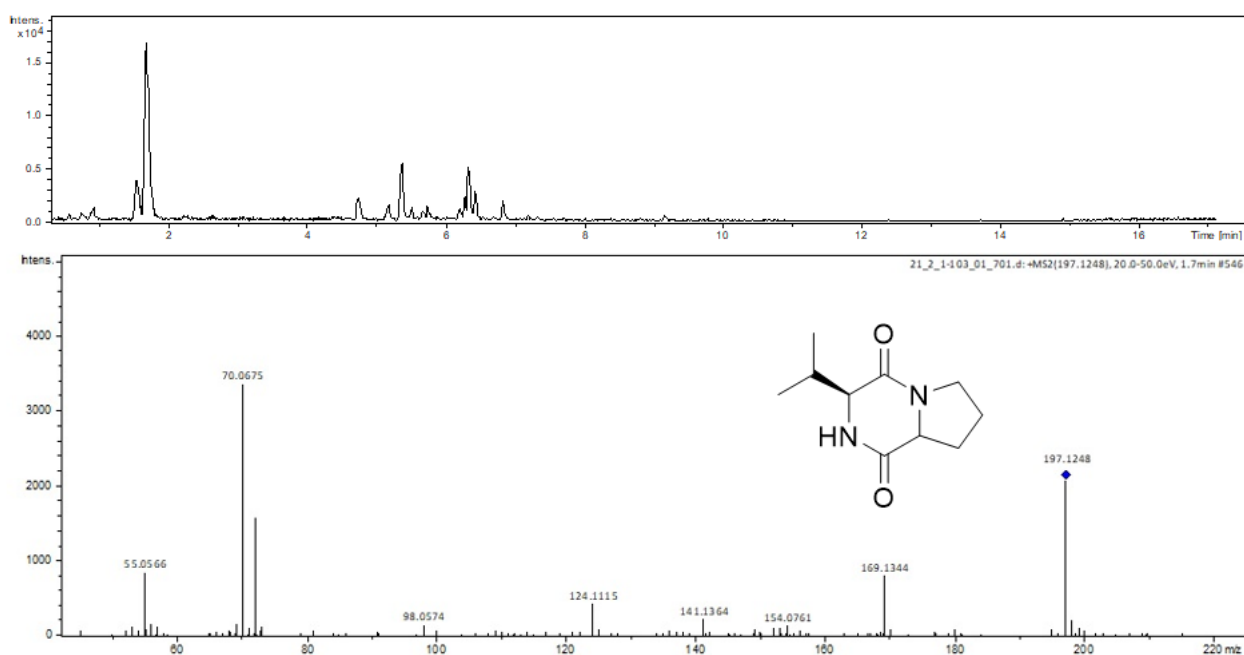


Figura 83. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.

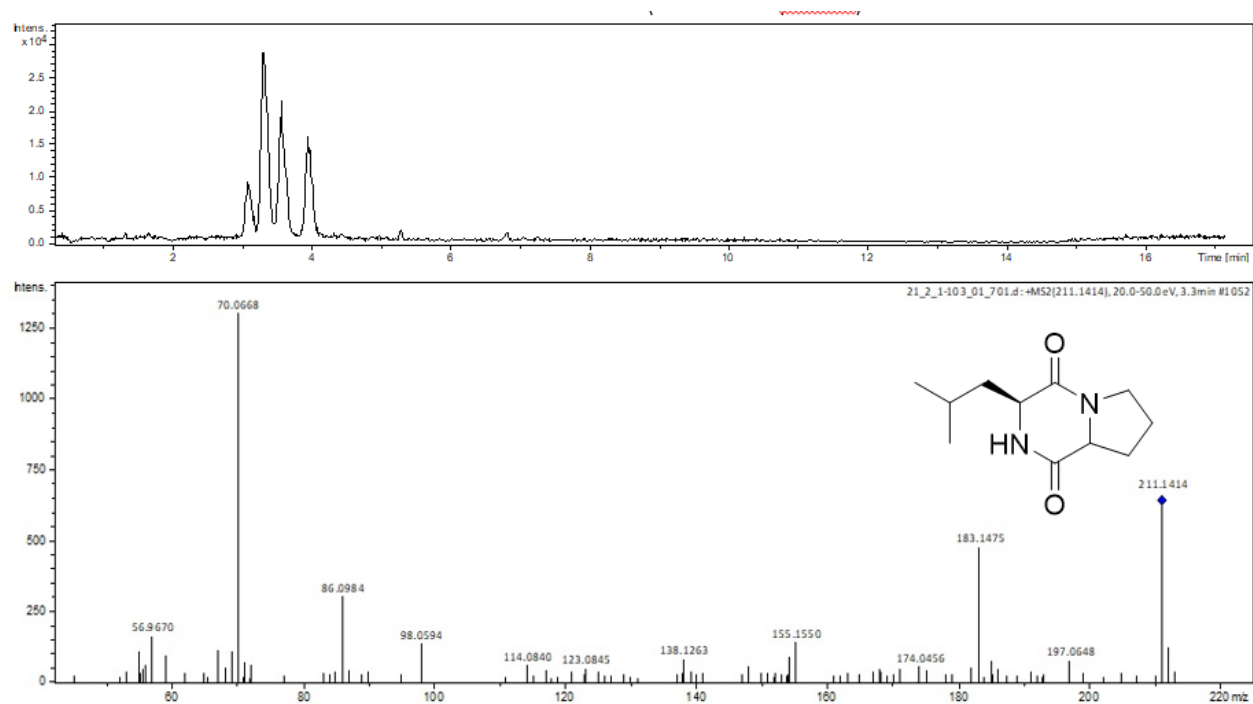


Figura 84. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (**13**) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.

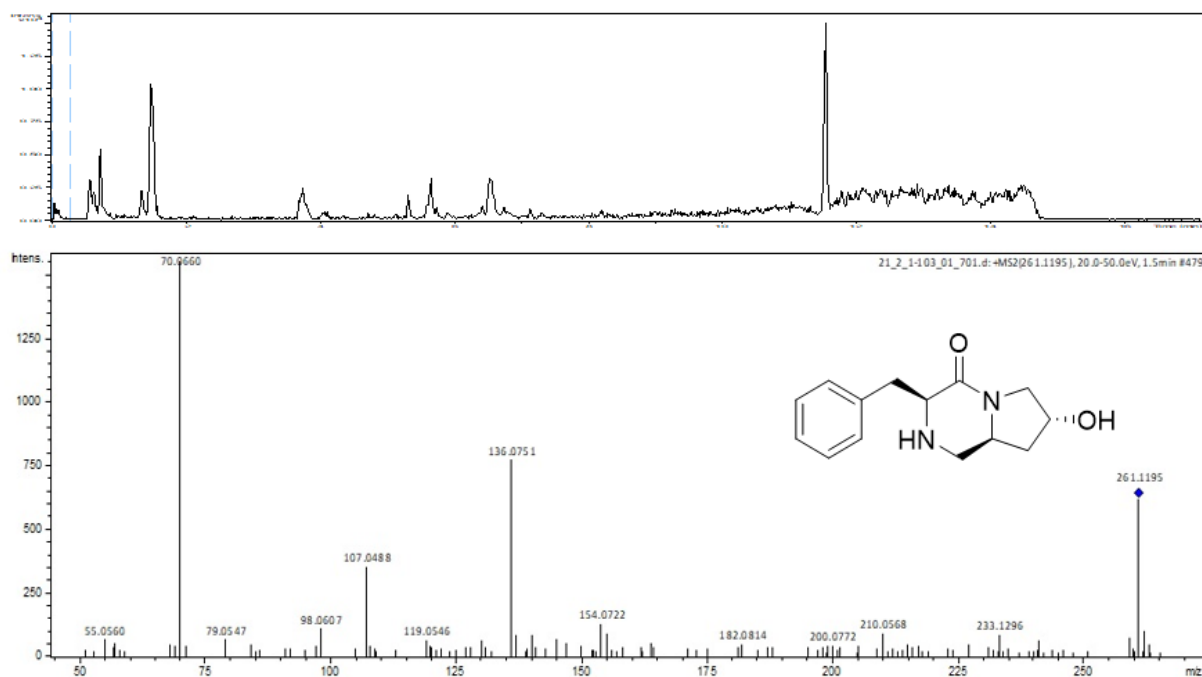


Figura 85. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (**15**) obtido do extrato preparado em meio sucrilho.

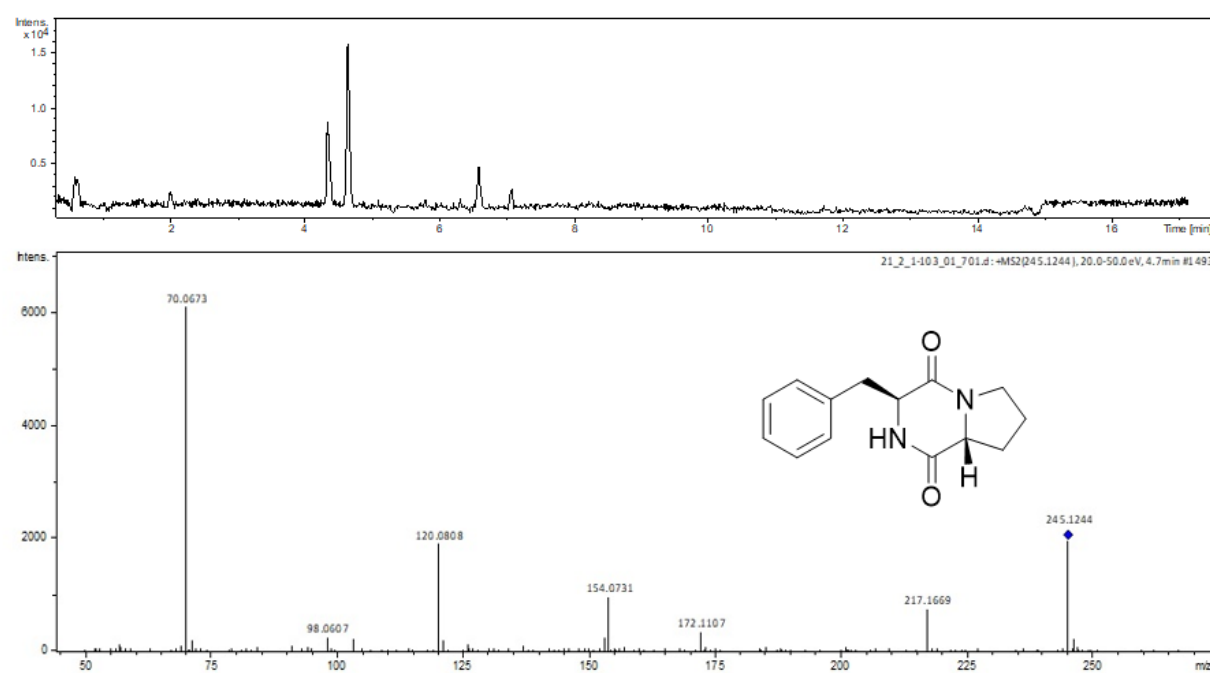


Figura 86. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio BD.

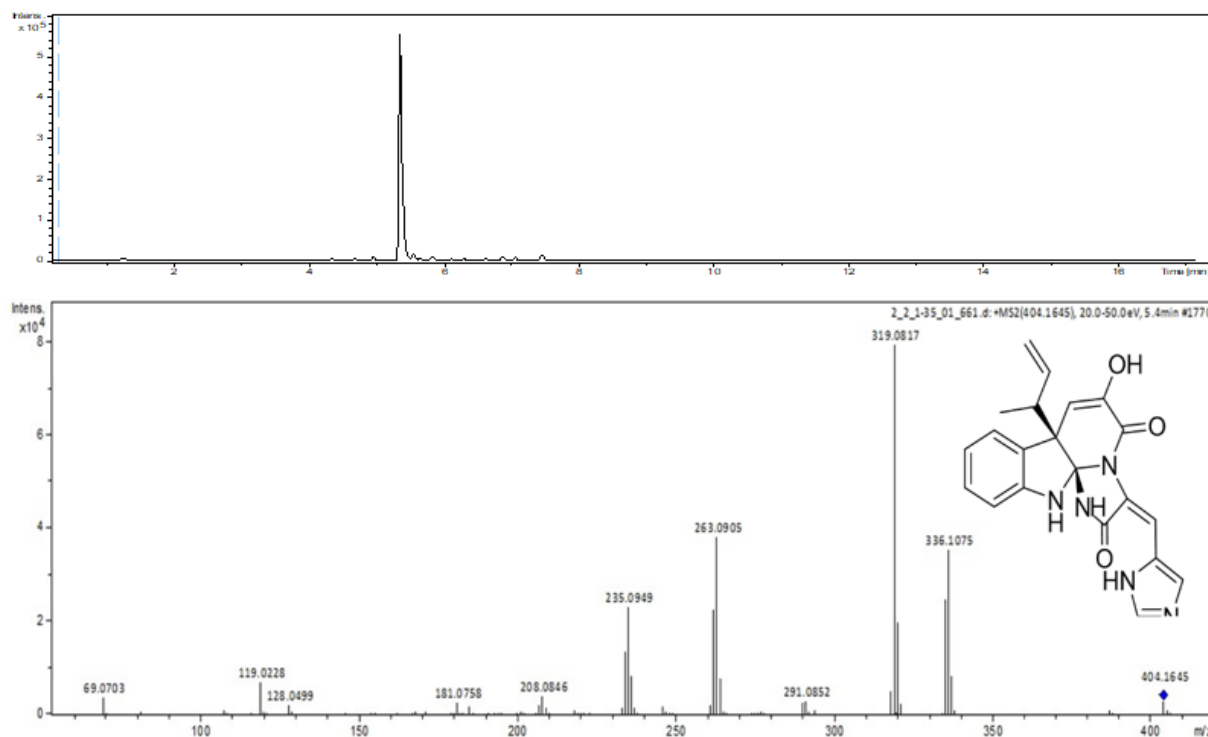


Figura 87. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio BD.

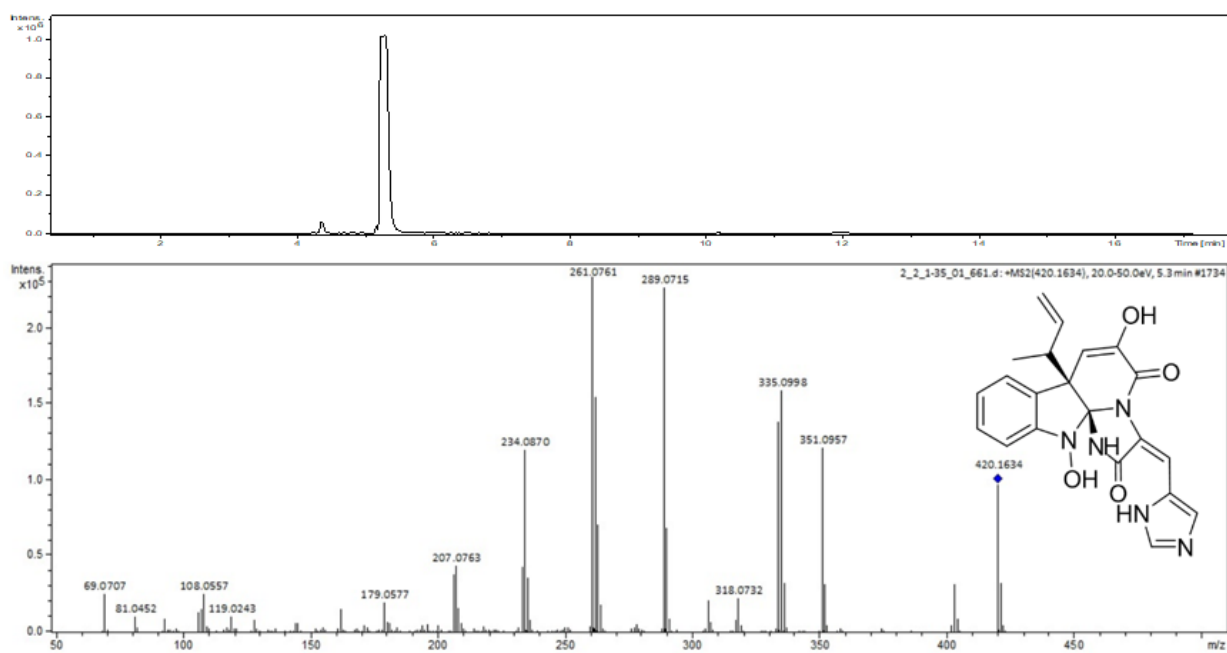


Figura 88. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio BD.

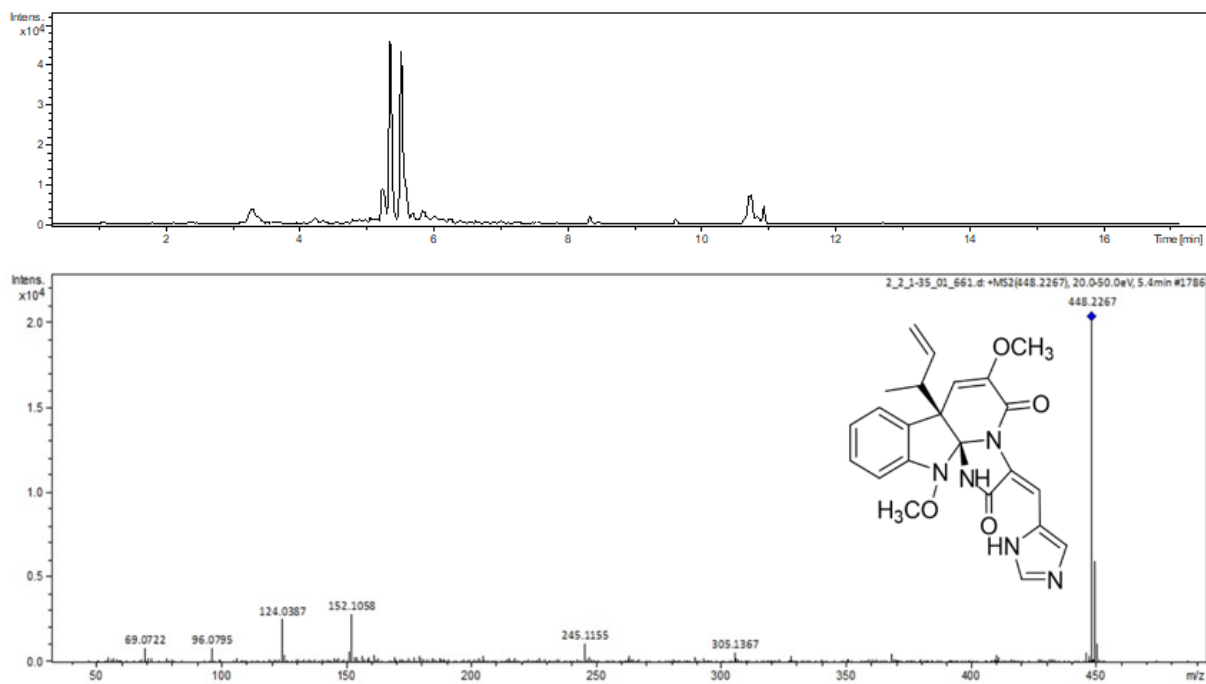


Figura 89. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio BD.

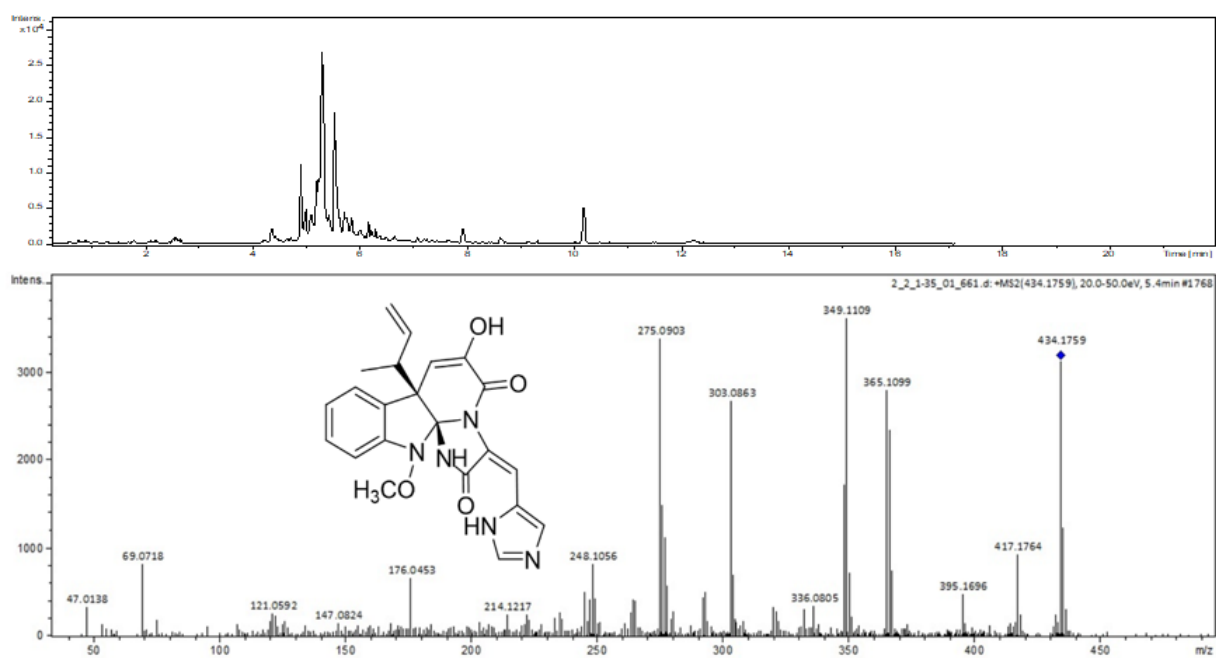


Figura 90. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio BD.

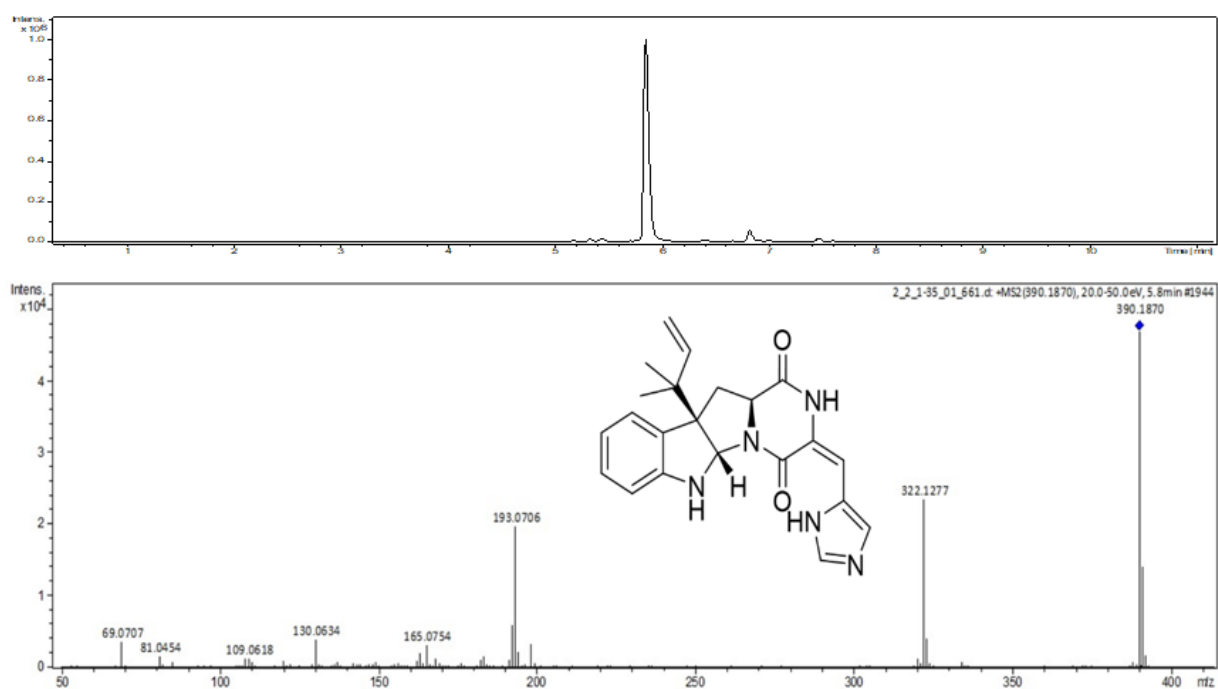


Figura 91. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio BD.

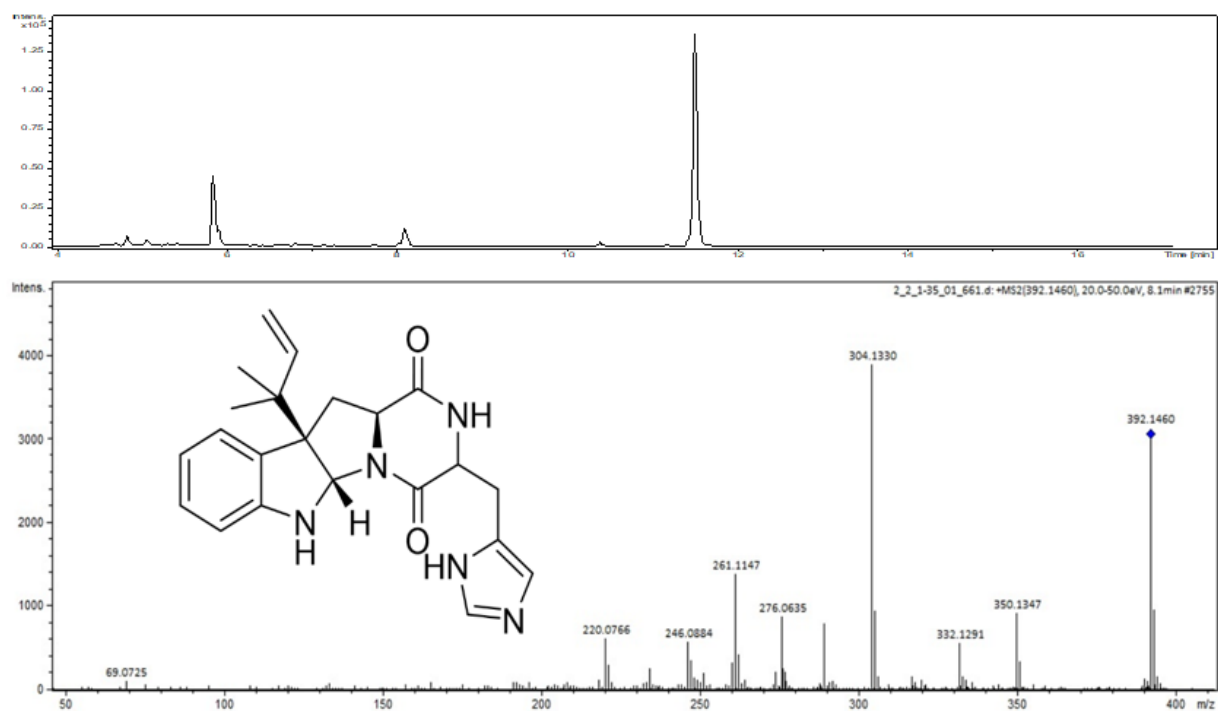


Figura 92. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio BD.

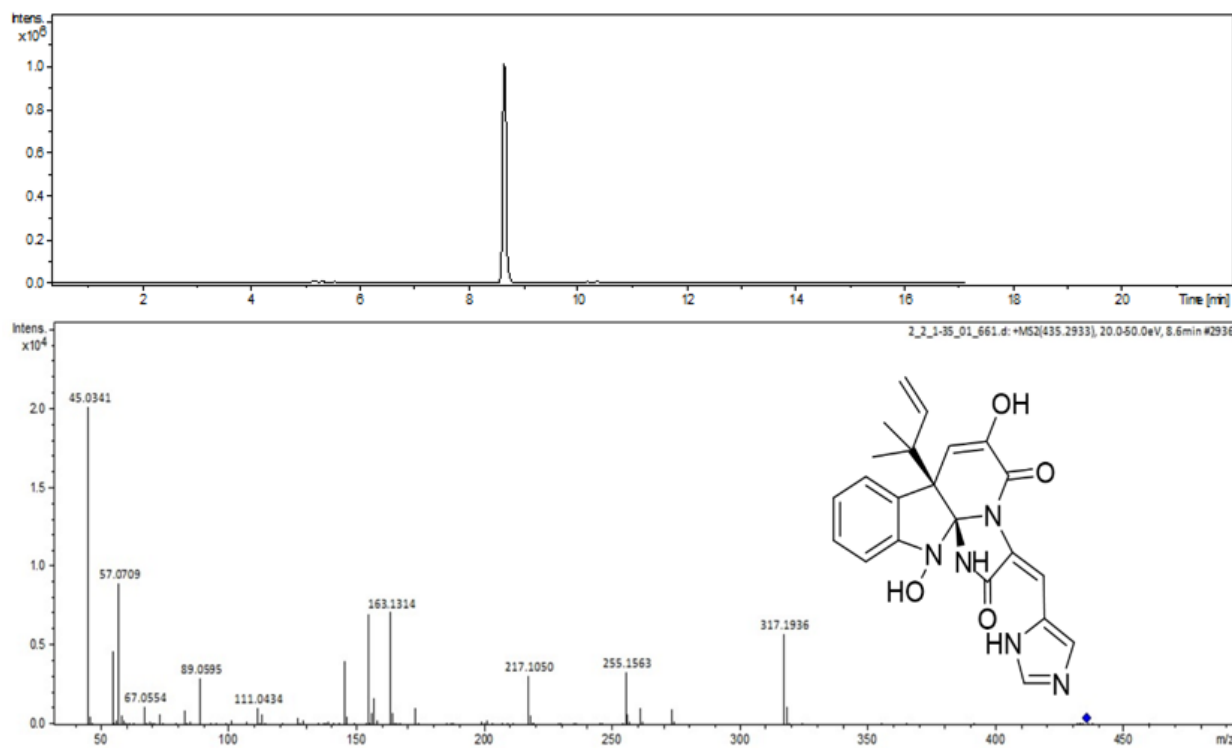


Figura 93. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio BD.

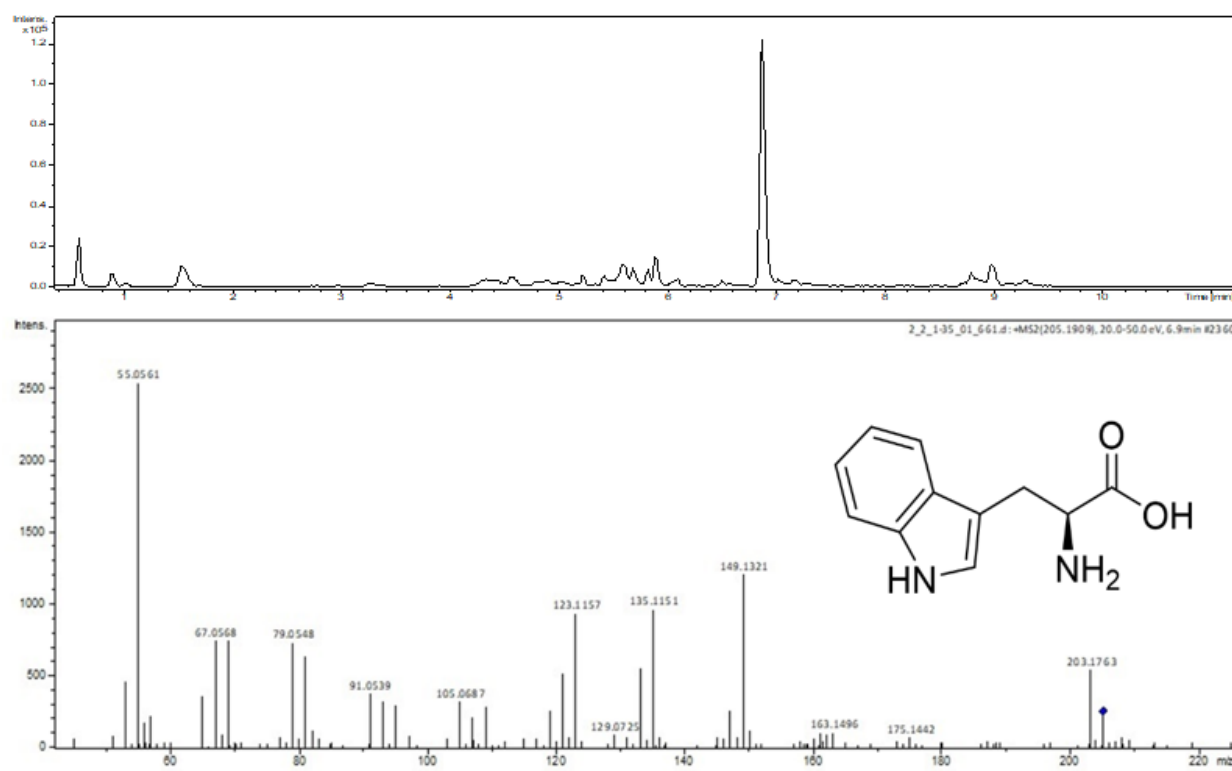


Figura 94. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilfenilalanina (**9**) obtido do extrato preparado em meio BD.

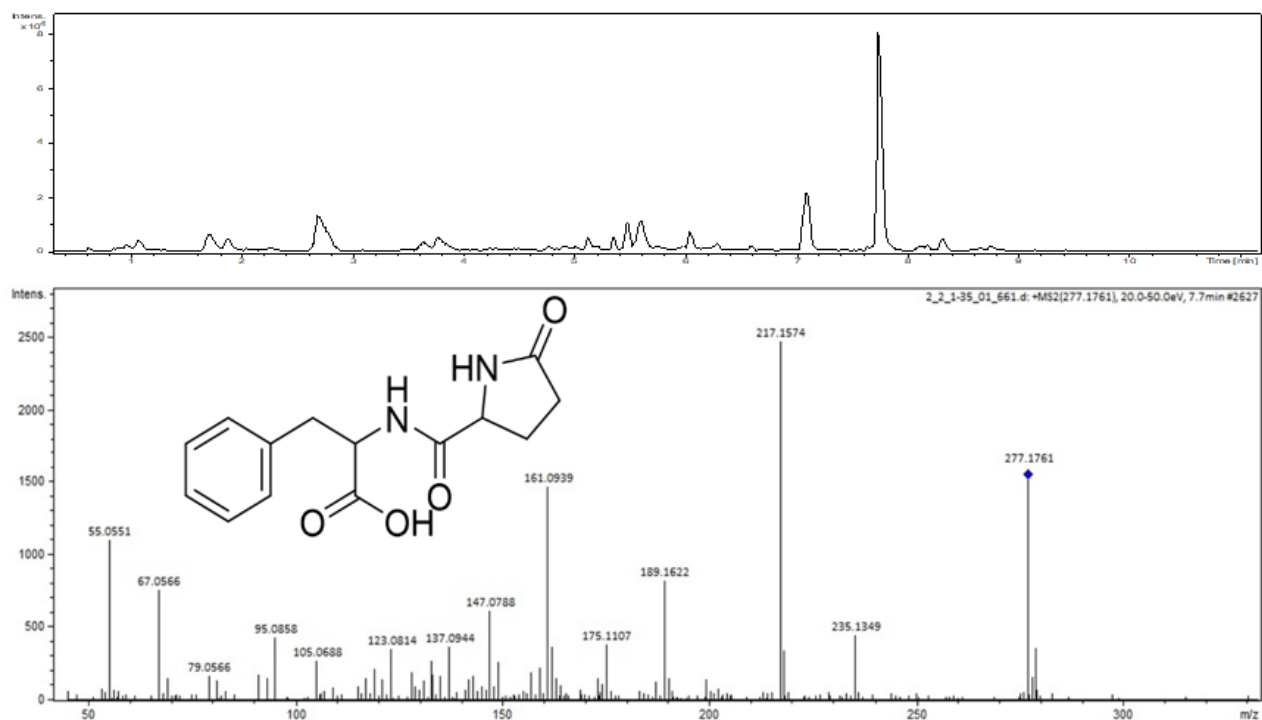


Figura 95. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (**10**) obtido do extrato preparado em meio BD.

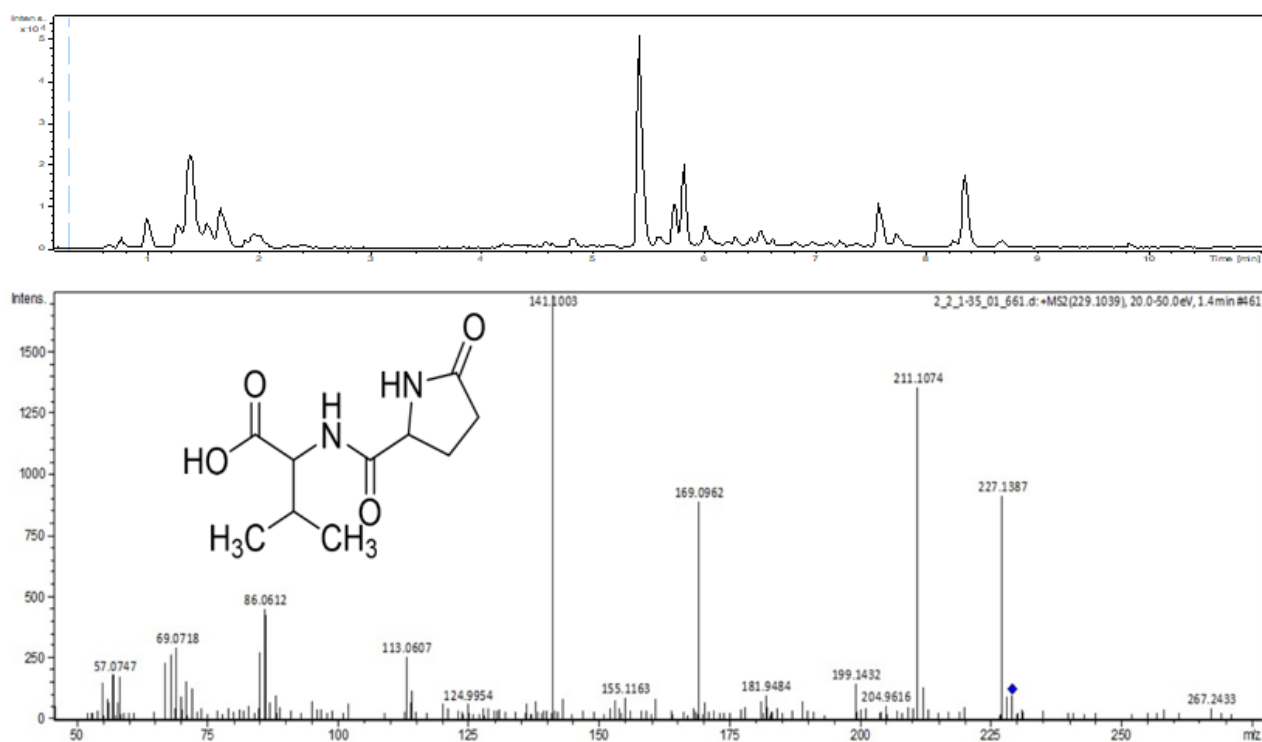


Figura 96. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (**11**) obtido do extrato preparado em meio BD.

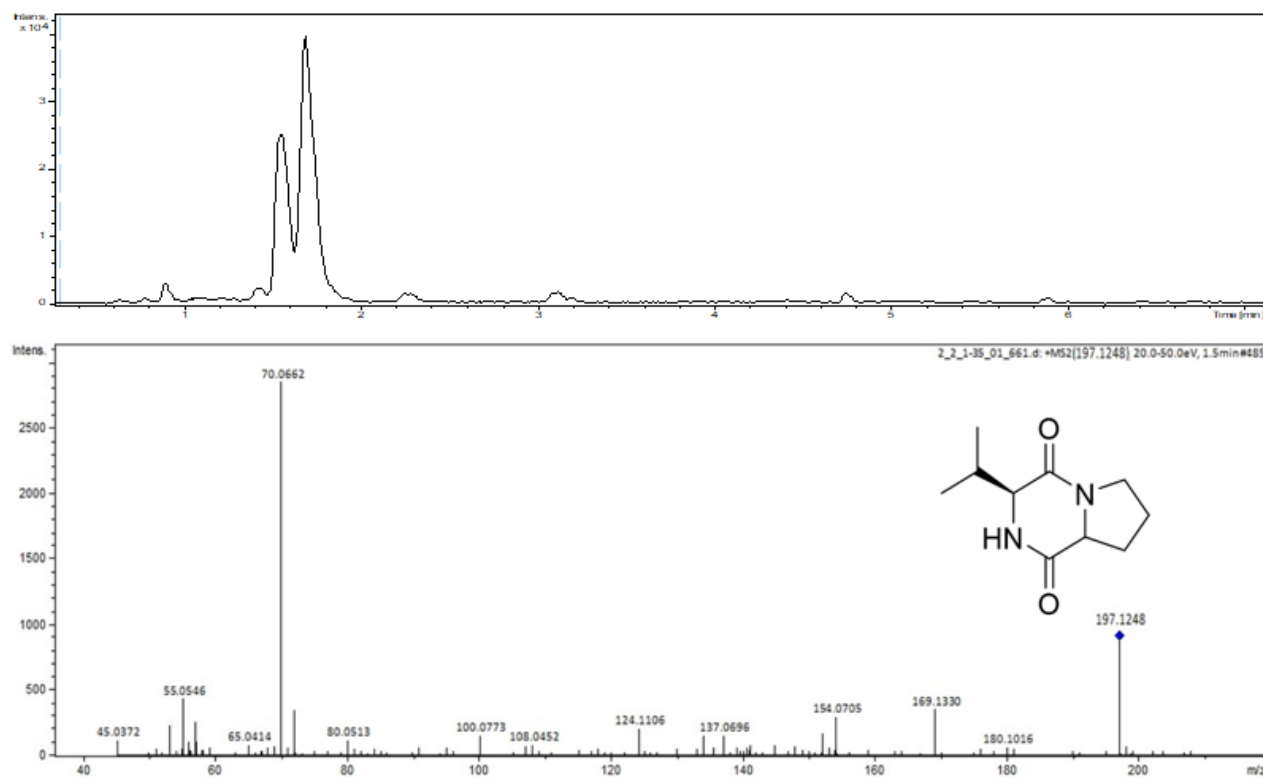


Figura 97. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (**12**) obtido do extrato preparado em meio BD.

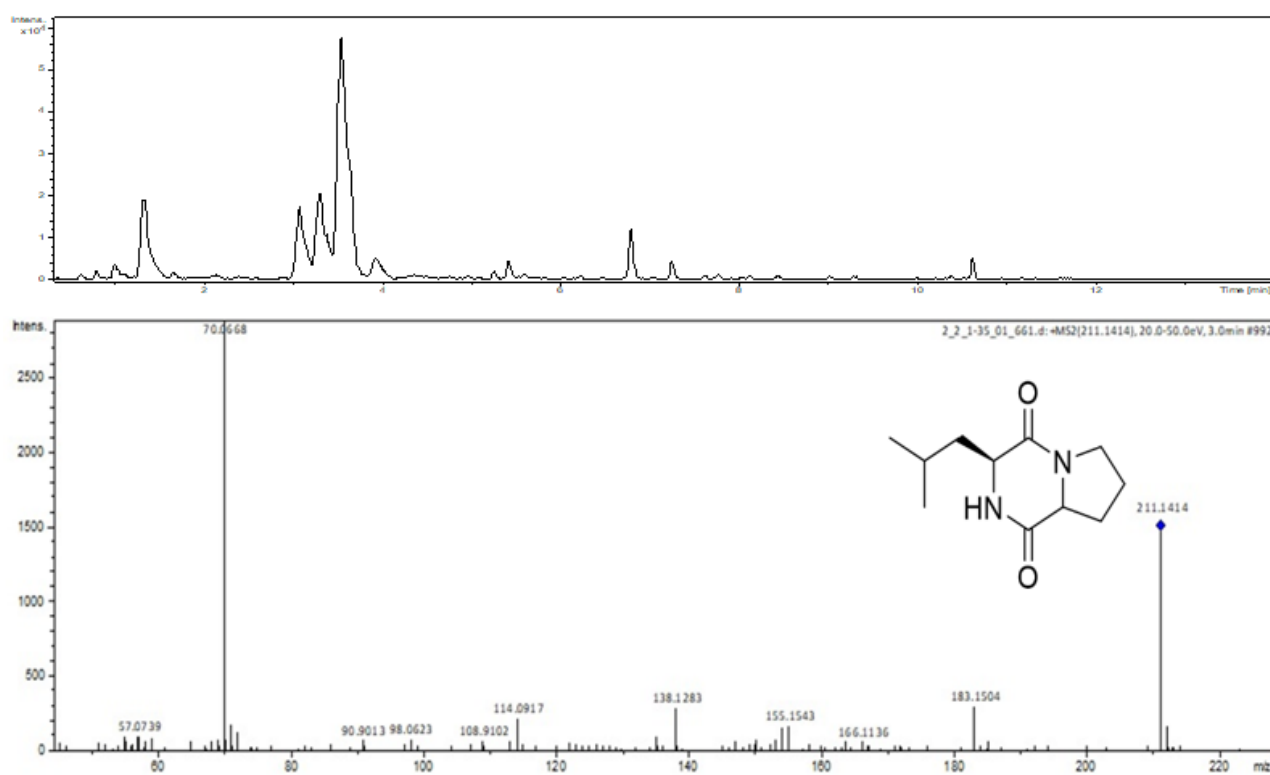


Figura 98. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (**13**) obtido do extrato preparado em meio BD.

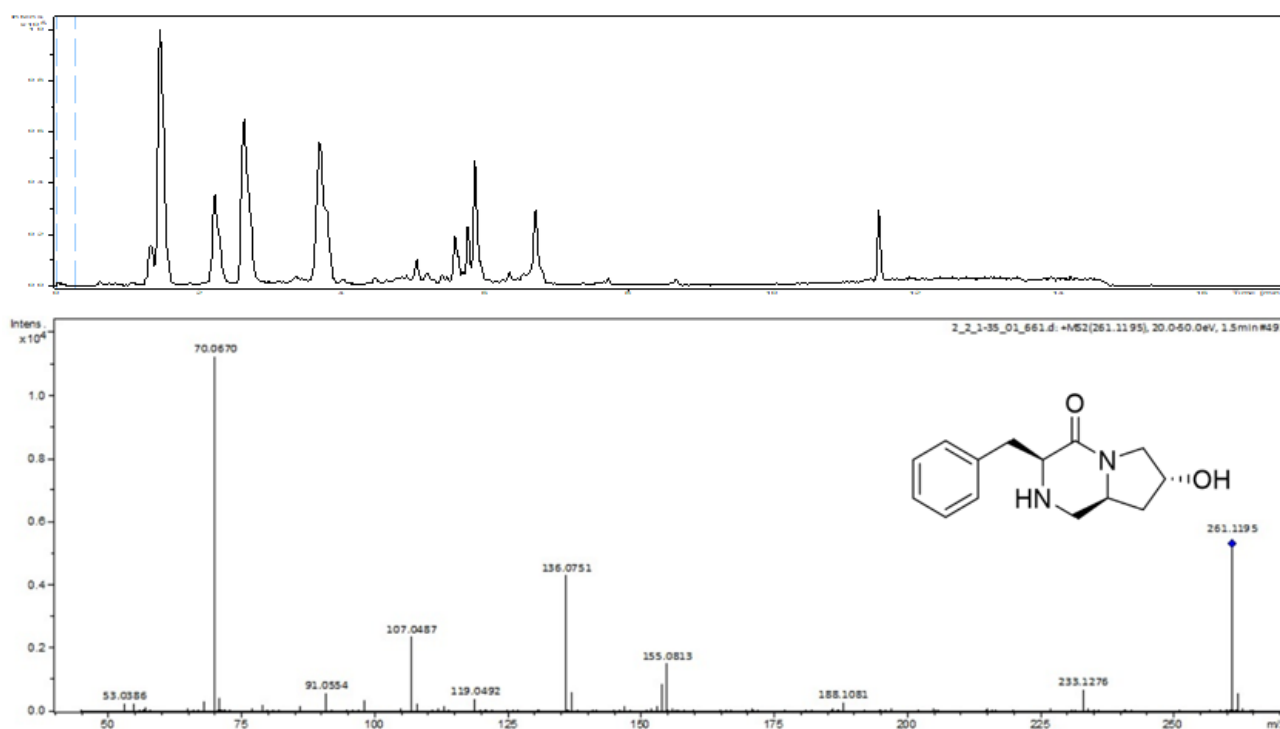


Figura 99. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (**14**) obtido do extrato preparado em meio BD.

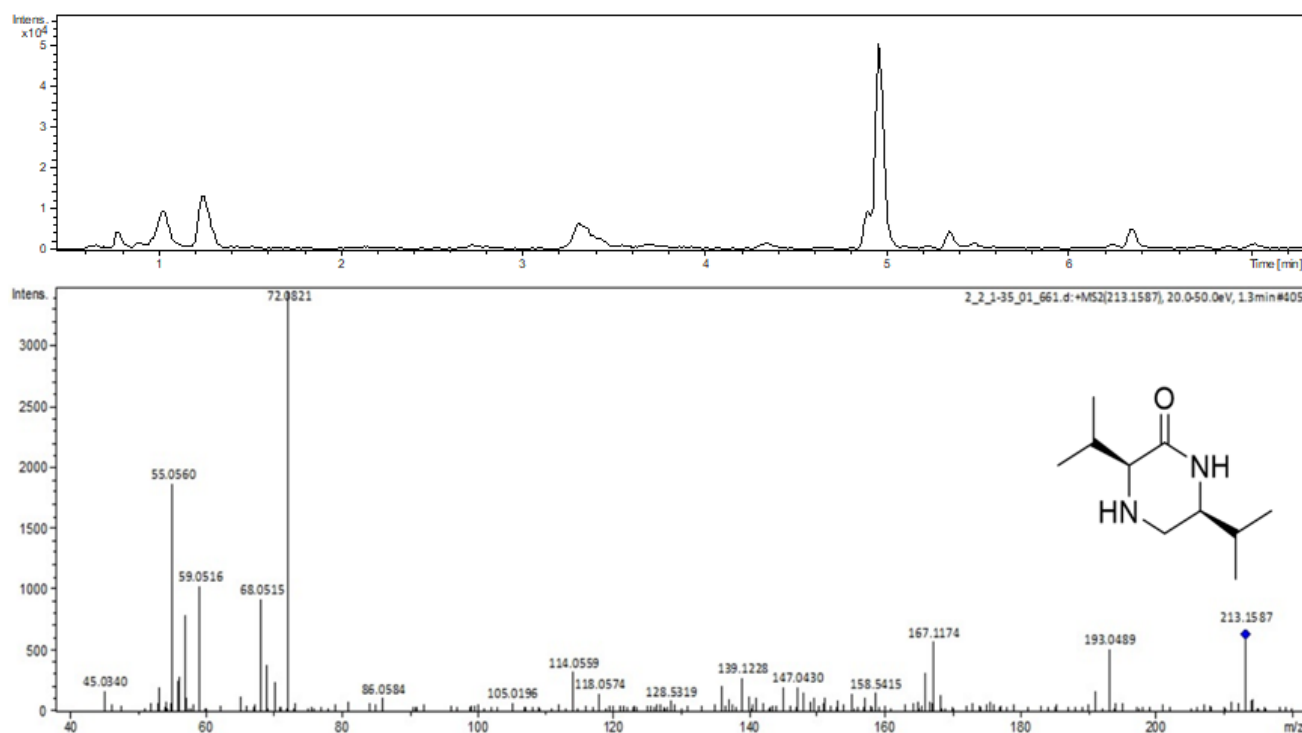


Figura 100. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (**15**) obtido do extrato preparado em meio BD.

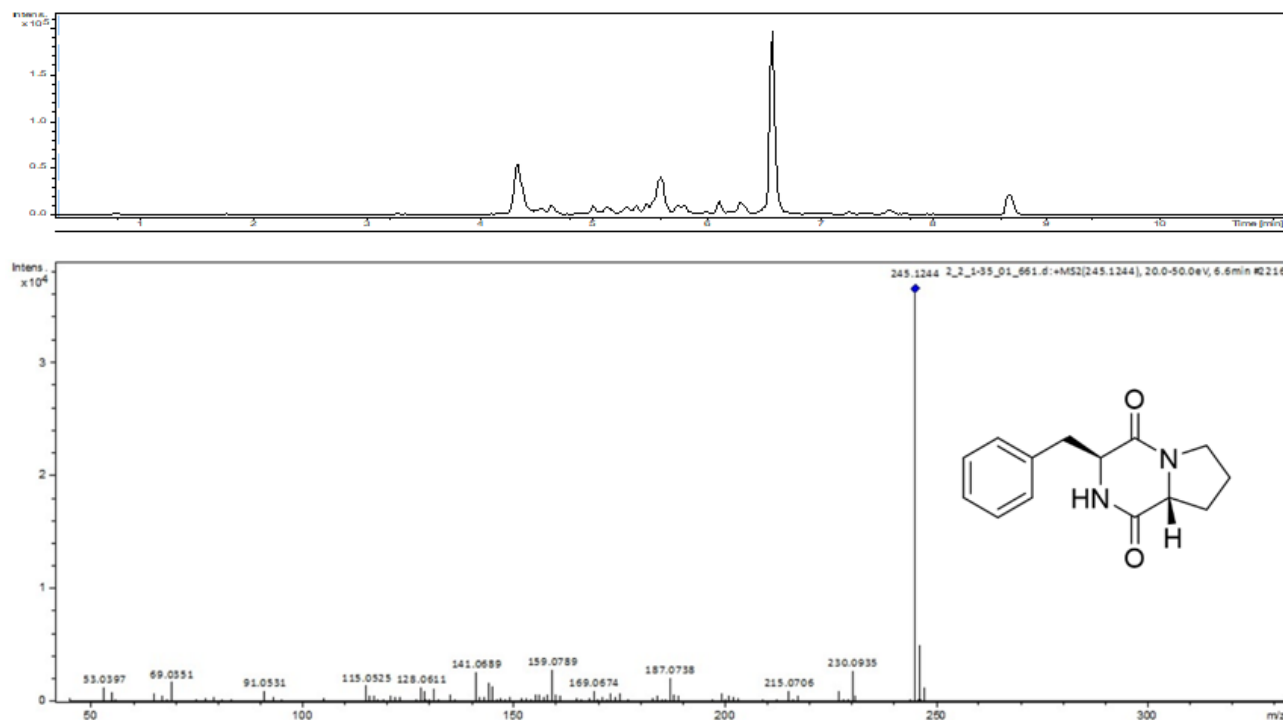


Figura 101. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo (fenilalanina-leucina) (**16**) obtido do extrato preparado em meio BD.

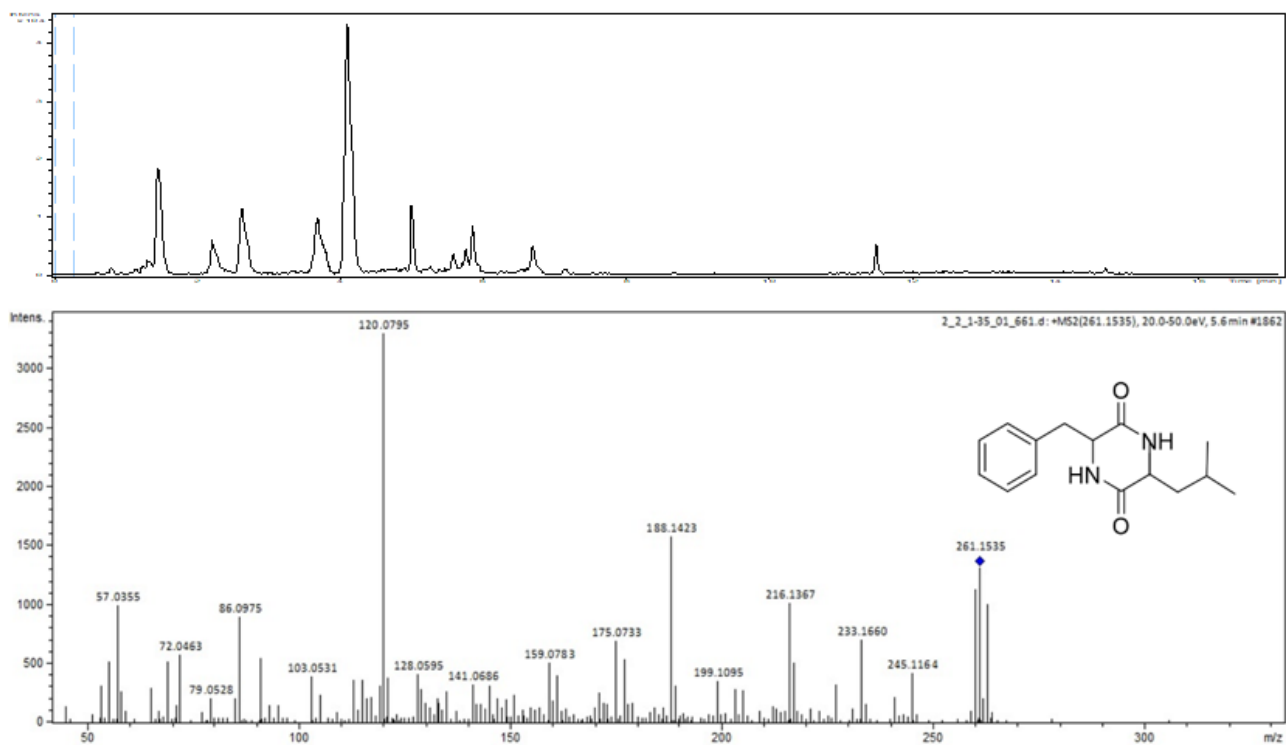


Figura 102. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

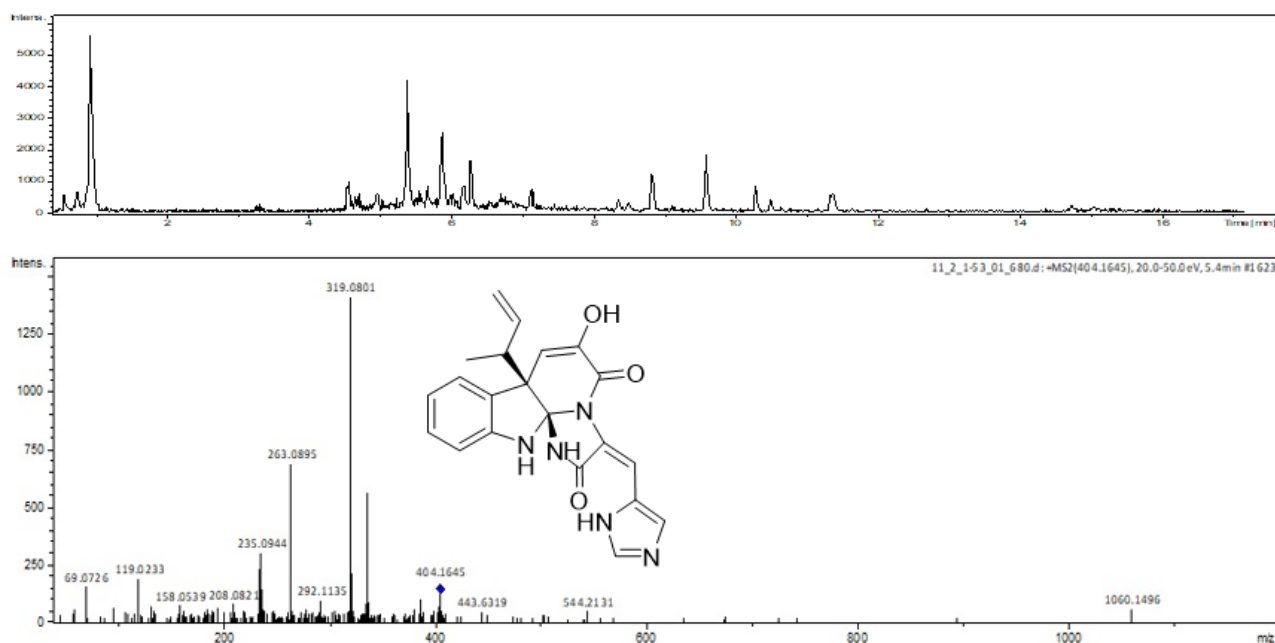


Figura 103. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

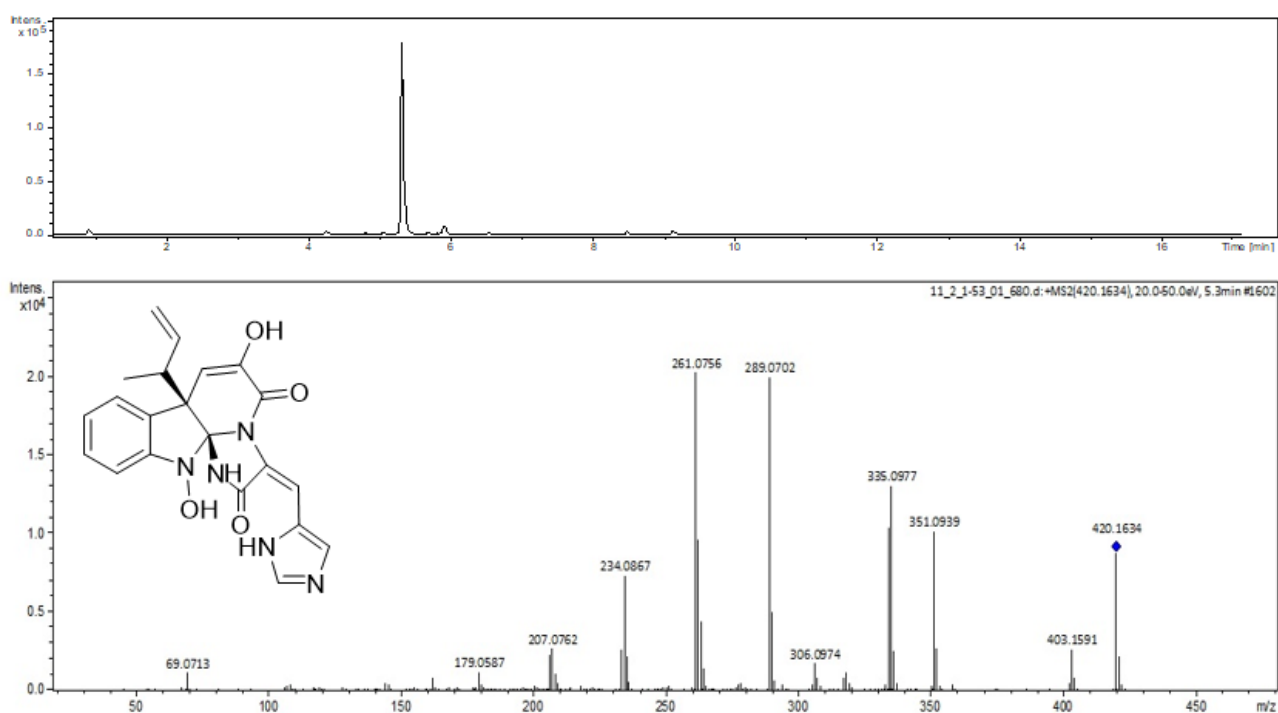


Figura 104. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

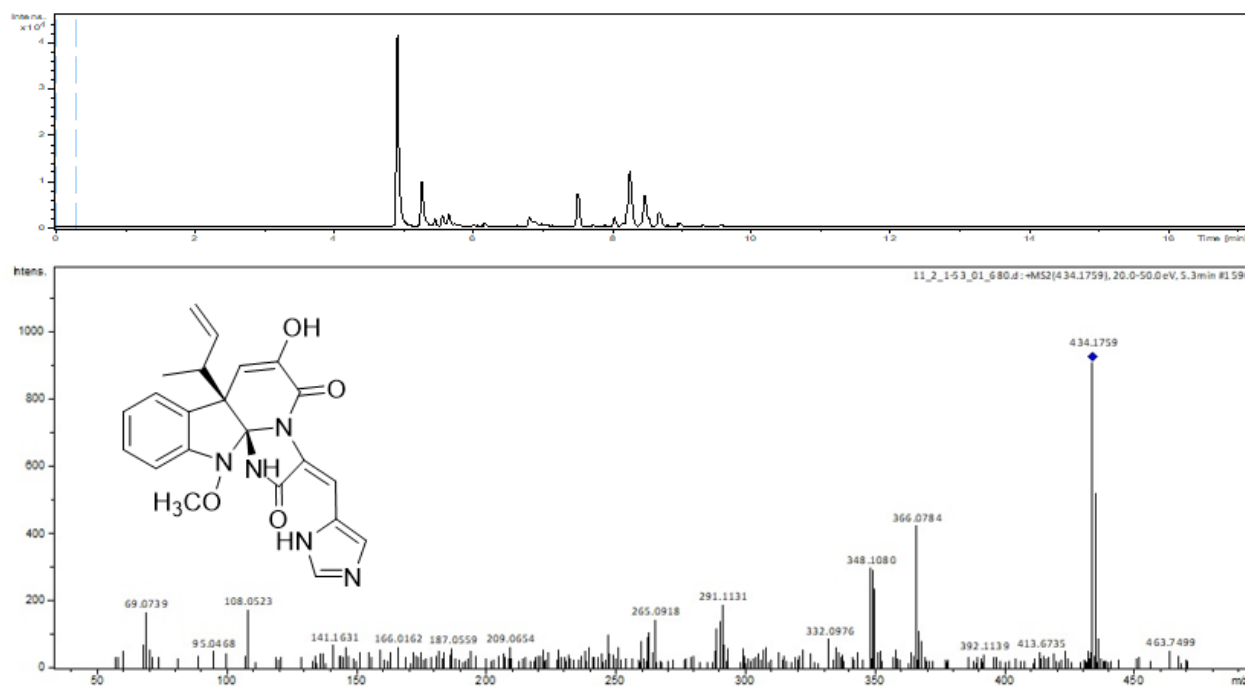


Figura 105. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

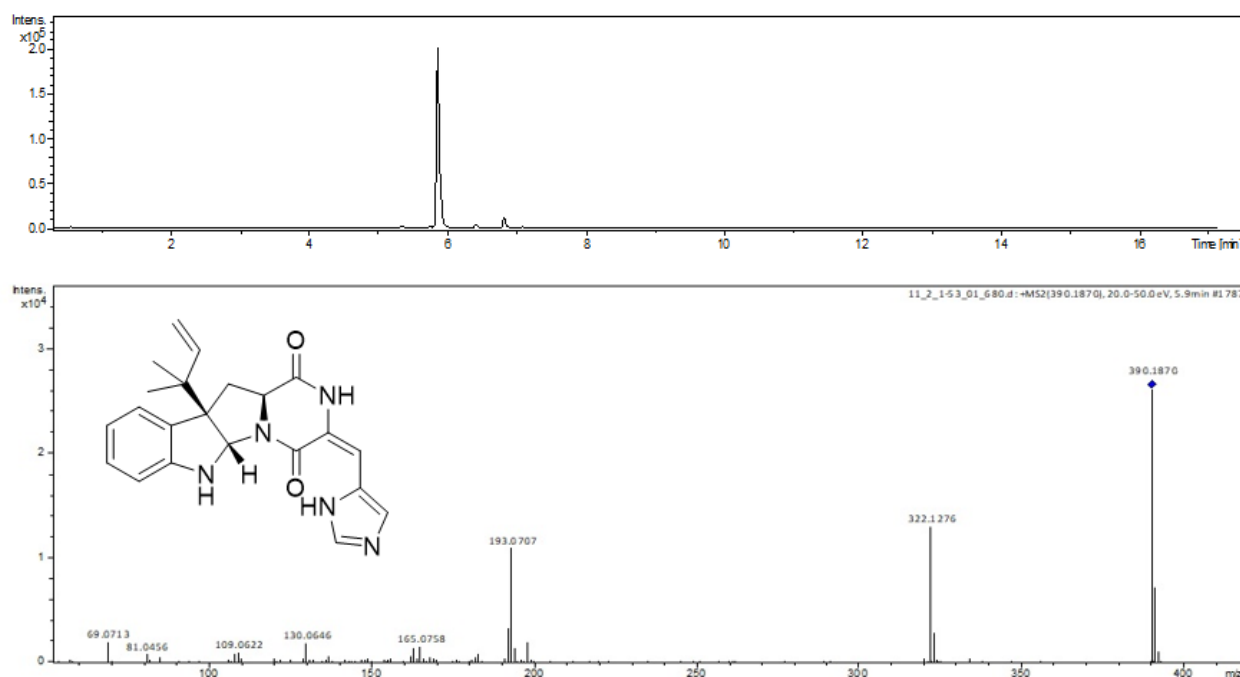


Figura 106. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (**8**) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

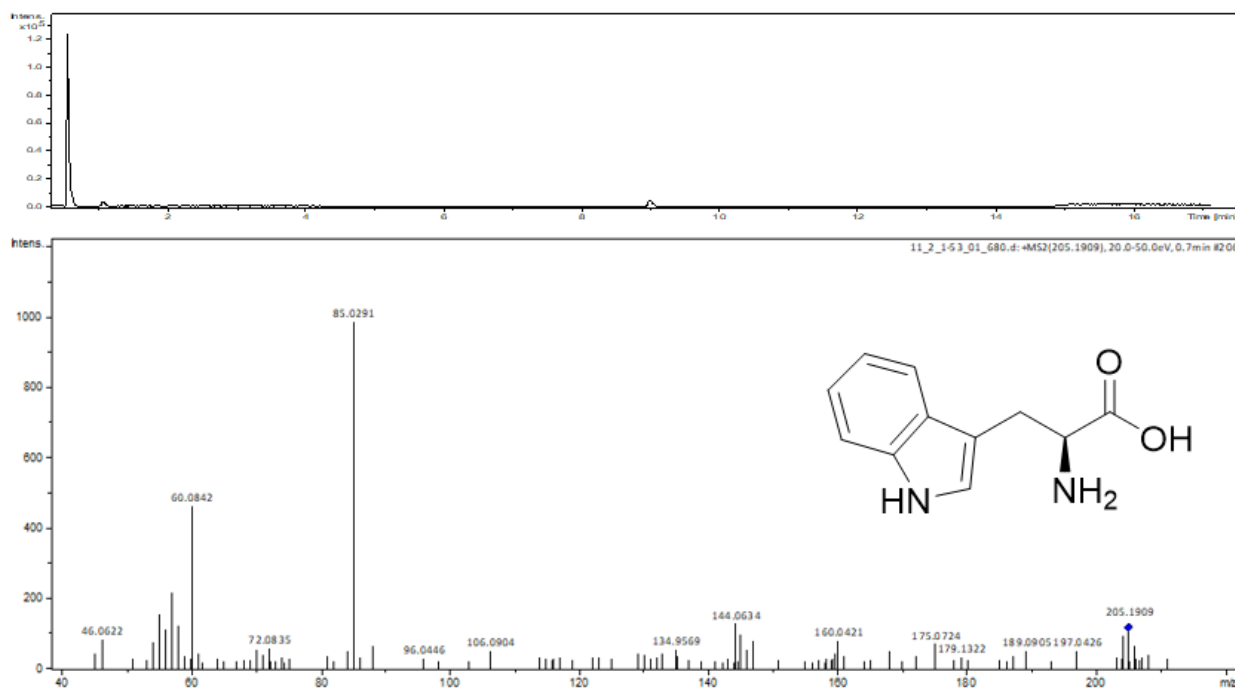


Figura 107. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (**9**) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

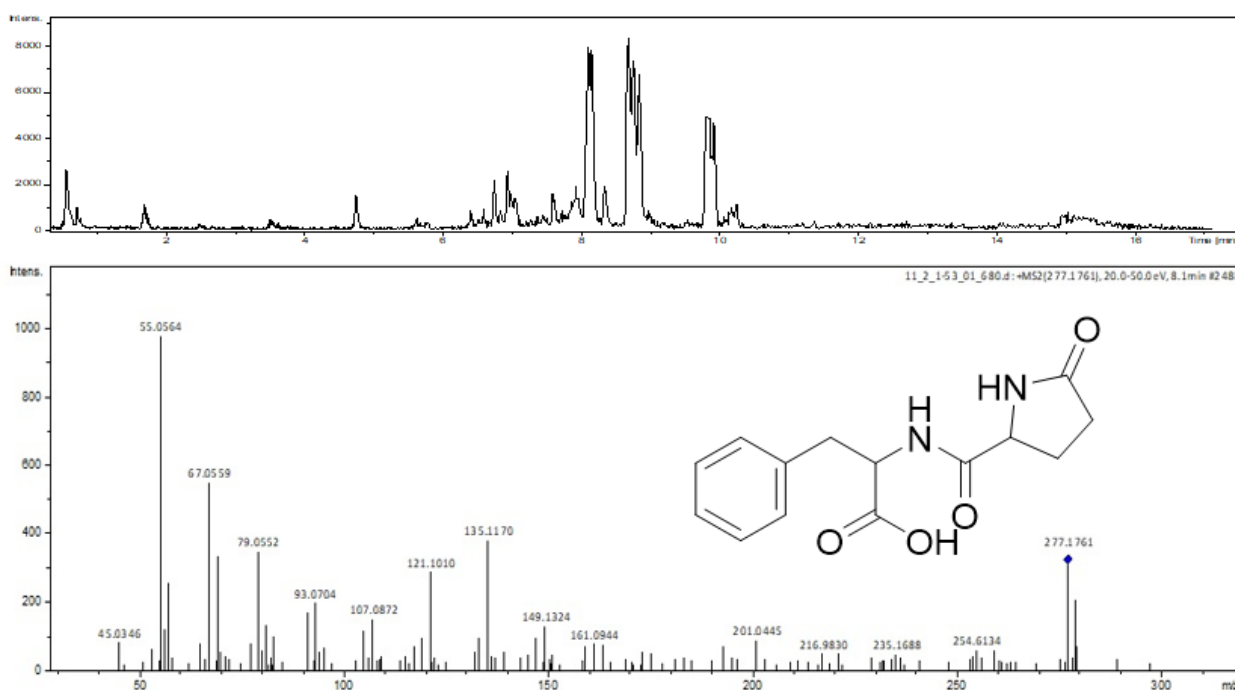


Figura 108. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (**13**) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

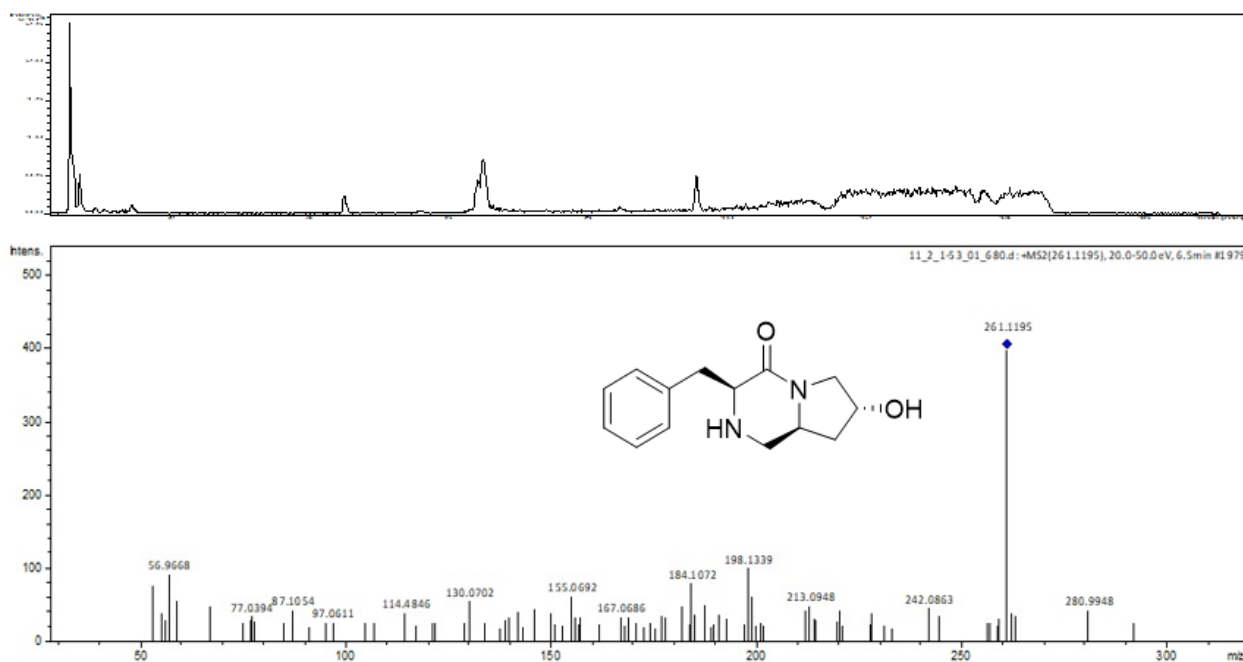


Figura 109. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (**16**) obtido do extrato preparado em meio CZAPEK.

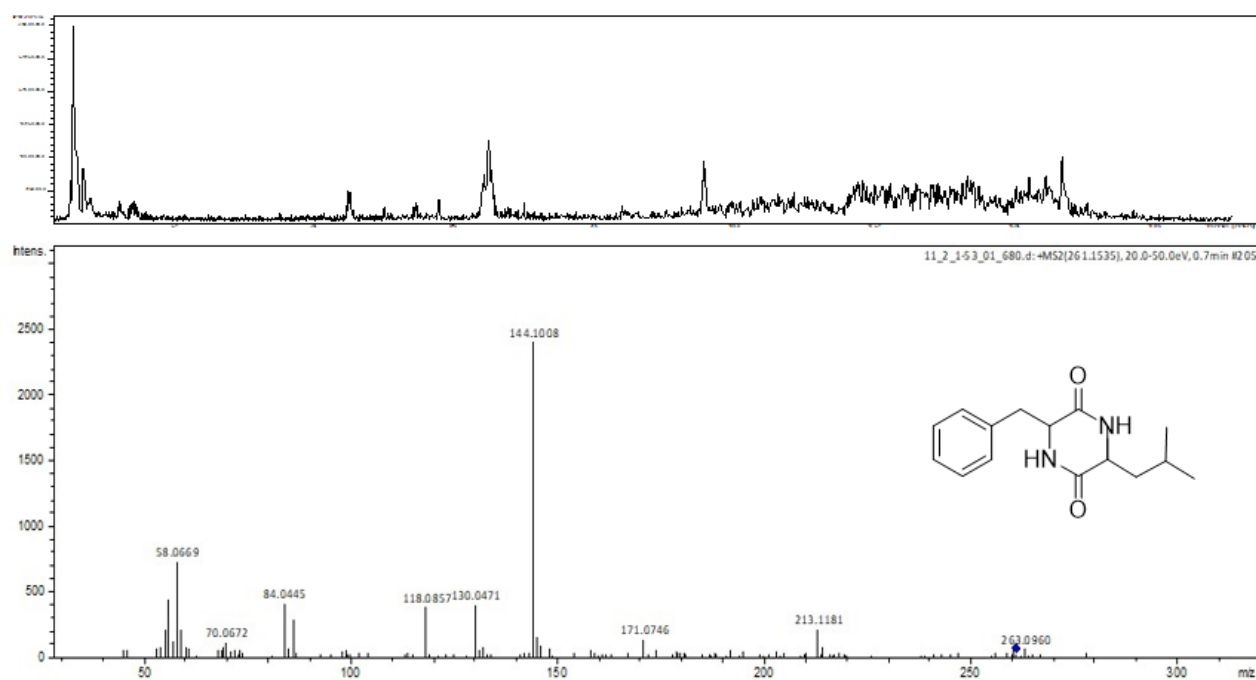


Figura 110. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (**1**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

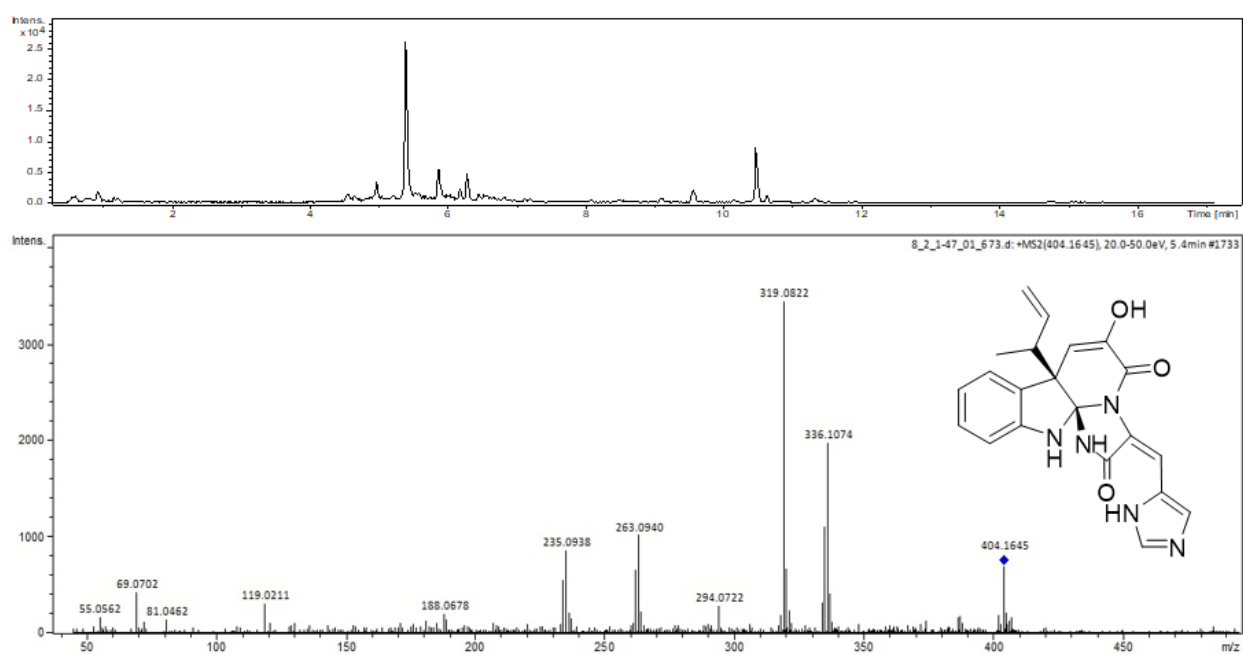


Figura 111. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (**2**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

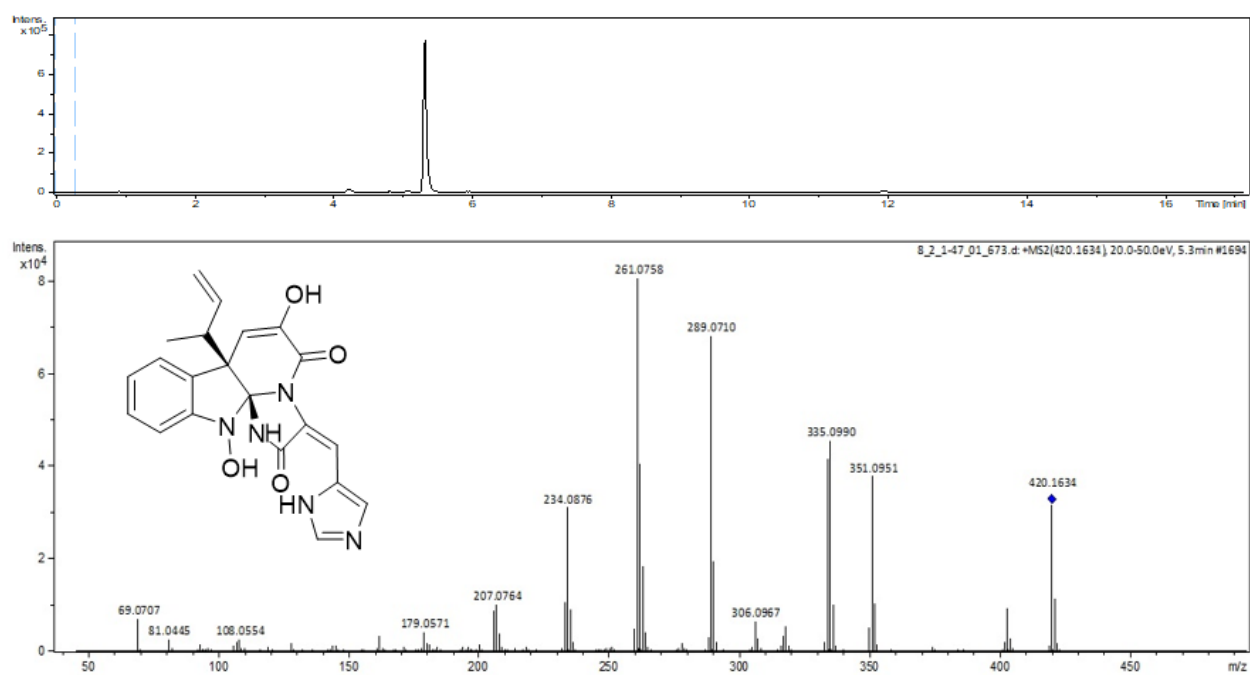


Figura 112. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

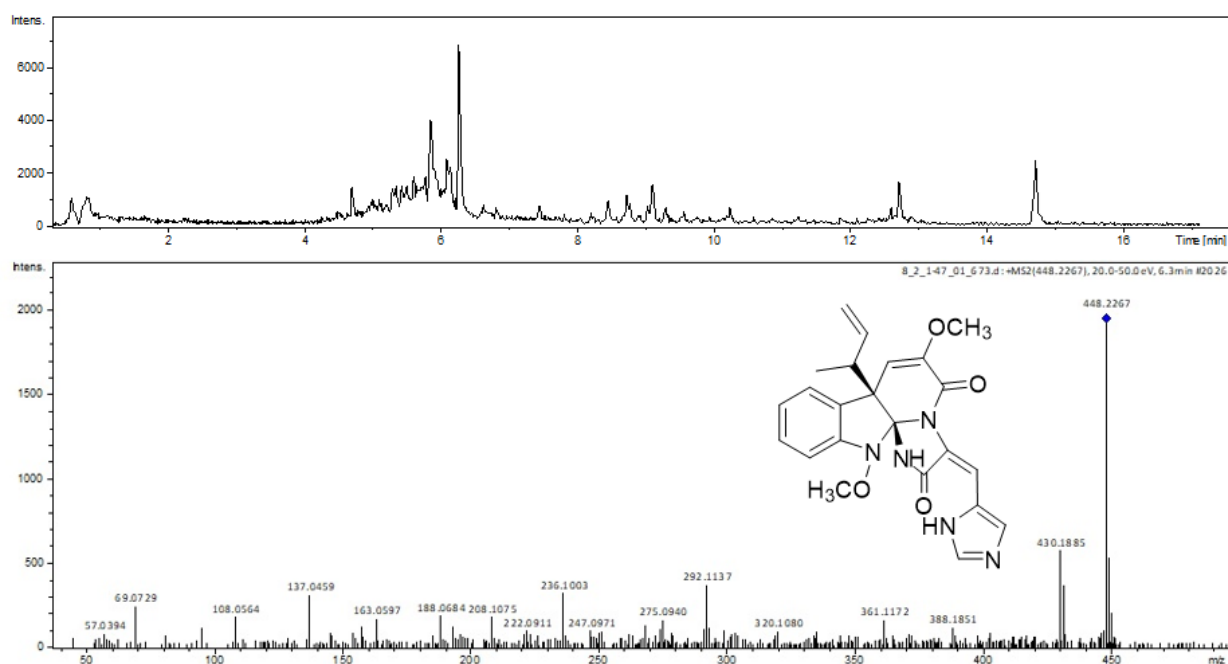


Figura 113. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (4) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

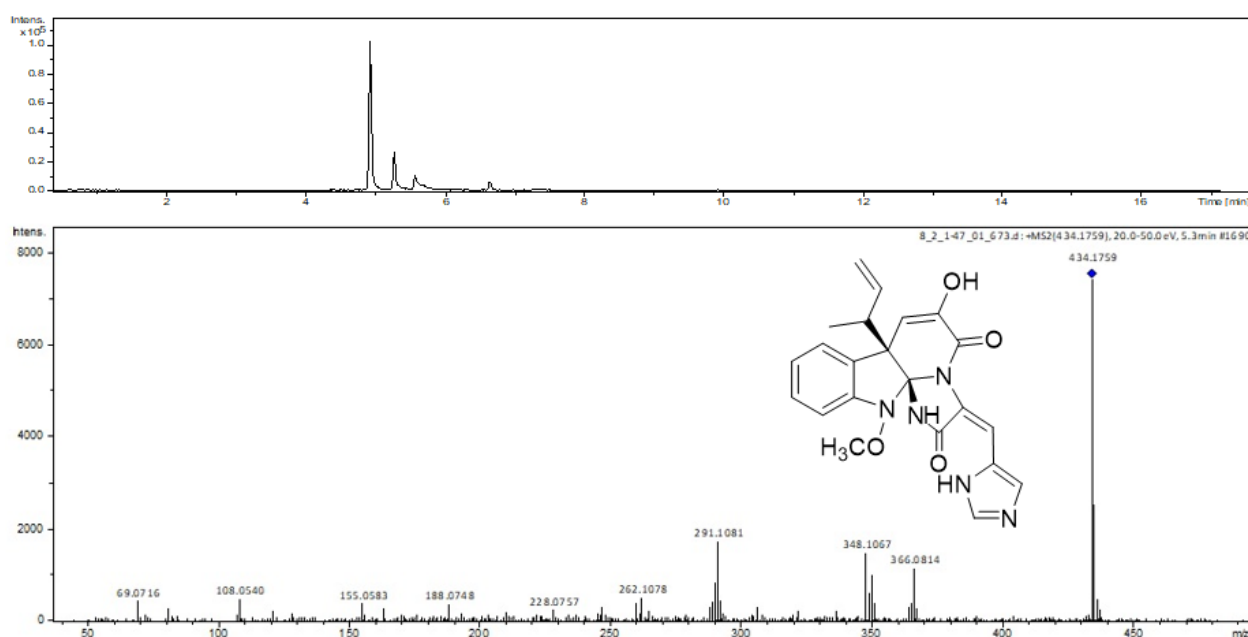


Figura 114. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (5) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

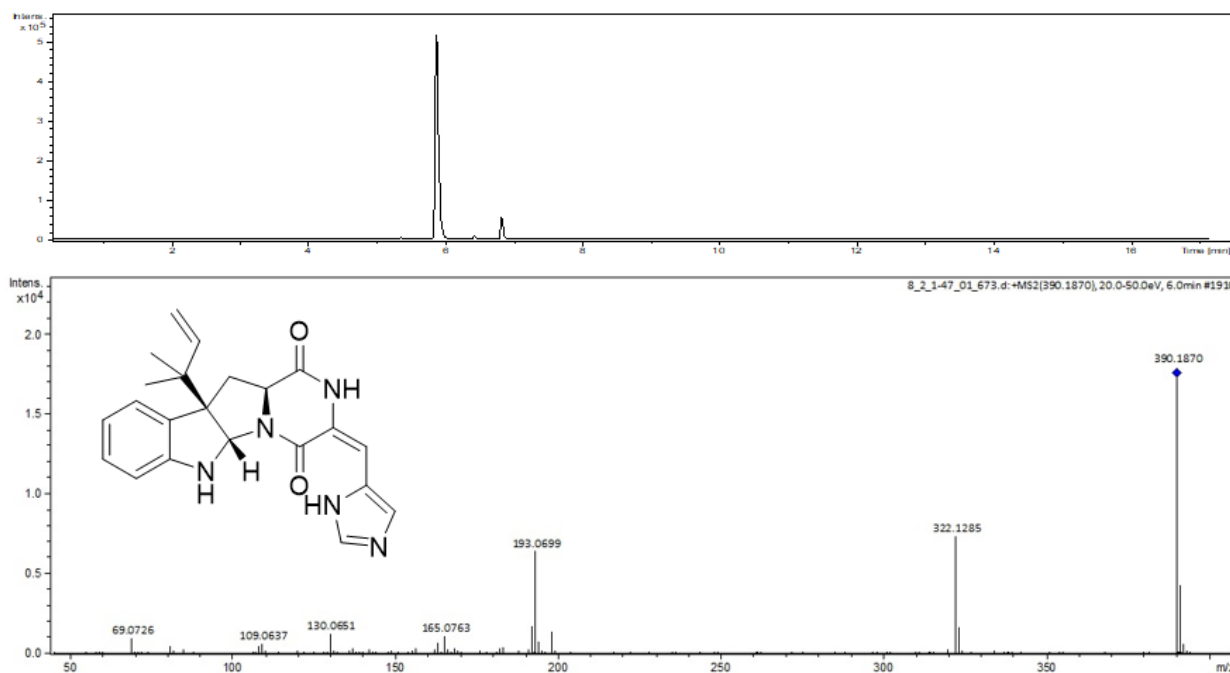


Figura 115. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (6) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

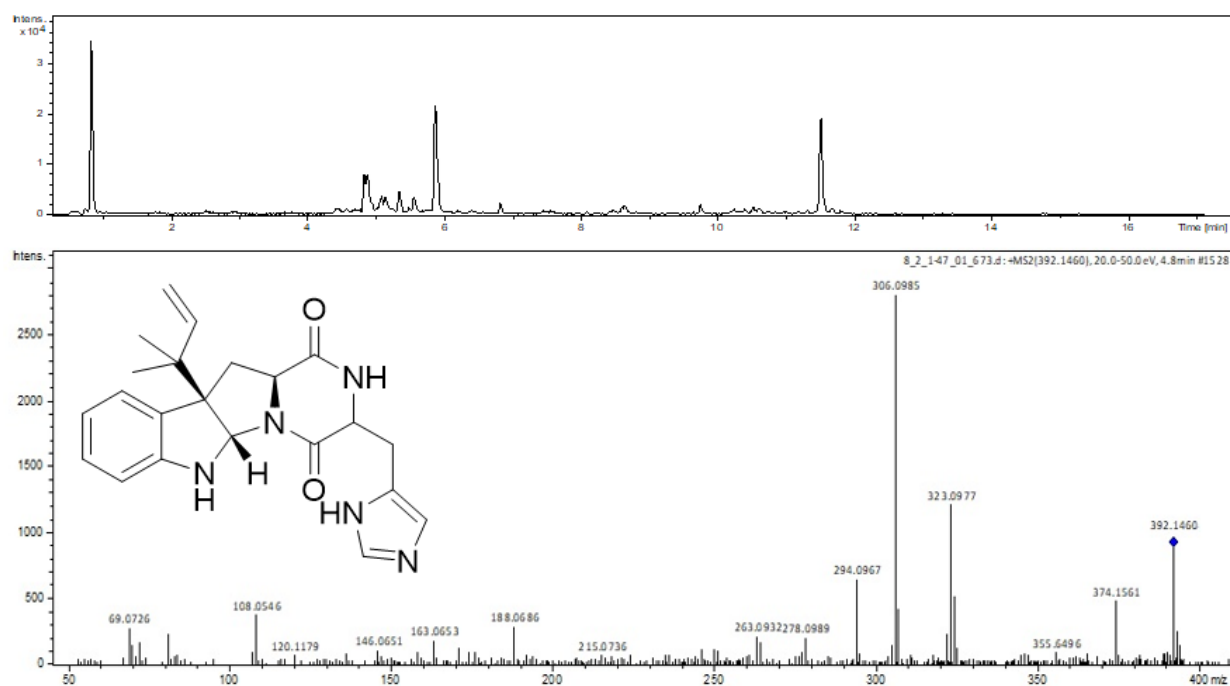


Figura 116. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da neoxalina (7) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

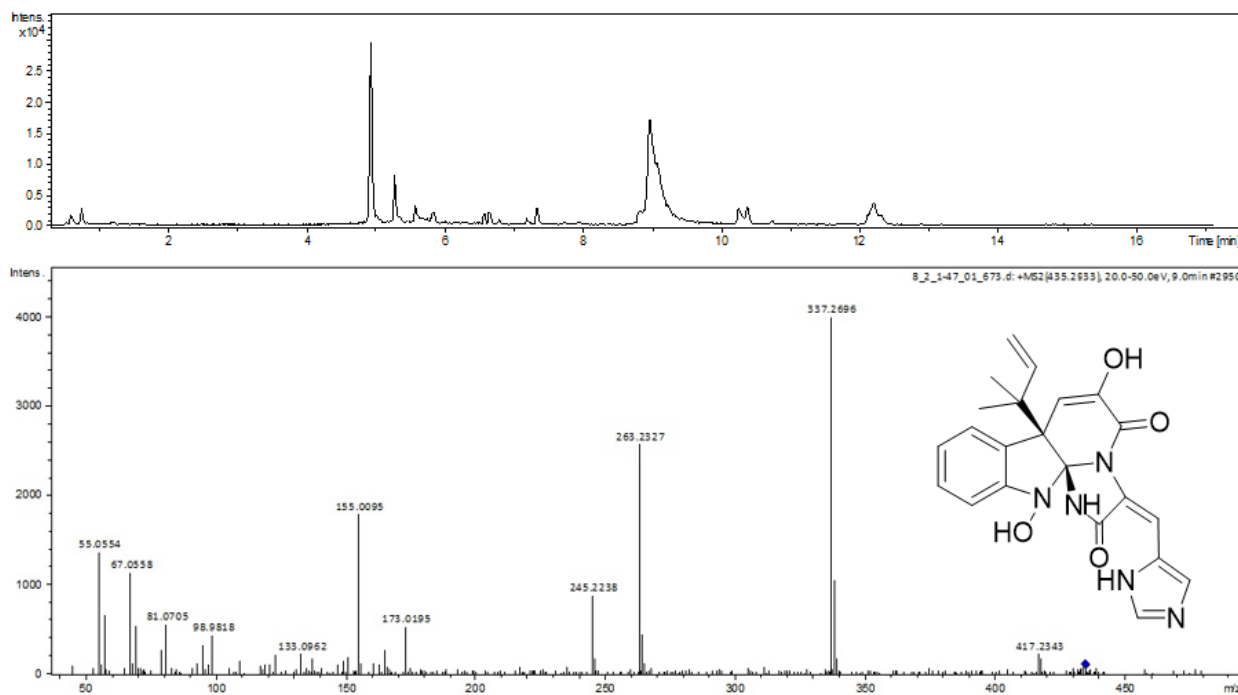


Figura 117. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (8) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

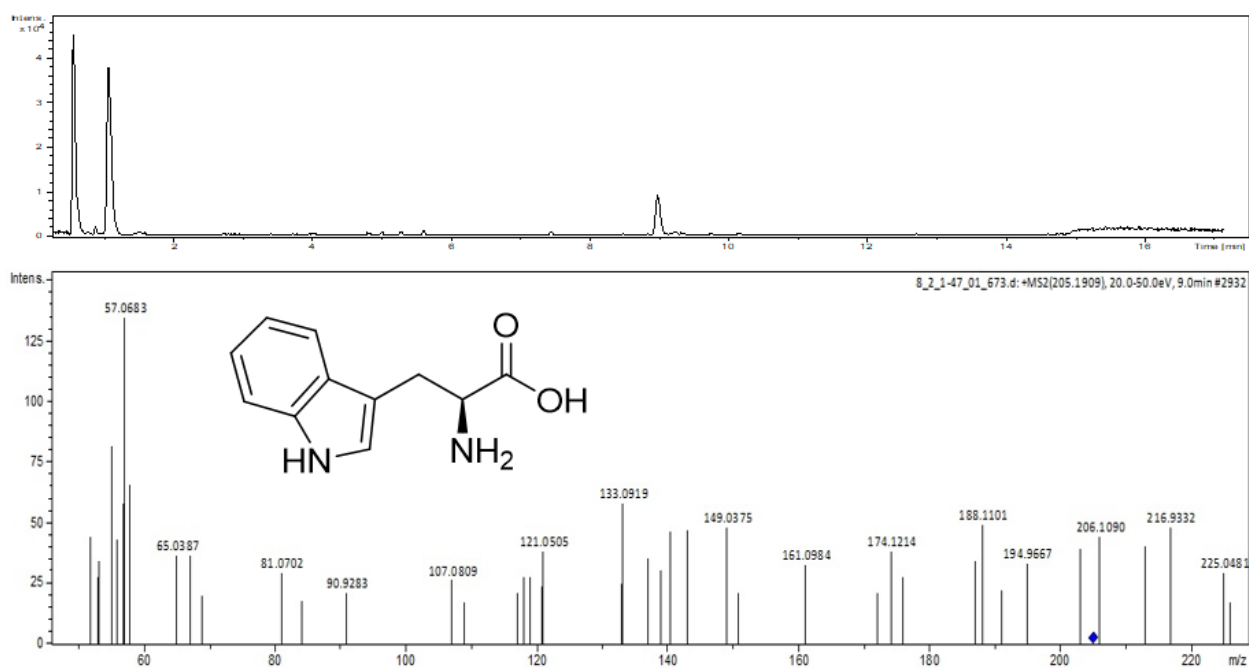


Figura 118. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (**9**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

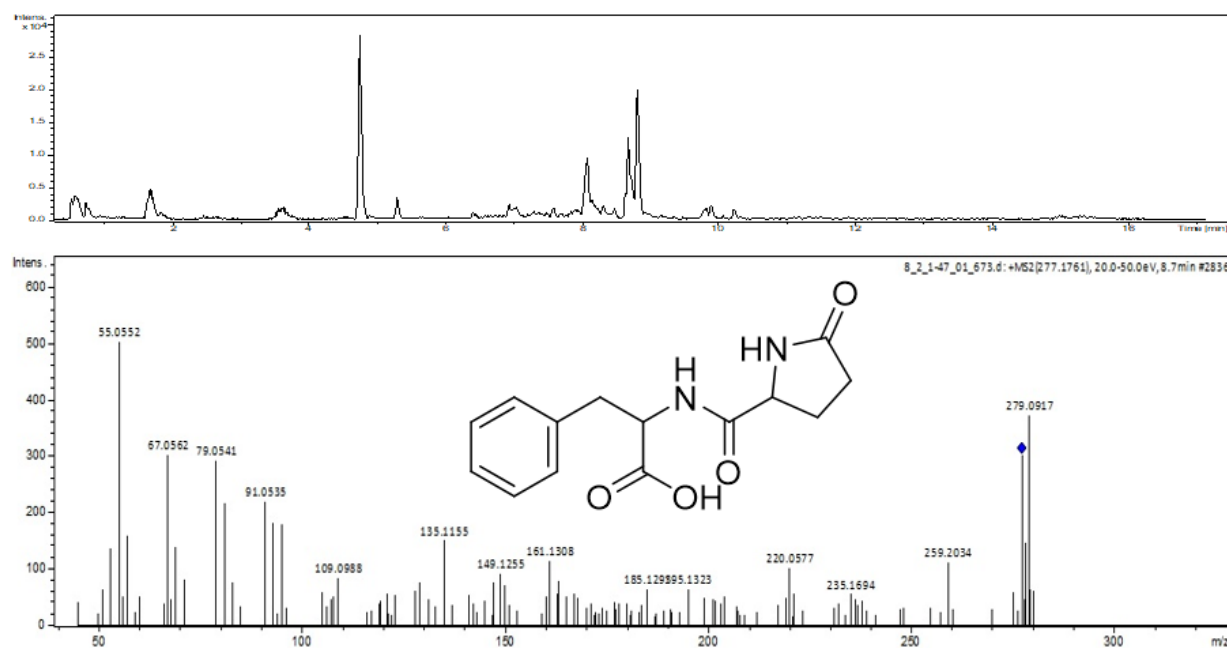


Figura 119. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piroglutamilvalina (**10**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

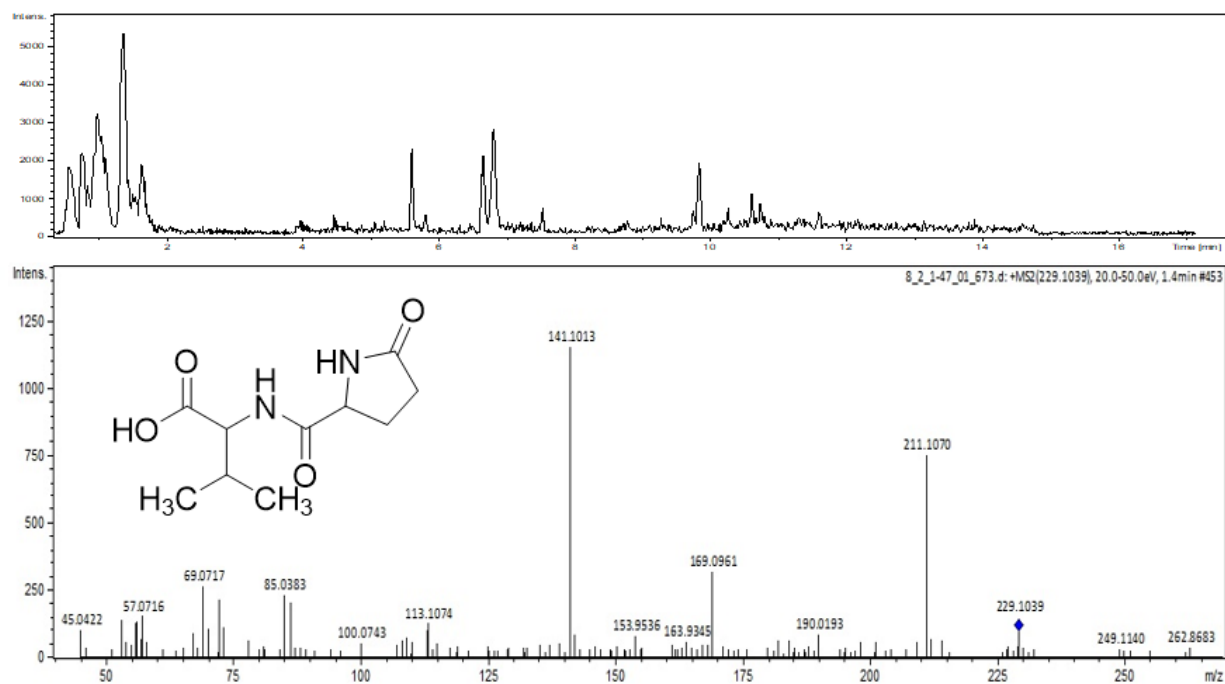


Figura 120. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (**11**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

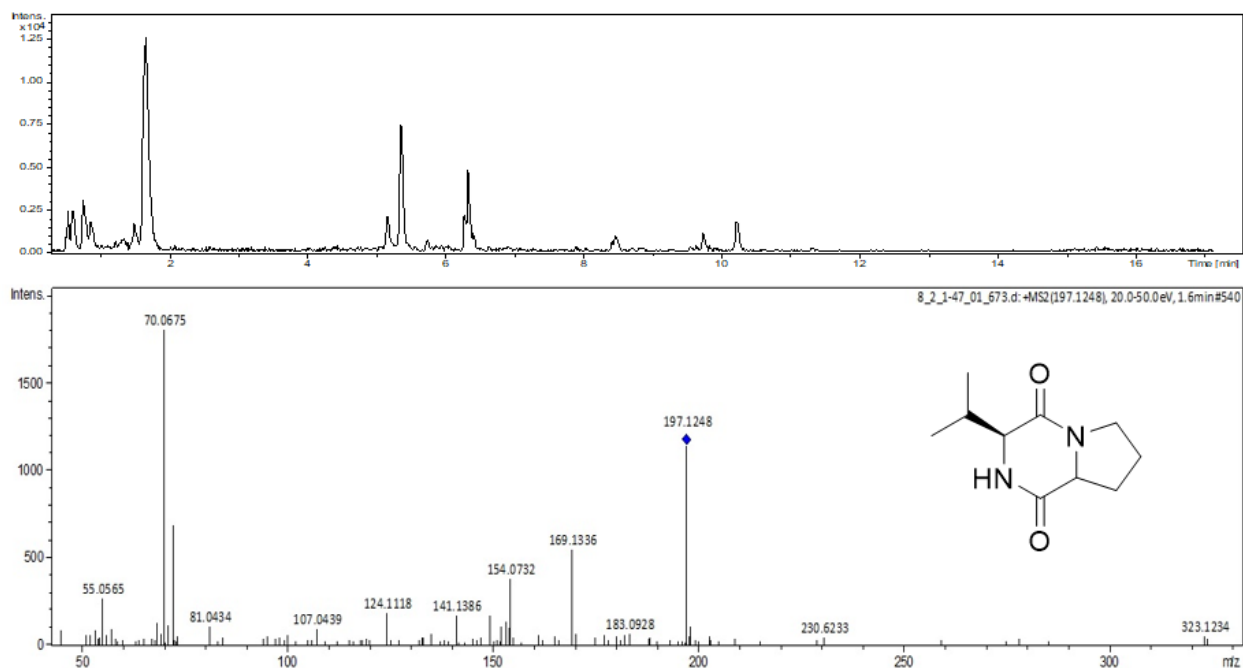


Figura 121. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (**12**) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

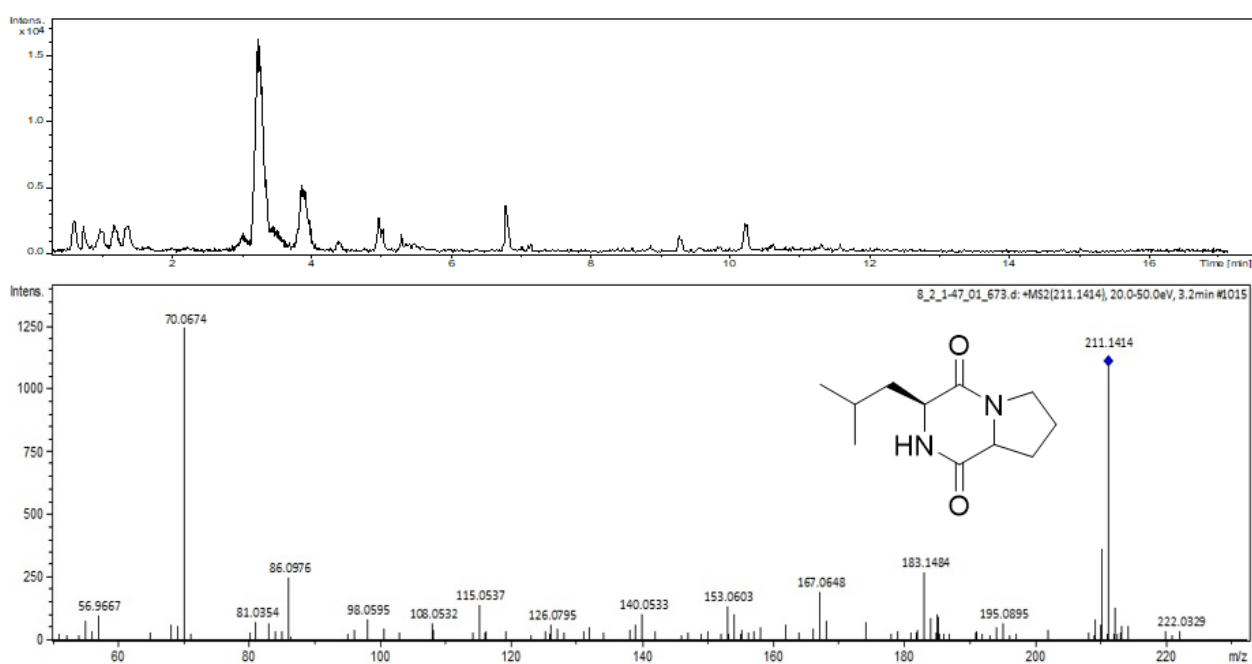


Figura 122. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

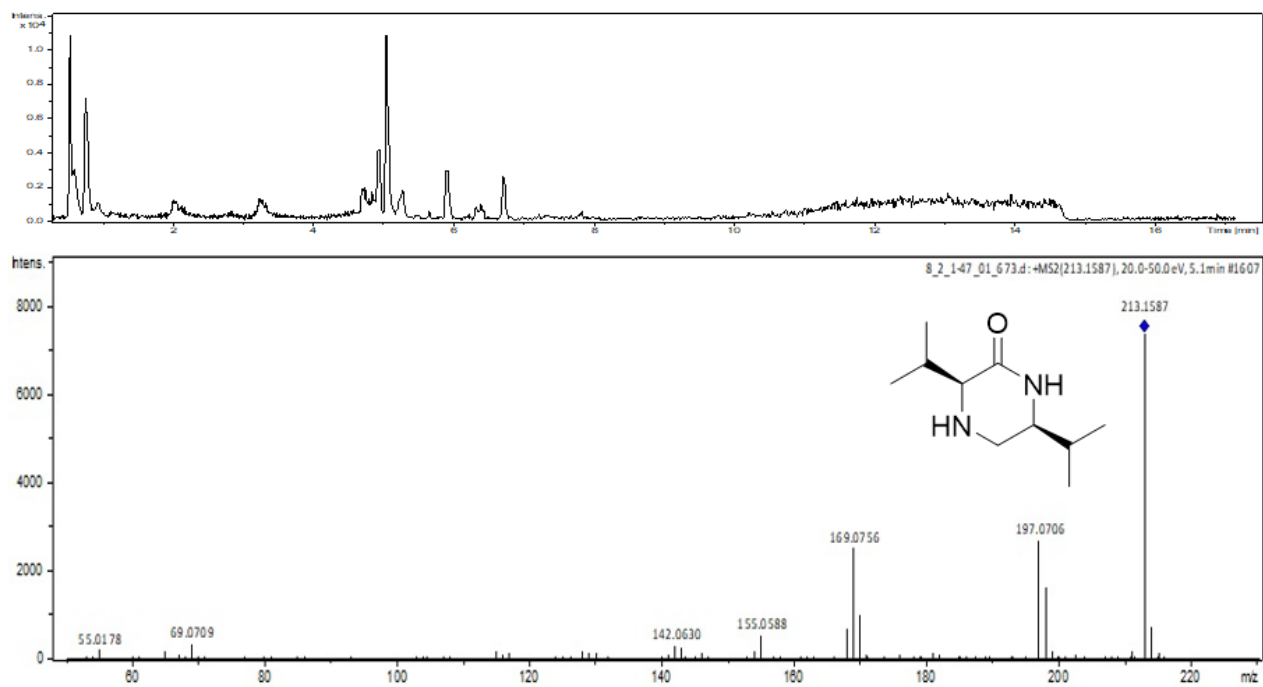


Figura 123. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

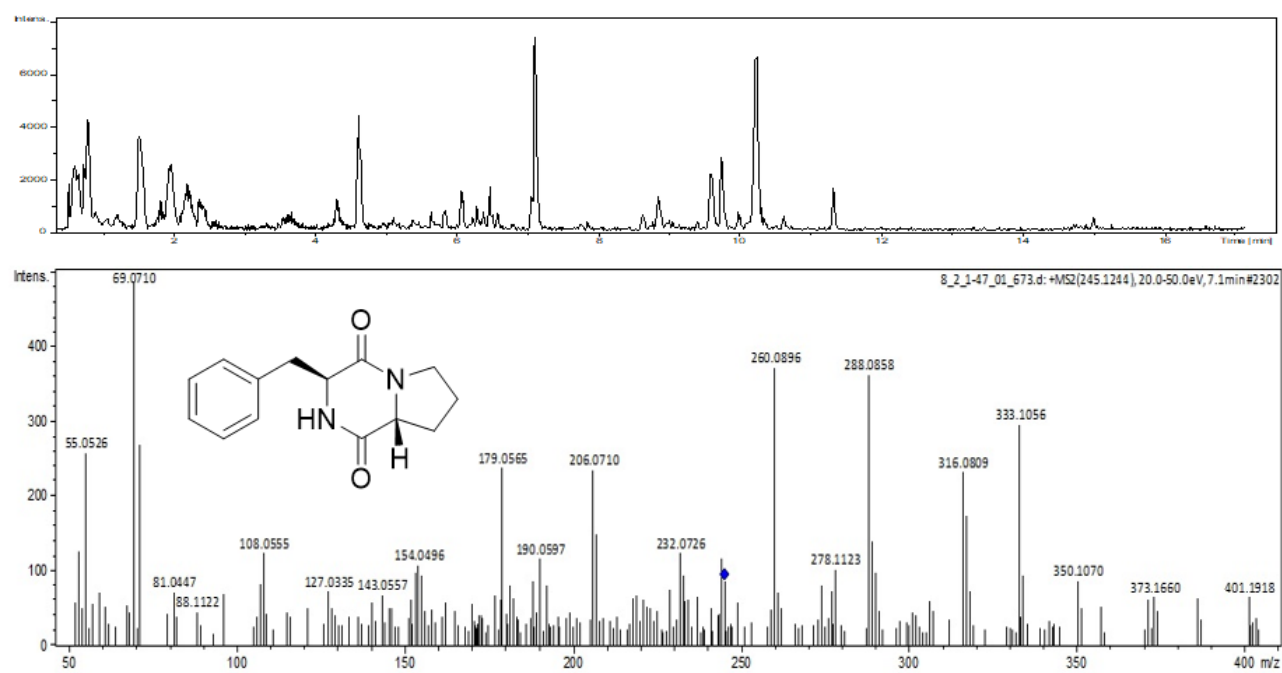


Figura 124. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-leucina (16) obtido do extrato preparado em meio ISP2.

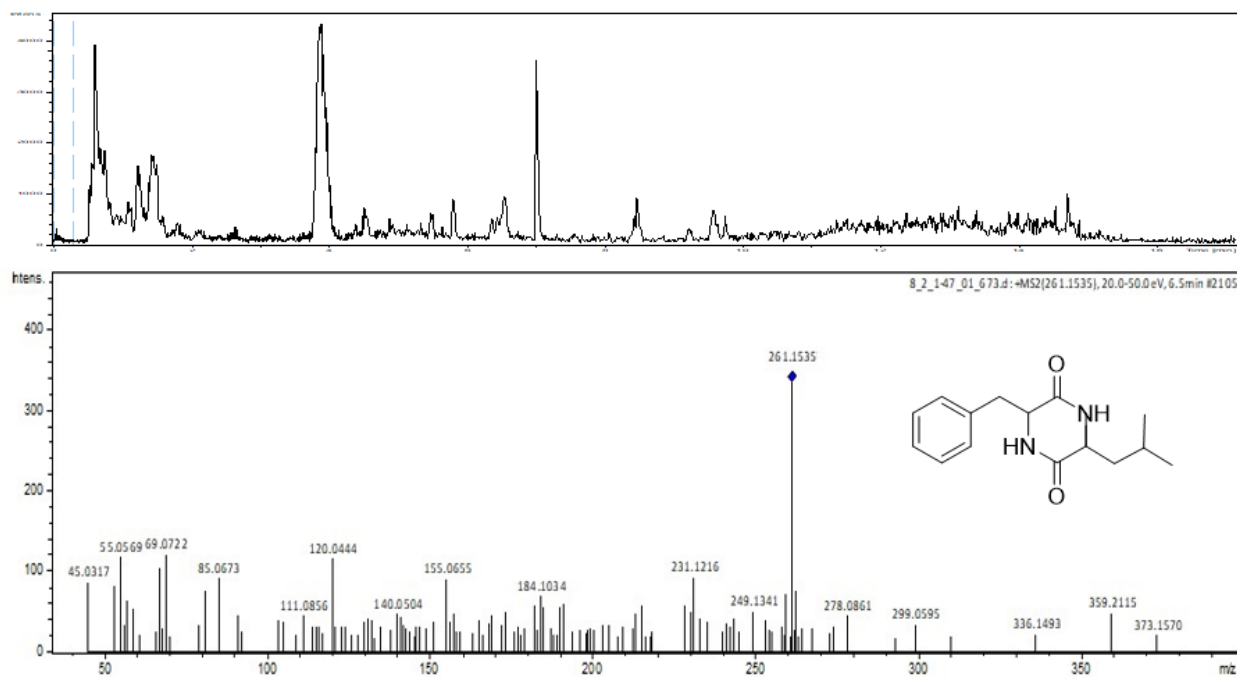


Figura 125. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina A (1) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

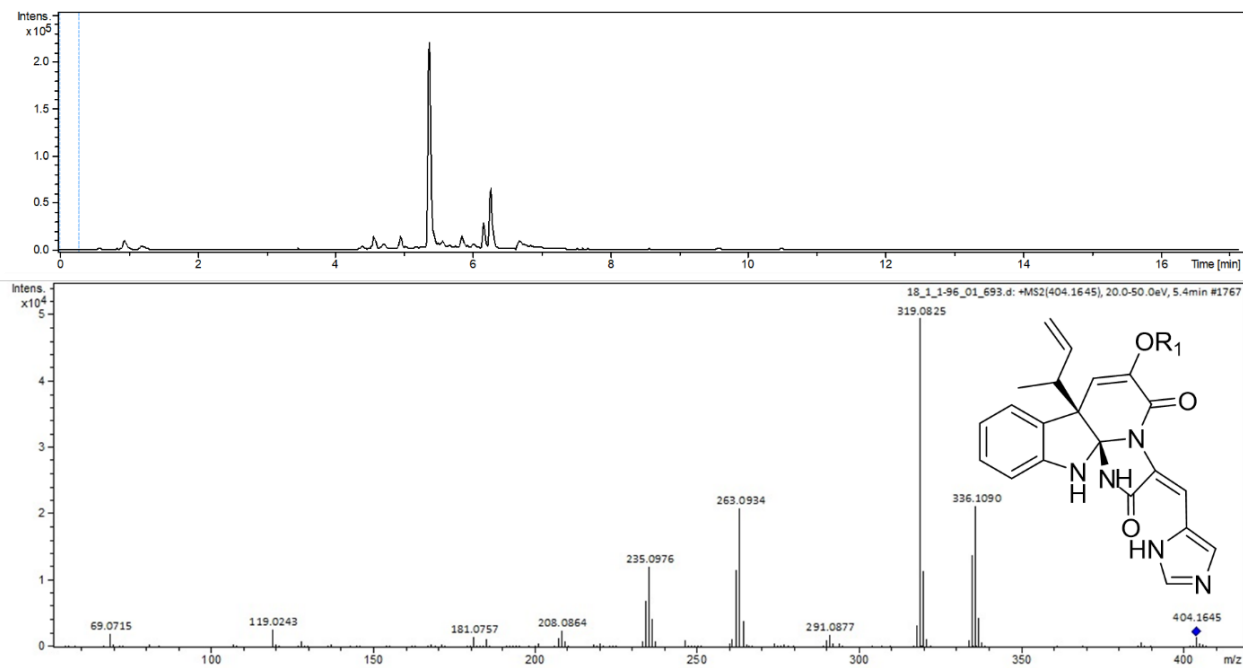


Figura 126. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da glandicolina B (2) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

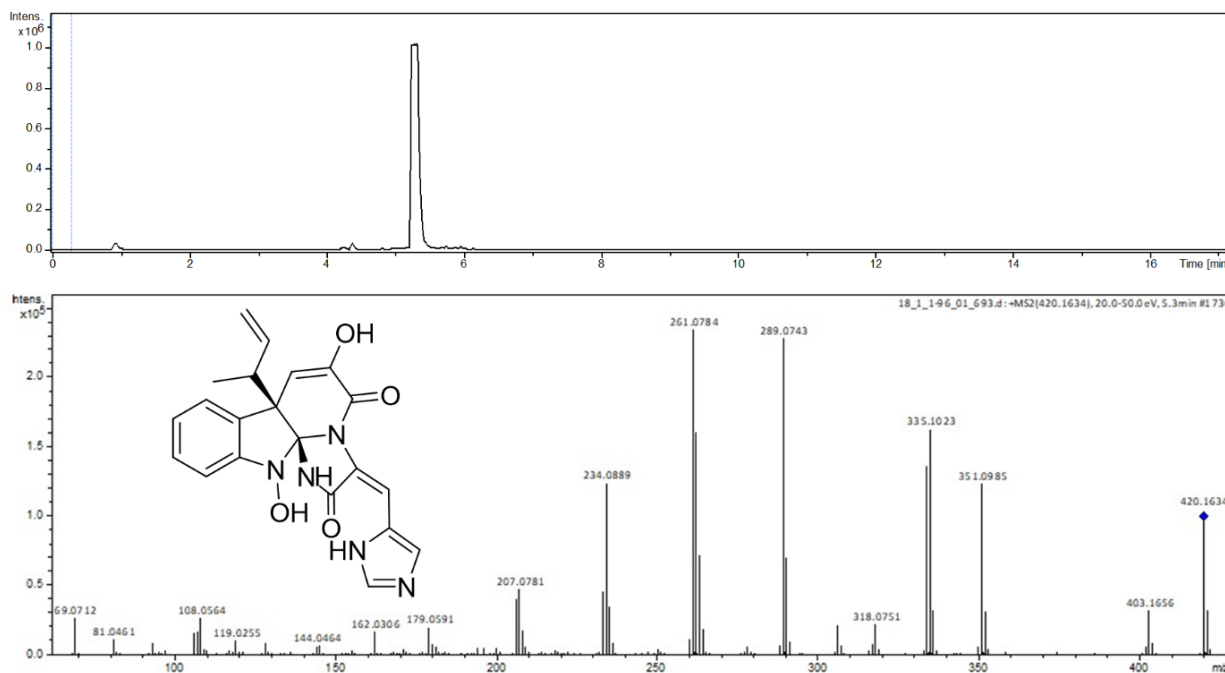


Figura 127. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da oxalina (3) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

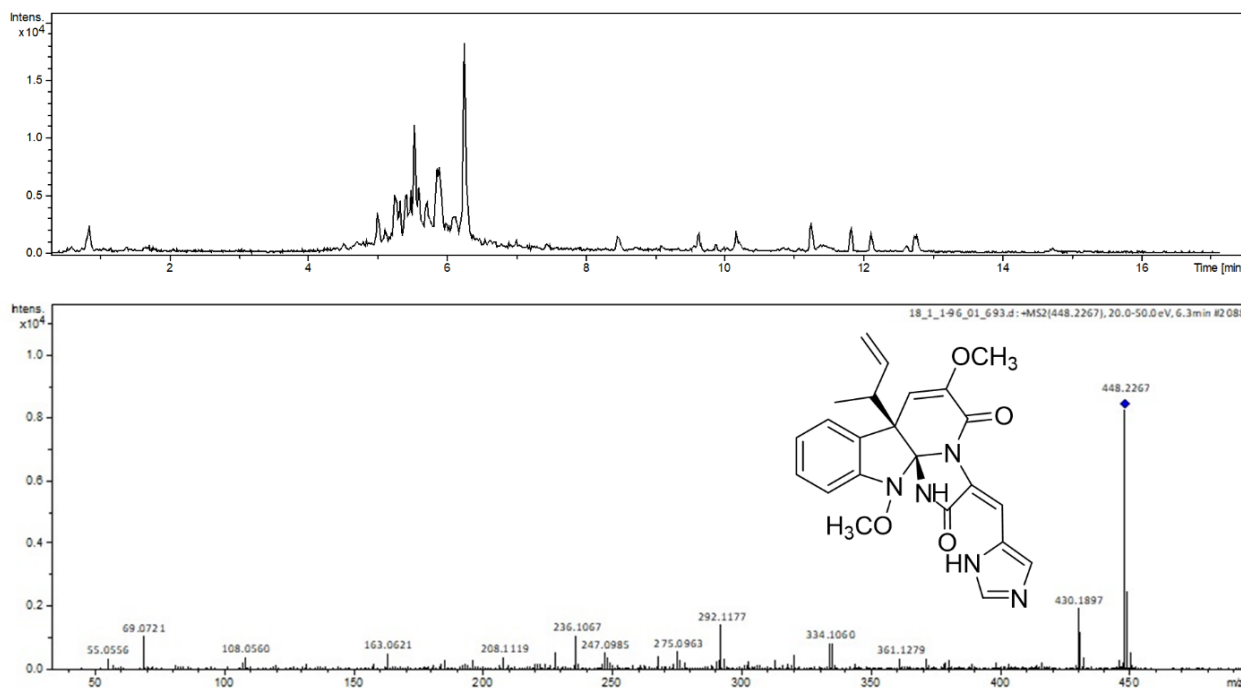


Figura 128. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da meleagrina (**4**) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

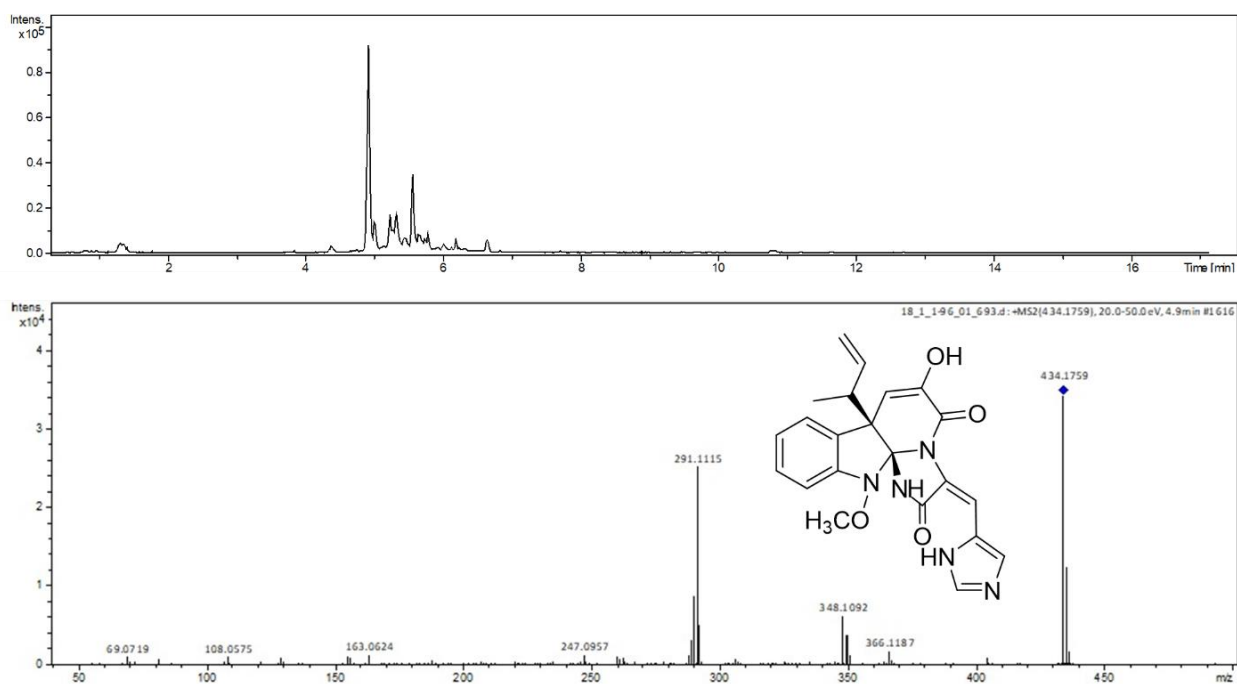


Figura 129. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina C (**5**) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

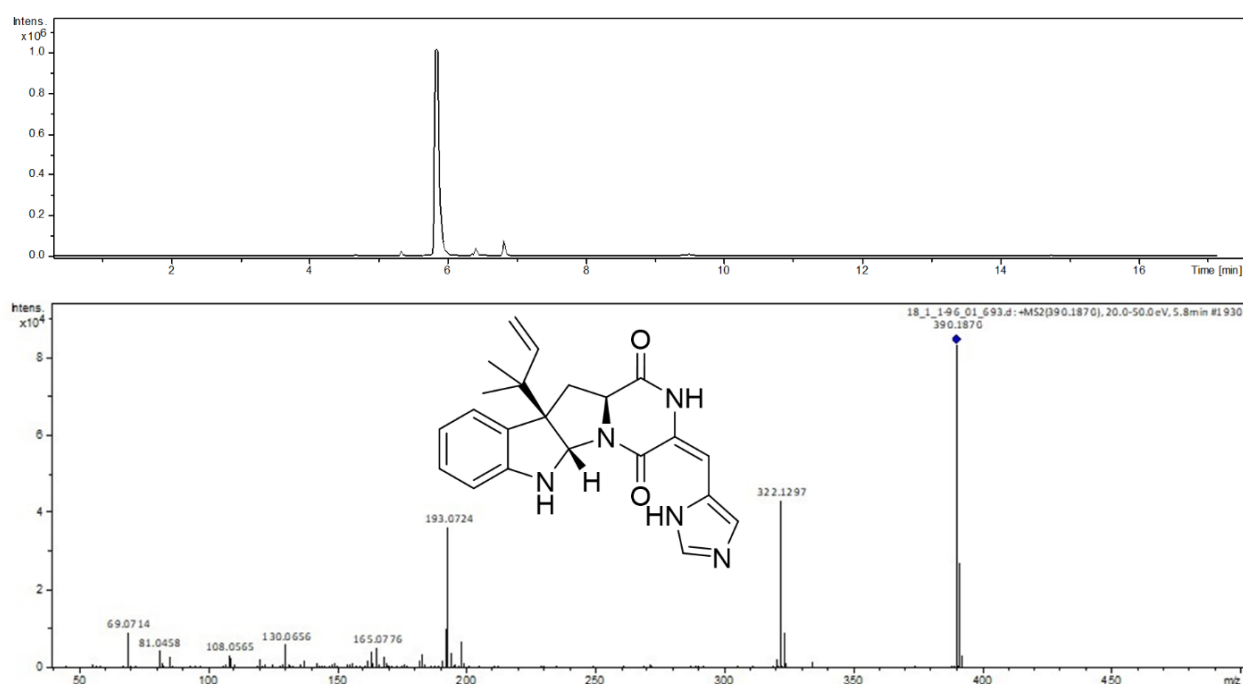


Figura 130. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da roquefortina D (**6**) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

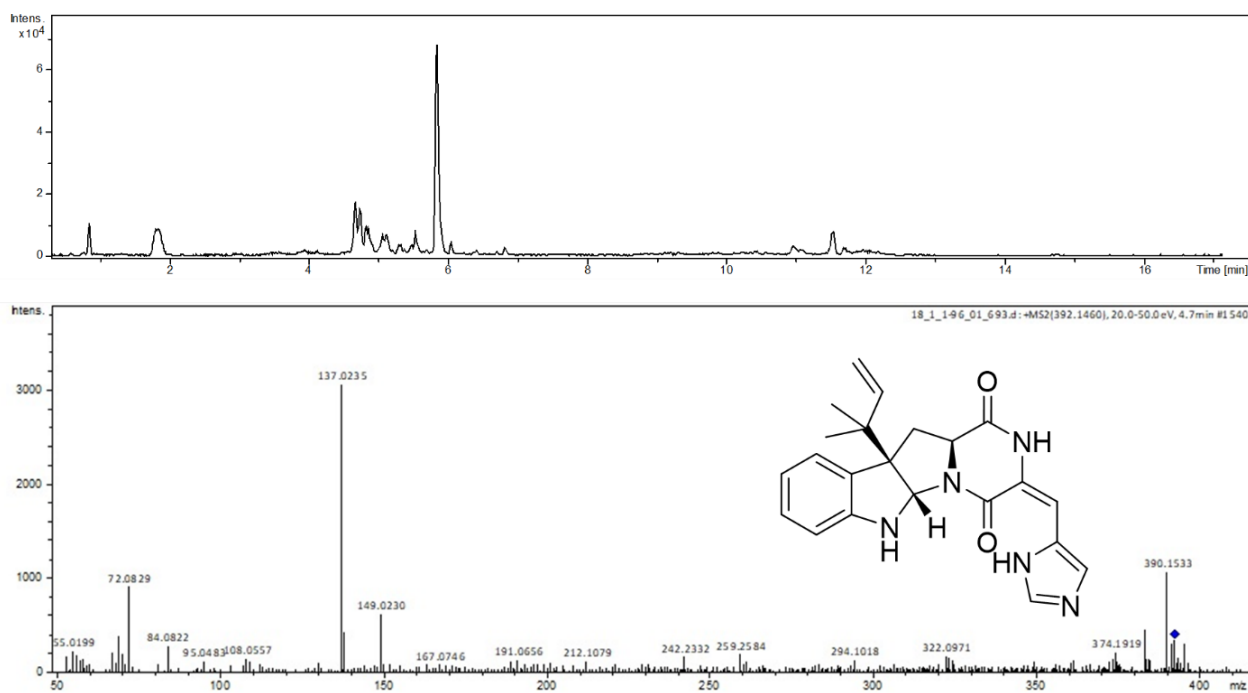


Figura 131. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da triptofano (**8**) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

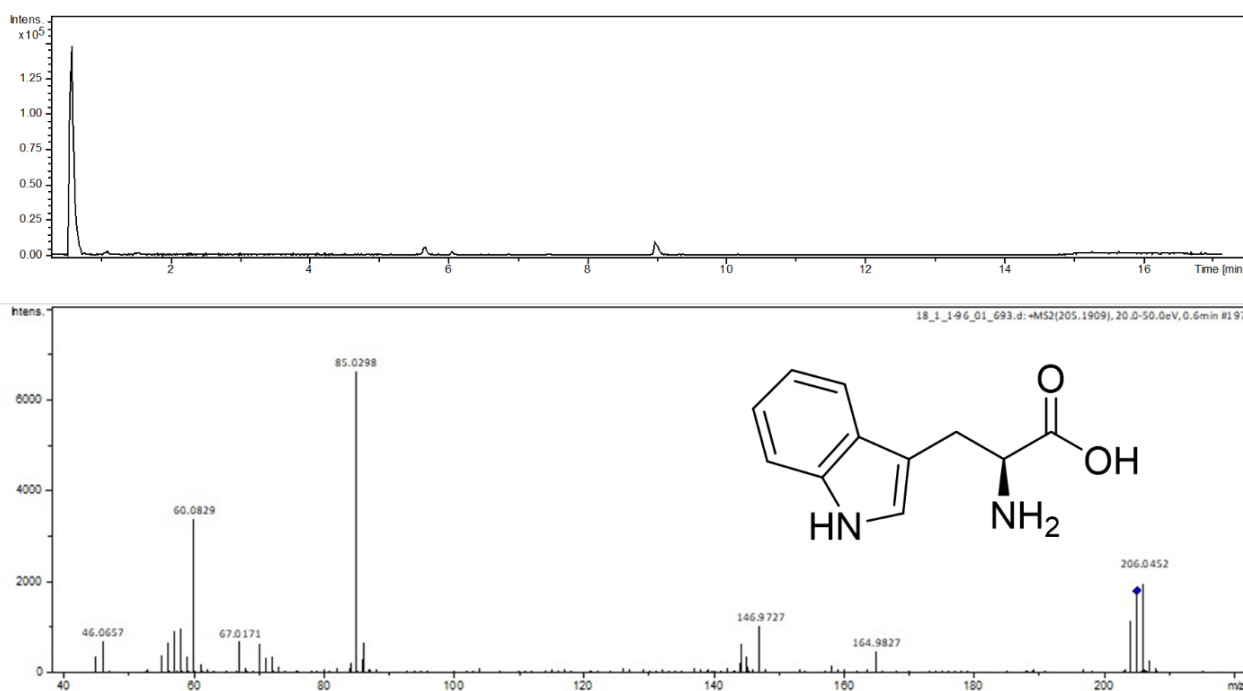


Figura 132. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da piruglutamilfenilalanina (9) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

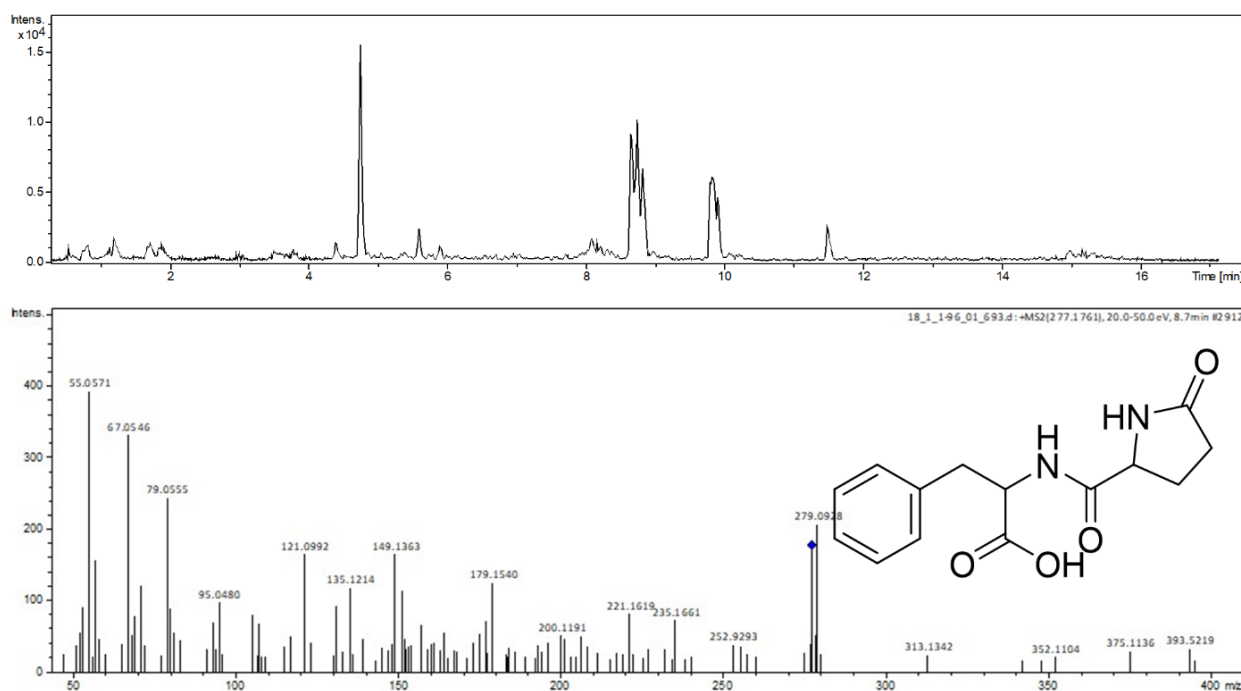


Figura 133. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-prolina-L-valina (11) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

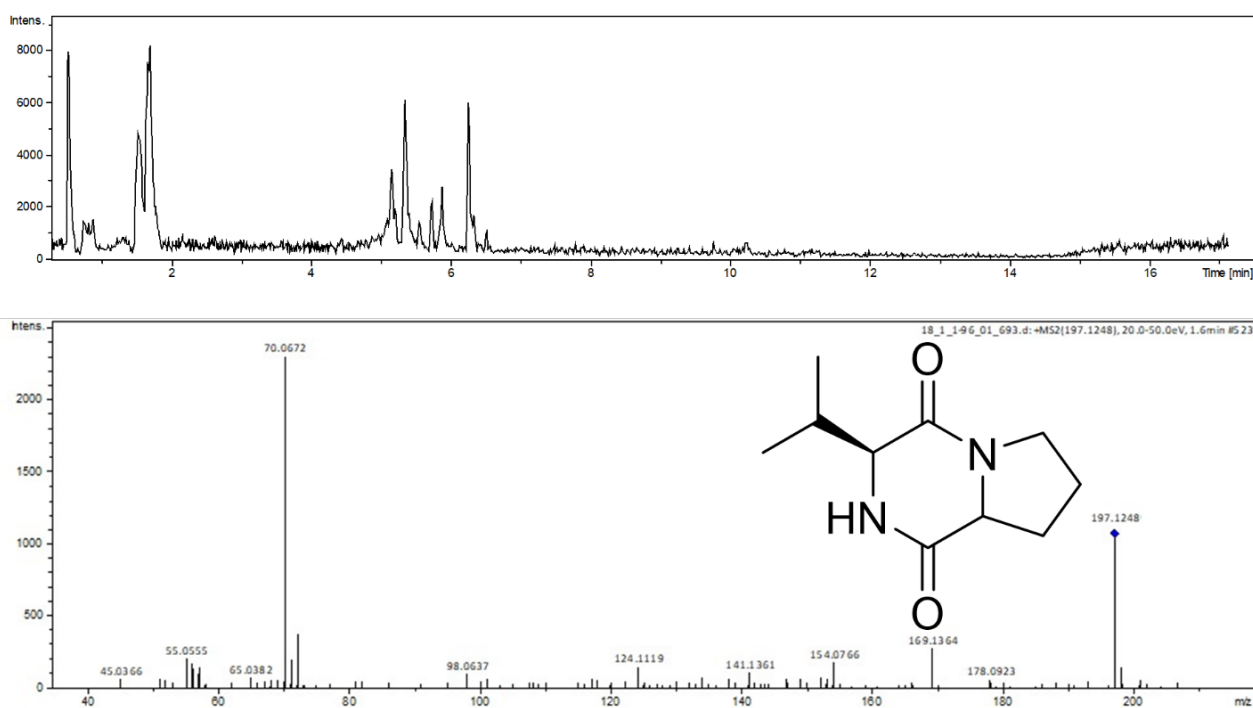


Figura 134. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-leucina-L-prolina (12) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

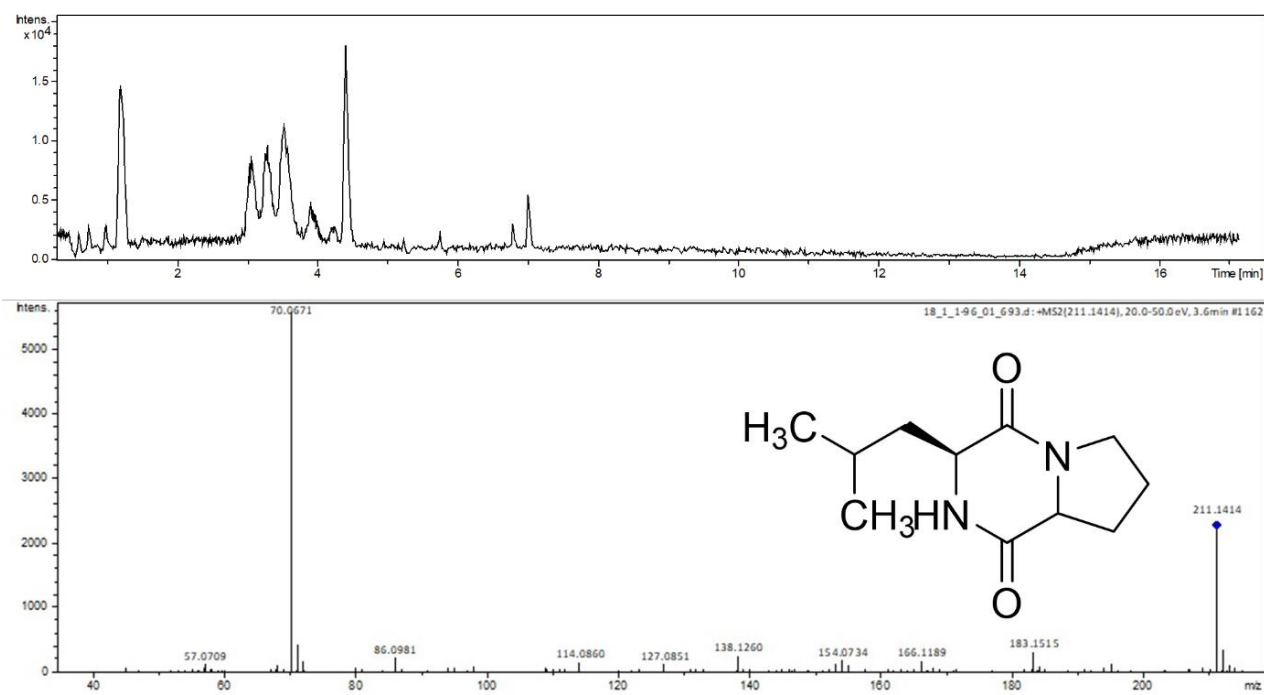


Figura 135. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-4-hidroxi-D-prolina (13) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

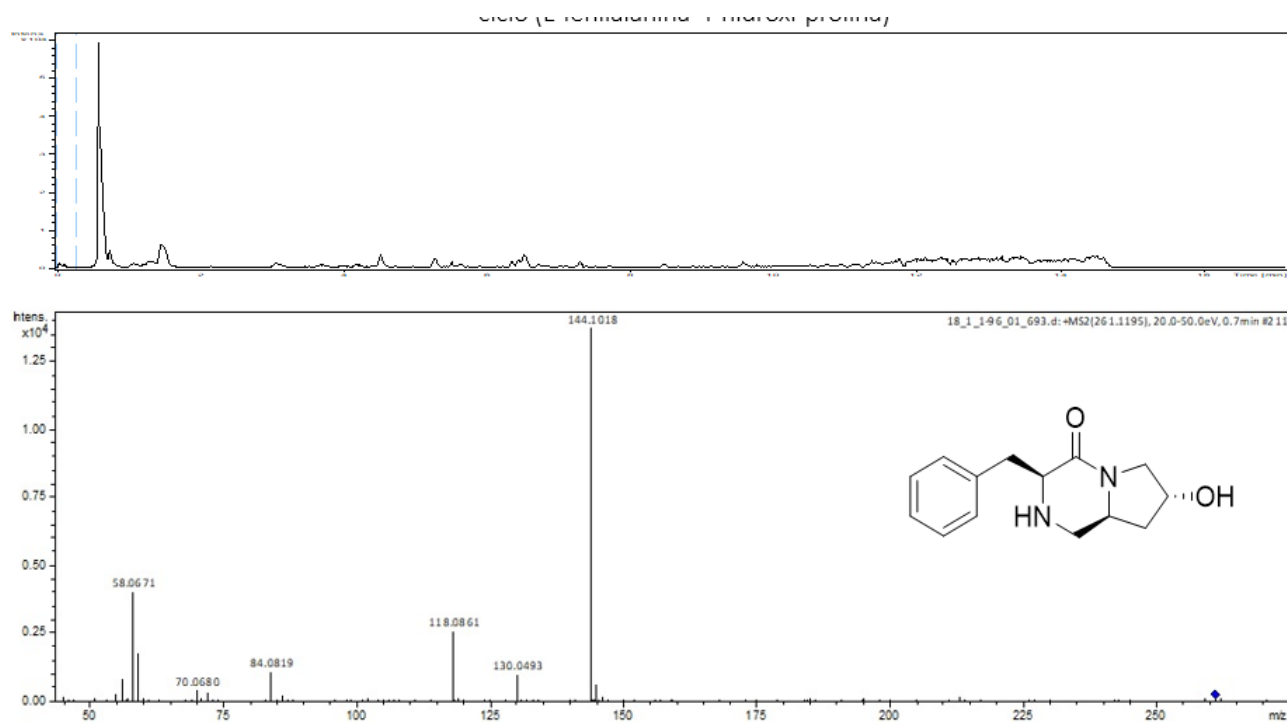


Figura 136. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo L-valina-L-leucina (14) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

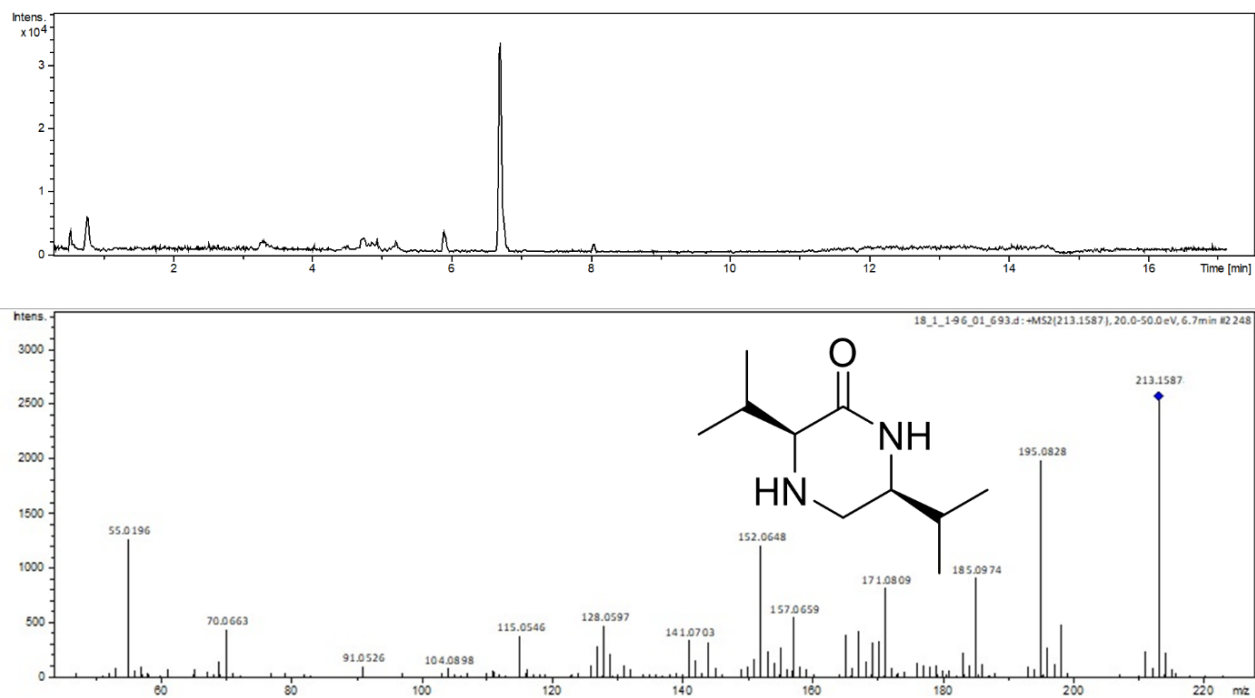


Figura 137. Cromatograma e espectro MS/MS (respectivamente) da ciclo fenilalanina-D-prolina (15) obtido do extrato preparado em meio sabourand.

