

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Produção de haloalcaloides por fungos de ambiente
terrestre”**

José Vinícius da Silva*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista CAPES-SISBIOTA**

São Carlos - SP

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato José Vinícius da Silva, realizada em 02/09/2016:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Profa. Dra. Bianca Ferreira da Silva
UNESP

Profa. Dra. Angela Regina Araujo
UNESP

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Michelli Massaroli da Silva
UFSCar

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente na minha vida e me dar forças para continuar.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos 10 anos de convivência, pela orientação, amizade e por me fornecer condições de chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Karl-Heinz vanPée, Dr. Eugenio Patallo e Liane Flor por todos os ensinamentos e ajuda no trabalho durante o período de doutorado-sanduíche na Technische Universität Dresden.

Aos meus pais, Sônia e José Roberto, a minha irmã Liliane e meu sobrinho Pedro por todo o apoio e incentivo nestes anos, sejam no Brasil ou na Alemanha, em São Carlos ou Marília vocês sempre estiveram comigo.

A toda minha família, em especial as minhas vó Nina (*in memoriam*) e vó Celis (*in memoriam*), que sempre torceram por mim e independente de onde estejam estão olhando por mim.

A todos os amigos do LaBioMMi pela convivência nestes 10 anos, em especial estes que me acompanharam neste período: Luciana, Taícia, Bianca, Lívia, Natália, Enzo, Ana Carolina. A realização deste trabalho com vocês foi muito mais fácil, sejam pelas discussões científicas, os cafés da tarde e as cervejas. Muito obrigado!

Aos meus grandes amigos Leonilson, Thiago Tasso, Gustavo, Fabio, Cíntia, Amanda, Marina (Garça), Malu, Taciane, Livia, Héctor, Enzo e Carol. Obrigado por todos os anos de convivência e por toda a força desde a graduação. A Carol por ter me ajudado na etapa final da tese, muito obrigado!

Aos amigos e colegas de trabalho da JLA Brasil - Laboratório de Análise de Alimentos pela convivência, pelas cervejas semanais e pela paciência nos últimos meses.

A todos os professores do Departamento de Química da UFSCar pelos ensinamentos adquiridos durante a graduação, mestrado e doutorado. Agradeço especialmente a Profa. Dra. Rose Maria Carlos além de transmitir seu conhecimento e pela amizade durante anos.

A todos os funcionários do DQ-UFSCar por todo o suporte prestado neste trabalho.

A CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche concedidas.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIACOES

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata-dextrose-gar
DCM	Diclorometano
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
LC-HRMS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry tandem mode coupled to Mass Spectrometry</i>
Hex	Hexano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
gDNA	DNA genômico
LaBioMMi	Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos
L	<i>Litros</i>
<i>m/z</i>	<i>Relao massa/carga</i>
MeOH	Metanol
mL	Mililitros

MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
ODS	Octadecilsilano (C-18)
<i>OSMAC</i>	<i>One Strain Many Compounds</i>
PDA	<i>Photodiode Array</i>
TIC	<i>Total Ions Chromatogram</i>
t _R .	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Abundância natural de haletos na natureza em mg/kg.....	02
Tabela 1.2: Cinco classes de halogenases e suas especificidades. (adaptado de BLASIAK, 2009).....	10
Tabela 3.1: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.....	29
Tabela 3.2: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da clororoquefortina C.....	29
Tabela 3.3: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.....	30
Tabela 3.4: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da clororoquefortina C.....	31
Tabela 3.5: Composição da fase móvel utilizada na separação do extrato em larga escala.....	32
Tabela 3.6: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.....	33
Tabela 3.7: Condições utilizadas no espectrômetro de massa.....	34
Tabela 3.8: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.....	35
Tabela 3.9: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da clororoquefortina C.....	35
Tabela 3.10: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.....	37
Tabela 3.11: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da bromoroquefortina C.....	37
Tabela 3.12: Condições experimentais para PCR.....	42
Tabela 4.1: Dados obtidos por HRMS/MS para os alcaloides derivados da rota dos alcaloides dicetopiperazínicos.....	70
Tabela 4.2: Referências de fungos produtores de metabólitos halogenados e suas sequências de aminoácidos para criação de novos primers degenerados.....	91

Tabela 4.3: Resultado da inibição celular de algumas linhagens tumorais na presença de roquefortina C e bromoroquefortina C.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Exemplos de metabólitos secundários halogenados.....	04
Figura 1.2: Mecanismo de ação da droga clonidina é diretamente influenciado pela posição dos átomos de cloro presentes em sua estrutura.....	05
Figura 1.3: Estruturas do clamidospirol, bromometilclamidosporol A e B, respectivamente.....	12
Figura 1.4: Estrutura da roquefortina C e 11-bromoroquefortina C, produzidas por <i>P. chrysogenum</i>	15
Figura 3.1: Redução do corante MTT para MTT formazana, utilizado na detecção da atividade citotóxica de células tumorais.....	49
Figura 4.1: Espectro de íons fragmentos de m/z 424 correspondente à clororoquefortina C e m/z 390 referente à roquefortina C.....	55
Figura 4.2: Estrutura da clororoquefortina C, detectada em extratos do fungo <i>P. chrysogenum</i>	56
Figura 4.3: Curva de produção da roquefortina C produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i>	57
Figura 4.4: Curva de produção da roquefortina C produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i>	57
Figura 4.5: Cromatogramas de íons extraídos das bandas cromatográficas que possuíam íons com perfil isotópico característico de moléculas contendo átomos de bromo.....	59
Figura 4.6: Espectros de massas das moléculas contendo átomos de halogênios em suas estruturas.....	60
Figura 4.7: Espectro de MS e MS/MS da roquefortina C.....	62
Figura 4.8: Espectro de MS e MS/MS da bromoroquefortina C.....	63
Figura 4.9: Espectro de MS e MS/MS do íon m/z 470.....	64
Figura 4.10: Espectro de MS e MS/MS do íon m/z 484.....	65

Figura 4.11: Estruturas propostas para os alcaloides isolados e detectados de <i>Penicillium chrysogenum</i>	69
Figura 4.12: Rota biossintética proposta para a formação dos alcaloides dicetopiperazínicos.....	72
Figura 4.13: Detecção do bromotriptofano por experimentos de MS/MS (SRM e íons fragmentos de m/z 283, respectivamente) após a reação do triptofano com NaOBr.....	76
Figura 4.14: Espectros de MS/MS para cada banda cromatográfica detectada nas frações da reação do triptofano com NaOBr.....	77
Figura 4.15: Cromatogramas obtidos das reações do triptofano com diferentes volumes de NaOBr.....	79
Figura 4.16: Cromatograma do experimento de crescimento de <i>P. chrysogenum</i> em meio Czapek's com bromotriptofano.....	81
Figura 4.17: Cromatograma do experimento de crescimento de <i>P. chrysogenum</i> em meio Czapek's com mistura de aminoácidos e bromotriptofano.....	82
Figura 4.18: Cromatograma <i>full scan</i> e de íons selecionados do meio líquido para o experimento de crescimento de <i>P. chrysogenum</i> em meio Czapek contendo 2% de extrato de levedura e bromotriptofano.....	83
Figura 4.19: Espectro de íons fragmentos da bromoroquefortina C.....	84
Figura 4.20: Cromatogramas no modo <i>full scan</i> , de íons selecionados (m/z 468) e íons fragmentos de m/z 468 para os produtos de reação da roquefortina C com NaOBr.....	85
Figura 4.21: Cromatogramas provenientes dos ensaios enzimáticos para detecção de uma possível halogenase presente em <i>Penicillium chrysogenum</i>	87

Figura 4.22: Gel de agarose revelado com brometo de etídio com as frações contendo DNA genômico de <i>Penicillium chrysogenum</i> . (A) Marcador 1kb; (B-K) frações de gDNA.....	88
Figura 4.23: Comparação das sequências de halogenases relatadas na literatura e utilizadas para desenho dos <i>primers</i>	89
Figura 4.24: Gel de agarose 1% dos produtos da PCR com as diferentes combinações de <i>primers</i>	90
Figura 4.25: Alinhamento das sequências de aminoácidos das halogenases produzidas por fungos.....	95
Figura 4.26: Gel de agarose dos produtos de PCR utilizando os primers desenhados a partir de sequências de halogenases de fungos.....	96
Figura 4.27: Sequenciamento do produto de PCR entre os primers J5 e J7....	97
Figura 4.28: Sequência de aminoácidos traduzida dos nucleotídeos obtidos do produto de PCR (PEA_1).....	97
Figura 4.29: Resultados do BLAST: Principal domínio obtido no alinhamento e similaridade das enzimas depositadas no banco de dados com o fragmento PEA_1.....	98
Figura 4.30: Comparação da sequência de aminoácidos entre o fragmento PEA_1 e radH de <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40.....	99
Figura 4.31: Dendrograma de todas as halogenases dependentes de FADH ₂ para organismos procariotos e eucariotos.....	100
Figura 4.32: Comparação entre a halogenase de <i>Penicillium islandicum</i> e o fragmento obtido do gDNA de <i>Penicillium chrysogenum</i>	101
Figura 4.33: Eletroforese em gel da digestão do gDNA de <i>Penicillium chrysogenum</i>	103
Figura 4.34: Auto-radiografia obtida do processo de Southern Blot para o gDNA de <i>Penicillium chrysogenum</i>	104

Figura 4.35: Mapa do vetor pLITMUS28 utilizado para clonagem dos fragmentos de interesse. (Retirado de http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/LITMUS28/).....	105
Figura 4.36: BLAST obtido após o sequenciamento dos clones selecionados.....	107
Figura 4.37: Estruturas das rugulovasinas, produzidas por <i>T. wortmannii</i>	110
Figura 4.38: Gel das PCR de <i>T. wortmannii</i>	111
Figura 4.39: Resultado do BLAST do fragmento obtido de <i>Talaromyces wortmannii</i>	111
Figura 4.40: Auto-radiografia do experimento de Southern Blot para <i>T. wortmannii</i>	112
Figura 4.41: Dendrograma do gênero <i>Penicillium</i> em meio BDA.....	114
Figura 4.42: Dendrograma do gênero <i>Penicillium</i> em meio Malte.....	115
Figura 4.43: Dendrograma do gênero <i>Penicillium</i> em meio Aveia.....	116
Figura 4.44: Comparação entre os espectros de massa para as diferentes linhagens de <i>Penicillium citrinum</i> . <i>Penicillium citrinum</i> CML CS147 (vermelho) e <i>Penicillium citrinum</i> CML CS148 (preto).....	118
Figura 4.45: Dendrograma das linhagens de <i>Aspergillus</i> crescidas em meio de aveia.....	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Porcentagem de fármacos vendidos atualmente contendo átomos de halogênio.....	05
Esquema 1.2. Halogenação de flavonoides pela enzima cloroperoxidase de <i>C. fumago</i>	11
Esquema 1.3: Precursores derivados do triptofano para formação de alcaloides indólicos de origem fúngica.....	13
Esquema 3.1: Resumo do processo de hibridização do gDNA utilizado para detecção das halogenases de <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>Talaromyces wortmannii</i>	46
Esquema 3.2: Procedimento Experimental para crescimento e análise de microrganismos por MALDI-TOF.....	51
Esquema 4.1: Proposta de fragmentação para os metabólitos isolados e detectados no extrato de <i>Penicillium chrysogenum</i>	68
Esquema 4.2: Mecanismo proposto para a formação dos isômeros do bromotriptofano.....	75
Esquema 4.3: Proposta de fragmentação para o bromotriptofano.....	77
Esquema 4.4: Proposta biossintética para a formação das roquefortinas halogenadas detectadas e isoladas de <i>Penicillium chrysogenum</i>	108

RESUMO

PRODUÇÃO DE HALOALCALOIDES POR FUNGOS DE AMBIENTES TERRESTRES: A produção de metabólitos secundários por microrganismos é uma ferramenta para encontrar novas substâncias com possíveis atividades farmacológicas de interesse humano. Desta forma, a busca por ambientes mais extremos ou até mesmo a exposição dos isolados em condições extremas levam à produção de novos produtos naturais. O fungo *Penicillium chrysogenum* foi capaz de produzir alcaloides contendo átomo de bromo derivados da rota biossintética dos alcaloides dicetopiperazínicos. Em condições naturais, o fungo produz a roquefortina C e quando ao meio de cultura foi adicionado brometo de amônio, o microrganismo produziu a 11-bromoroquefortina D, 11-bromoroquefortina C e 17-oxi-11-bromoroquefortina C. Estes metabólitos tem origem biossintética através da condensação do triptofano com a histidina e o grupo trimetilalil. Há relatos na literatura que a primeira etapa biossintética de alcaloides halogenados derivados do triptofano seria a halogenação deste aminoácido. A síntese do bromotriptofano foi realizada e foi verificada a formação de três regioisômeros. O extrato contendo os isômeros foi adicionado ao meio de cultura durante o crescimento do fungo e por análises de LC-HRMS/MS observou-se a formação da 11-bromoroquefortina C. A síntese da roquefortina C com hipobromito de sódio também levou à formação da 11-bromoroquefortina C. Na busca do gene responsável pela expressão da halogenase em *Penicillium chrysogenum* foi obtido um fragmento do gene compatível com halogenases depositadas em bancos de dados. De *Talaromyces wortmannii*, fungo isolado de *Mallus domestica*, produtor de alguns alcaloides halogenados conhecidos como rugulovasinas, isolou-se um fragmento de gene compatível com halogenases fúngicas. Linhagens pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*

isoladas e depositadas na micoteca do LaBioMMi foram cultivadas em meio sólido e analisadas por MALDI-TOF para construção de um banco de dados a partir do perfil obtido. Todos os organismos foram separados por gênero e agrupados em dendrogramas para a verificação da similaridade entre as espécies. Constatou-se também que a modificação do meio de cultura não influencia diretamente no perfil obtido dos microrganismos.

ABSTRACT

HALOALKALOIDS PRODUCTION BY TERRESTRIAL FUNGI: The production of secondary metabolites by microorganisms is a tool to find new substances with potential pharmacological activities of human interest. Thus, the search for more extreme environments or even exposure of isolated in extreme conditions lead to the production of new natural products. The fungus *Penicillium chrysogenum* was able to produce the containing bromine atom alkaloid derived from the biosynthetic pathway of dicetopiperazinic alkaloids. Under natural conditions, the fungus produces roquefortine C, when the culture medium was added ammonium bromide, the microorganism produced 11-bromoroquefortine D, 11-bromoroquefortine C and 17-oxy-11-C bromoroquefortine. These metabolites have biosynthetic origin by condensation of tryptophan with histidine and trimethylalil group. There are reports in the literature that the first biosynthetic step of halogenated alkaloid derivatives of tryptophan would be halogenation of this amino acid. The synthesis of bromotryptophan was performed and the formation of three regioisomers were detected. The extract containing the isomers was added to the culture medium during the growth of the fungus and analysis of LC-HRMS / MS observed the formation of 11-bromoroquefortine C. Synthesis of roquefortine C with sodium hypobromite has also led to the formation of 11-bromoroquefortine C. During the search of the gene responsible for the expression of halogenase in *Penicillium chrysogenum* a gene fragment compatible with halogenases deposited in databases was detected and isolated. In *Talaromyces wortmannii*, fungus isolated from *Mallus domestica*, producer of some halogenated alkaloid known as rugulovasins, a gene fragment compatible with fungal halogenases was also detected and isolated. Strains belonging to *Penicillium* and *Aspergillus* isolated and deposited in mycology

collection of LaBioMMi were grown on solid medium and analyzed by MALDI-TOF to build a database. All the microorganisms were separated by gender and grouped into dendrograms for checking the similarity between species. It was also found that the modification of the culture medium does not influence directly the profile obtained from microorganisms.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1 Metabólitos Secundários Halogenados e sua importância.....	02
1.2 Influência dos halogênios nas propriedades físico, químicas e biológicas nos metabólitos secundários.....	03
1.3 Indução de novas rotas metabólicas.....	06
1.4 Biossíntese de Metabólitos Halogenados.....	08
1.5 Biossíntese de alcaloides dicetopiperazínicos.....	12
1.6 Produção de alcaloides halogenados por <i>Penicillium chrysogenum</i> , por modificação do meio de cultura.....	14
1.7 Construção de bibliotecas de microrganismos por MALDI-TOF.....	15
2. Objetivos.....	20
3. Experimental.....	21
3.1 Reagentes.....	22
3.2 Tampões.....	22
3.3 Kit para purificação das bandas obtidas da PCR.....	22
3.4 Meios de Cultura.....	22
3.5 Soluções para Hibridização do DNA (<i>Southern Blot</i>).....	23
3.6 Solventes utilizados.....	24
3.7 Equipamentos.....	24
3.8 Suportes Cromatográficos.....	26
3.9 Outros materiais.....	26
3.10 Oligonucleotídeos.....	26

3.11	Parte Experimental.....	27
3.11.1	Reativação dos microrganismos utilizados nos experimentos.....	27
3.11.2	Cultivo do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> para a detecção de metabólitos halogenados contendo átomos de cloro.....	27
3.11.3	Análise por HPLC-MS/MS do experimento de produção de metabólitos clorados por <i>Penicillium chrysogenum</i>	28
3.11.4	Experimentos para estimativa de produção da roquefortina C e bromoroquefortina C.....	29
3.11.5	Isolamento da roquefortina C e bromoroquefortina C.....	31
3.11.6	Parâmetros para experimentos de detecção de outros metabólitos halogenados derivados dos alcaloides dicetopiperazínicos produzidos por <i>Penicillium chrysogenum</i>	32
3.11.7	Síntese <i>in vitro</i> do bromo triptofano a partir do hipobromito de sódio.....	34
3.11.8	Reação <i>in vitro</i> do triptofano com diferentes volumes de NaOBr.....	34
3.11.9	Experimentos com adição de bromotriptofano ao meio de cultura para produção da bromoroquefortina C.....	35
3.11.10	Cultivo do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> em meio líquido contendo triptofano e NH ₄ Br.....	36
3.11.11	Reação <i>in vitro</i> da roquefortina C com NaOBr.....	37
3.11.12	Preparo do extrato enzimático para detecção da atividade da halogenase.....	38
3.11.13	Ensaio de atividade para detecção da halogenase.....	39
3.11.14	Extração do DNA genômico de <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>Talaromyces wortmannii</i>	39

3.11.15	Eletrforese em gel de agarose.....	40
3.11.16	Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes.....	41
3.11.17	Purificação dos substratos separados por eletrforese em gel de agarose.....	42
3.11.18	Hibridização do DNA genômico de <i>Penicillium chrysogenum</i> pela técnica de <i>Southern Blot</i>	42
3.11.19	Clonagem dos fragmentos obtidos pela técnica de <i>Southern Blot</i> no vetor de clonagem pLITMUS28 – Reação de Ligação.....	46
3.11.20	Transformação da bactéria <i>E. coli</i> DH10B com os plasmídeos recombinantes de pLITMUS28.....	47
3.11.21	Extração e análise dos plasmídeos recombinantes pLITMUS28 de <i>E. coli</i> 10HB.....	47
3.11.22	Ensaio biológico da roquefortina e bromoroquefortina C.....	48
3.11.23	Experimentos de adição de substratos aromáticos e íons brometo para expressão da halogenase produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>Talaromyces wortmannii</i>	49
3.11.24	Condições de cultivo e análises das linhagens e <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> da biblioteca do LaBioMMi pra criação da biblioteca de espectros do MALDI-TOF.....	50
4.	Resultados.....	53
4.1	Produção da clororoquefortina C por <i>Penicillium chrysogenum</i>	54
4.2	Curva de crescimento e produção da roquefortina C e bromoroquefortina C.....	56

4.3	Adição de triptofano ao meio de cultura durante o crescimento de <i>Penicillium chrysogenum</i>	58
4.4	Detecção de outros metabólitos halogenados derivados dos alcaloides dicetopiperazínicos.....	59
4.5	Investigação da rota biossintética.....	70
4.6	Reação de halogenação do triptofano na presença de hipobromito de sódio.....	74
4.7	Formação do bromotriptofano <i>in vitro</i> com diferentes volumes de NaOBr.....	78
4.8	Adição de bromotriptofano ao meio de cultura durante o crescimento de <i>Penicillium chrysogenum</i>	80
4.9	Semi-síntese da bromoroquefortina C com NaOBr.....	85
4.10	Investigações iniciais do sistema enzimático responsável pelas reações de halogenação em <i>Penicillium chrysogenum</i>	86
4.11	Biotransformação de substratos aromáticos na presença de NH ₄ Br no meio de cultura.....	87
4.12	Detecção da halogenase de <i>Penicillium chrysogenum</i>	87
4.13	Detecção da halogenase de <i>Talaromyces wortmannii</i>	109
4.14	Construção de biblioteca de microrganismos pela ferramenta MALDI-TOF.....	113
4.15	Ensaio de citotoxicidade em linhagens de células tumorais da roquefortina C e bromoroquefortina C.....	121
5.	Conclusões.....	125
6.	Referências.....	129

,

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabólitos Secundários Halogenados e sua importância

Produtos naturais contendo átomos de halogênio em suas estruturas são produzidos por muitos organismos diferentes, entre eles bactérias, fungos, algas, líquens e organismos superiores. Relatos destes metabólitos são encontrados facilmente na literatura, especialmente oriundos de organismos marinhos. Ao se comparar a quantidade de produtos naturais reportados, uma pequena parcela destes está relacionada à presença de metabólitos secundários halogenados, sendo encontrados na literatura, aproximadamente, mais de 4000 compostos halogenados. A importância destas substâncias é observada nas atividades farmacológicas associadas às mesmas. (KÖNIG, *et. al.* 2009)

A ocorrência destes está relacionada ao ambiente em que se encontram, uma vez que dependem da disponibilidade dos íons. Sendo assim, a maioria dos produtos naturais halogenados é encontrada em ambientes marinhos já que a concentração de halogênios é alta e facilita a incorporação dos mesmos na rota biossintética das substâncias. A Tabela 1.1 mostra a ocorrência dos íons halogênios encontrados na natureza e suas concentrações (GRIBBLE, 2010).

TABELA 1.1: Abundância natural de haletos na natureza em mg/kg

Haletos	Oceanos	Rochas Sedimentares	Fungos	Polpa de madeira	Plantas
F ⁻	1,4	270 - 740			
Cl ⁻	19.000	10 - 320		70 - 2100	200 – 10.000
Br ⁻	65	1,6 - 3	100		
I ⁻	0,05	0,3			

A formação de compostos organohalogenados foi desenvolvida em procariotos em resposta evolutiva à geração de espécies reativas de oxigênio. Similarmente às algas, os compostos halogenados são capazes de eliminar estas espécies, sendo responsáveis por mecanismos de defesa nestes organismos.

1.2 Influência dos halogênios nas propriedades físico, químicas e biológicas nos metabólitos secundários

A presença de átomos de halogênios em vários produtos naturais influencia diretamente nas atividades biológicas dos mesmos. Exemplos de compostos bioativos são os antibióticos vancomicina, clorofenicol, aureomicina e salinosporamida A e o antitumoral rebecamicina. Alguns destes metabólitos são mostrados na Figura 1.1. Observa-se uma variância relacionada aos tipos de substratos/substâncias e a quantidade de átomos de halogênio nos quais os mesmos se encontram presentes (BUTLER, *et. al.*, 2009).

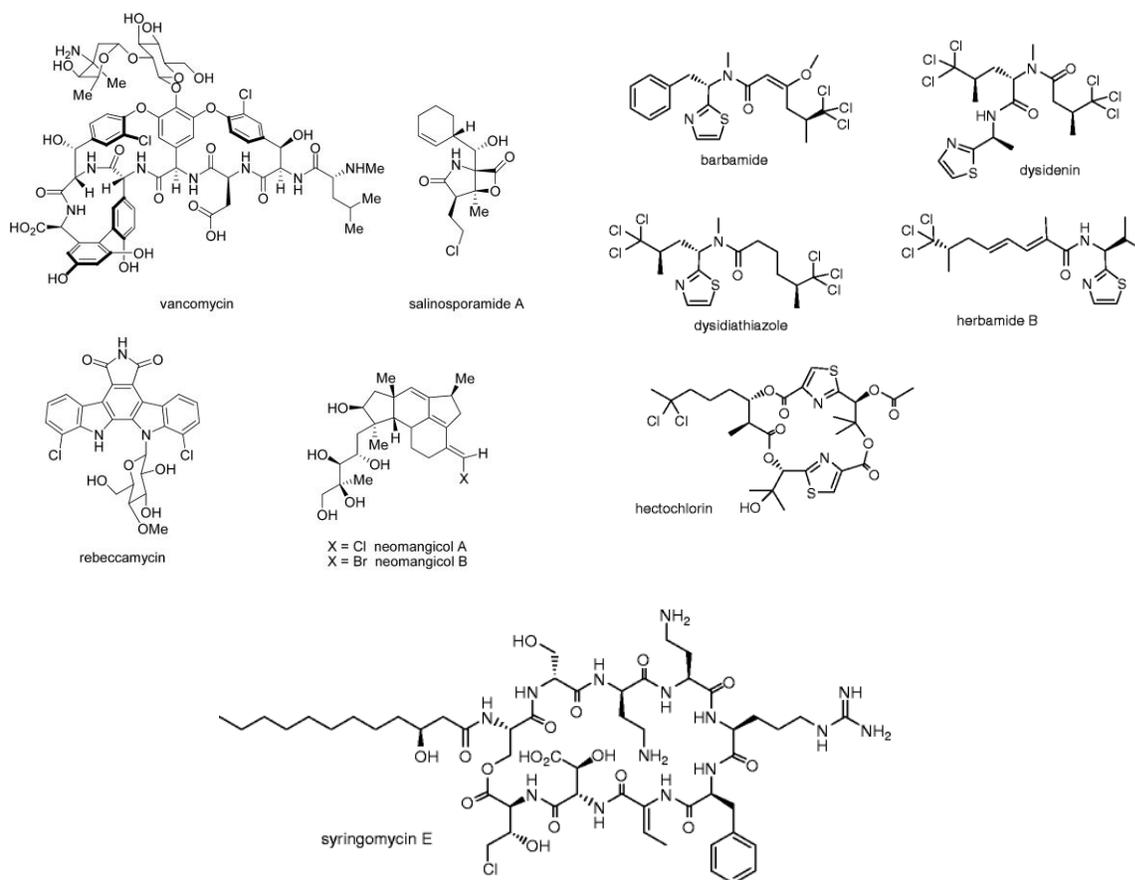


FIGURA 1.1: Exemplos de metabólitos secundários halogenados (ADAPTADO DE BUTLER, *et. al.*, 2009).

A procura por moléculas contendo átomos de halogênio ou até mesmo a síntese de substâncias bioativas halogenadas ocorre, pois os haletos quando substituem átomos de hidrogênio nas moléculas tornam as moléculas mais lipofílicas e hidrofóbicas, fazendo com que os fármacos em estudo consigam permear as membranas lipídicas mais facilmente e entrem nas células. O resultado negativo desta permeabilidade seria o acúmulo dos fármacos em tecidos adiposos (GRIBBLE, 2010).

A eficácia dos fármacos pode ser influenciada pela orientação dos substituintes e o tamanho dos átomos, uma vez que o efeito estérico causado por estes, evita a rotação e fornece a orientação correta para a ação do fármaco. A droga clonidina, prescrita como anti-hipertensivo mostra que a

posição dos átomos de halogênio em sua estrutura influenciam diretamente no mecanismo de ação da droga (Figura 1.2).

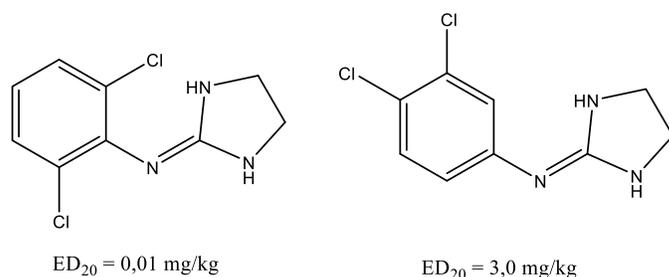
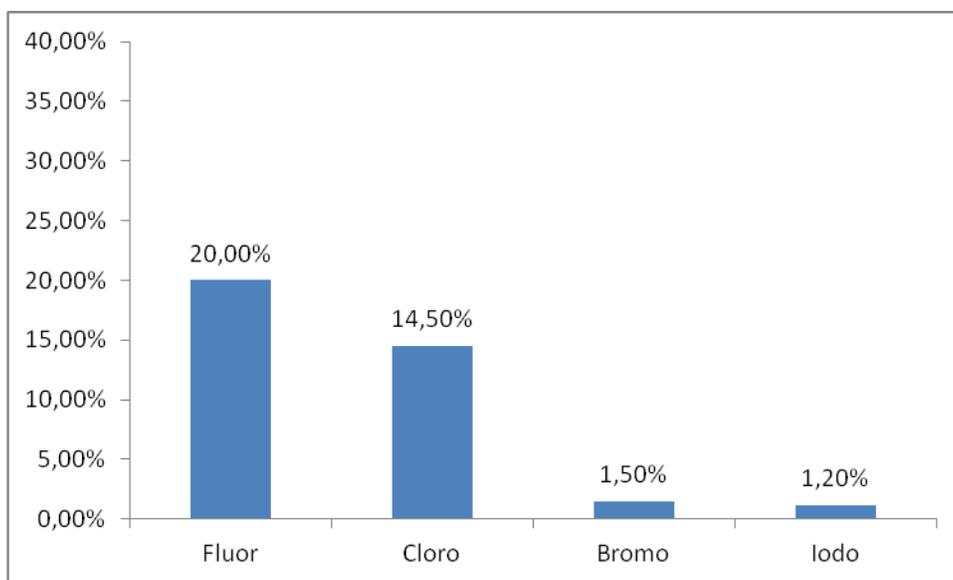


FIGURA 1.2: Mecanismo de ação da droga clonidina é diretamente influenciado pela posição dos átomos de cloro presentes em sua estrutura.

Em um levantamento realizado pela empresa Novartis em 2013, os compostos halogenados são uma fonte importante de fármacos que são vendidos atualmente no mercado. Os dados são mostrados no Esquema 1.1. (Novartis, 2013)



ESQUEMA 1.1: Porcentagem de fármacos vendidos atualmente contendo átomos de halogênio.

1.3 Indução de novas rotas metabólicas

Metabólitos secundários geralmente são produzidos em algumas poucas variedades de meios de cultura. No sentido de observar a produção dos mesmos, os requisitos essenciais são: a presença de algumas enzimas ativas; presença de precursores e a capacidade de excreção celular. Os controles observados para a produção dos metabólitos secundários são basicamente os mesmo observados para os metabólitos primários e são agrupados nos seguintes grupos: regulados pelo meio de cultura, regulados bioquimicamente e regulados geneticamente. (BUNCH, *et. al.* 1986)

Por meio de modificações do meio de cultura, os mais utilizados são a mudança de pH, temperatura, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e micronutrientes. Com relação à regulamentação bioquímica, estudos mostram que a repressão de rotas catabólicas, a presença de agentes quelantes podem influenciar na expressão de algumas enzimas envolvidas no metabolismo primário, levando à produção de novas substâncias. A regulação gênica está relacionada à expressão ou inibição das enzimas diretamente ligadas à rota biossintética do metabólito secundário em questão e genes envolvendo a permeabilidade da substância nas células. (VOURNAKIS, *et. al.* 1983; BUNCH, *et. al.* 1986)

Novos metabólitos secundários isolados de microrganismos são encontrados em pequenas quantidades. Quando existe uma atividade biológica relatada para tal composto, a necessidade da produção da mesma em maior quantidade é requerida. O cultivo em volumes maiores, às vezes, não é suficiente, sendo necessária uma alternativa para driblar este processo. A modificação do meio de cultura pode levar a produção do produto natural em questão e até mesmo a produção de novos metabólitos secundários.

Os microrganismos, por serem de organização relativamente simples, têm um poder grande de multiplicação e adaptação a variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo com a carência ou com o fornecimento de nutrientes ao meio de cultivo. Isso permite uma ampla flexibilidade em sua utilização, podendo-se dizer que é possível induzir microrganismos a produzir determinadas substâncias de interesse. De fato, alguns estudos mostram que as alterações das condições do meio de cultura podem alterar completamente o metabolismo de alguns microrganismos. Esta abordagem pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários interessantes a partir de uma única cepa de um microrganismo. Este estudo vem sendo denominado OSMAC (*One Strain Many Compounds*) (BJORN *et. al.*, 2002).

A abordagem OSMAC representa uma ferramenta poderosa para elucidar o metaboloma dos diferentes microrganismos (detecção e identificação do maior número possível de metabólitos secundários produzidos por um organismo). Embora uma alteração sistemática nos parâmetros de cultivo possa ser aplicada para as várias cepas selecionadas, a abordagem OSMAC é aleatória, não permitindo gerar regras que seriam comuns a todos os microrganismos, já que cada um terá uma resposta particular determinada pelo seu genoma.(GROSS, 2007) A continuidade da abordagem OSMAC seria a identificação dos genes que estão no comando da indução ou modificação do padrão metabólico. O objetivo dessa etapa seria avaliar quais são os compostos de um determinado meio de cultura induziram a biossíntese dos metabólitos desconhecidos identificados (BJORN *et.al.*, 2002)

1.4 Biossíntese de Metabólitos Halogenados

Na natureza existem as mais diversas formas de halogenar um produto natural. Enzimas são capazes de halogenar qualquer tipo de substrato, sejam eles ricos ou pobres em elétrons, substratos aromáticos ou alifáticos. A busca por compostos halogenados que ocorrem de forma natural tem atraído à atenção de pesquisadores uma vez que reações de halogenação *in vitro* não ocorrem de forma trivial, ocasionando produtos sem enantio e regioseletividade (ZENG, et. al., 2011).

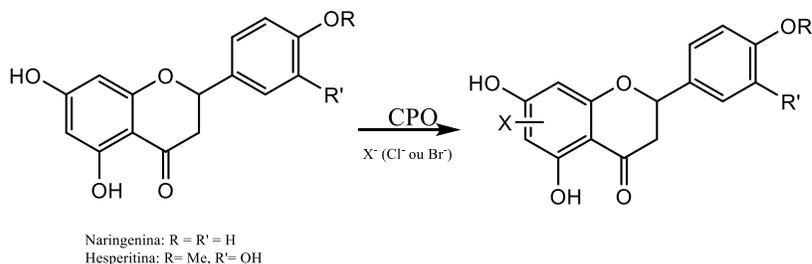
O uso de enzimas microbianas para a transformação de substratos orgânicos tem sido utilizado como uma ferramenta poderosa na obtenção de novas substâncias. Com relação à halogenação de metabólitos, a enzima mais utilizada comercialmente é a cloroperoxidase (CPO, uma haloperoxidase contendo o grupo heme em seu sítio ativo), isolada de *Caldariomyces fumago* capaz de halogenar uma grande variedade de compostos orgânicos. São relatadas cinco classes de halogenases, e seu mecanismo de ação já são bem estabelecidos, tanto quanto a estrutura das enzimas. O ciclo catalítico se dá através da formação de íon halogeneto (X^+) ou a formação do intermediário hipohalogeneto (HOX), ambos agindo como eletrófilos levando a uma substituição eletrofílica em centros ricos em elétrons, ou reações radicalares e até mesmo os halogenetos agindo como nucleófilos (ZENG, et. al., 2011). A Tabela 1.2 mostra algumas enzimas capazes de introduzir átomos de halogênios em produtos naturais (BUTLER, et. al., 2009).

Além da produção de produtos naturais oriundos de organismos que possuem em seu genoma a possibilidade de reações de halogenação, foram realizados estudos mostrando a formação de metabólitos halogenados através de enzimas comerciais. Células de *Caldariomyce fumago* foram capazes de halogenar naringenina e hesperetina) nas posições C-6 e C-8 na

presença de íons cloreto e brometo produzindo seus análogos halogenados (Esquema 1.2). Outras flavonas (flavona, flavanol, 7-hidroxiavona, 5-7, dihidroxiavona, quercetina e 6-cloroflavona) foram testadas, porém não foram obtidos resultados satisfatórios. Apesar de serem centros ricos em elétrons, o sistema aromático destas substâncias é muito estável devido à alta conjugação com sistemas levando a uma menor interação com enzima, ocasionando um menor rendimento nas reações.

TABELA 1.2: Cinco classes de halogenases e suas especificidades. (adaptado de BLASIAK, 2009)

	FORMA DO HALOGÊNIO ATIVO	EXIGÊNCIAS PARA O SUBSTRATO	EXIGÊNCIAS DO COFATOR E CO- SUBSTRATO
Haloperoxidase dependente do grupo heme	X ⁺	aromático, rico em elétrons;	grupo heme, H ₂ O ₂ ;
Haloperoxidase dependente de vanádio	X ⁺	aromático, rico em elétrons;	vanadato, H ₂ O ₂ ;
Halogenase dependente de flavina	+	aromático, rico em elétrons;	FADH ₂ , O ₂ ;
Halogenases não dependente do grupo Heme	X [•]	alifático, inativo;	Fe(II), O ₂ , α- cetoglutarato
Halogenases nucleofílicas	X ⁻	eletrofílico, bom grupo abandonador	



ESQUEMA 1.2. Halogenação de flavonoides pela enzima cloroperoxidase de *C. fumago*.

A busca por organismos vivendo em ambientes extremos, como altas ou baixas temperaturas e altas concentrações de sal pode levar a descoberta de novos organismos capazes de produzir substâncias e enzimas de interesse biotecnológico. Os microrganismos se adaptam as mais variadas situações nutricionais, variando seu metabolismo com a carência ou com o fornecimento de nutrientes ao meio de cultivo. Isso permite uma ampla flexibilidade em sua utilização, podendo-se dizer que é possível induzir microrganismos a produzir determinadas substâncias de interesse. Estudos relatam que as alterações das condições do meio de cultura podem alterar o metabolismo de alguns microrganismos. Neste sentido, inúmeros estudos verificaram que a composição do meio de cultura tem grande impacto na produção de metabólitos de origem microbiana, com relação à produção de metabólitos secundários halogenados.

Organismos vivendo em ambientes hipersalinos, como oceanos e lagos com altas concentrações de sal, são conhecidos por acumular metabólitos secundários halogenados, devido à alta concentração de halogênios presentes no ambiente em que se encontram. Na presença de íons brometo, *Penicillium chrysogenum* cultivado em meio de cultura marinho produziu ésteres halogenados com atividade antioxidante na concentração de 15 M. *Fusarium tricinctum*, cultivado na presença de CaBr₂ levou a formação

de análogos halogenados do metabólito clamidosporol (Figura 1.3). Estudos relacionados à atividade antibiótica contra *S. aureus* foi verificado que bromometilclamidosporol A e B foram mais ativos que clamidosporol. (NENKEP, *et. al.* 2010)

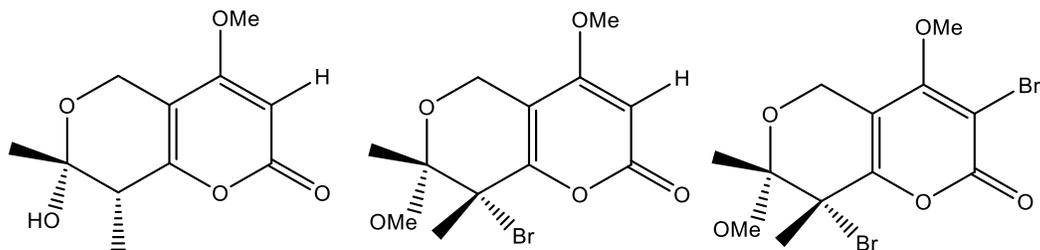


FIGURA 1.3: Estruturas do clamidosporol, bromometilclamidosporol A e B, respectivamente.

Dentre as halogenases relatadas na literatura, as dependentes de $FADH_2$ foram descritas para a biossíntese do antibiótico pirrolnitrina (WIESNER *et. al.* 1988). Várias perhidrolases de *Pseudomonas*, produtoras de pirrolnitrina foram isoladas e elas foram consideradas como sendo as responsáveis pelas clorações durante a biossíntese deste antibiótico (ITOH *et. al.* 1992). Todavia, a deleção do gene da perhidrolase de *Pseudomona fluorescens* resultava na formação do produto da mesma maneira, acreditando que este gene não seria responsável pela biossíntese do metabólito. Estudos bioquímicos revelaram que dois dos quatro genes contidos no cluster responsável pela biossíntese da pirrolnitrina estão codificados para a produção de halogenases, sugerindo um novo mecanismo de halogenação uma vez que a hipótese de halogenação via perhidrolases foi descartada (HAMMER *et al.*, 1999).

A reação catalisada pelas halogenases requer FAD na sua forma reduzida, íons halogenetos e oxigênio molecular como co-substratos. O $FADH_2$ gerado pela flavina-redutase interage com a halogenase, reage com

O₂, íon halogeneto e o substrato no centro ativo dando origem ao produto halogenado, conforme observado na Figura 1.4. (KELLER *et al.*, 2000).

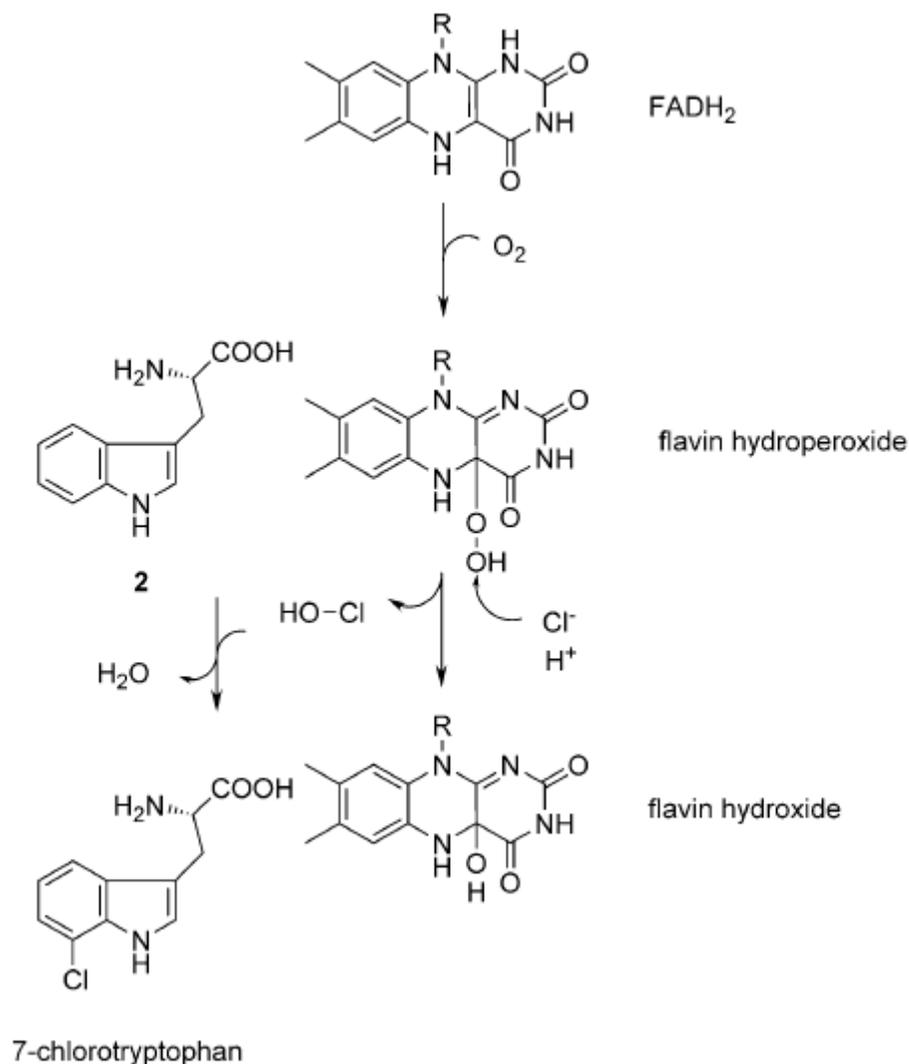


FIGURA 1.4: Mecanismo reacional das halogenases dependentes de FADH₂. (ADAPTADO de WEICHHOLD *et. al.* 2016)

A maioria dos organismos procariotos e eucariotos relatados como produtores de metabólitos secundários halogenados apresentam halogenases do grupo das flavino-dependentes ou não heme ferro-dependentes (VAN PEE *et. al.* 2006). Algumas enzimas pertencentes a esta família já

apresentam sua estrutura cristalográfica resolvida, como para PrnA e a RebH, responsáveis pela adição de átomos de cloro nos compostos pirrolnitrina e rebeccamicina (DONG *et al.*, 2005). Essas proteínas são diméricas e cada monômero apresenta uma região de ligação de flavina no N-terminal com homologia as monooxigenases e uma região de reconhecimento de substrato no C-terminal (BLASIA *et. al.*, 2009).

A regioseletividade é observada nas halogenases dependentes de FADH₂. Há relatos de enzimas capazes de halogenar em diversas posições do anel indólico proveniente do triptofano. As posições mais comuns relatadas para a halogenação seriam as posições C-5, C-6 e C-7, de acordo com a Figura 1.5. Esta regioseletividade é observada pela orientação e interação do substrato no sítio ativo da enzima.

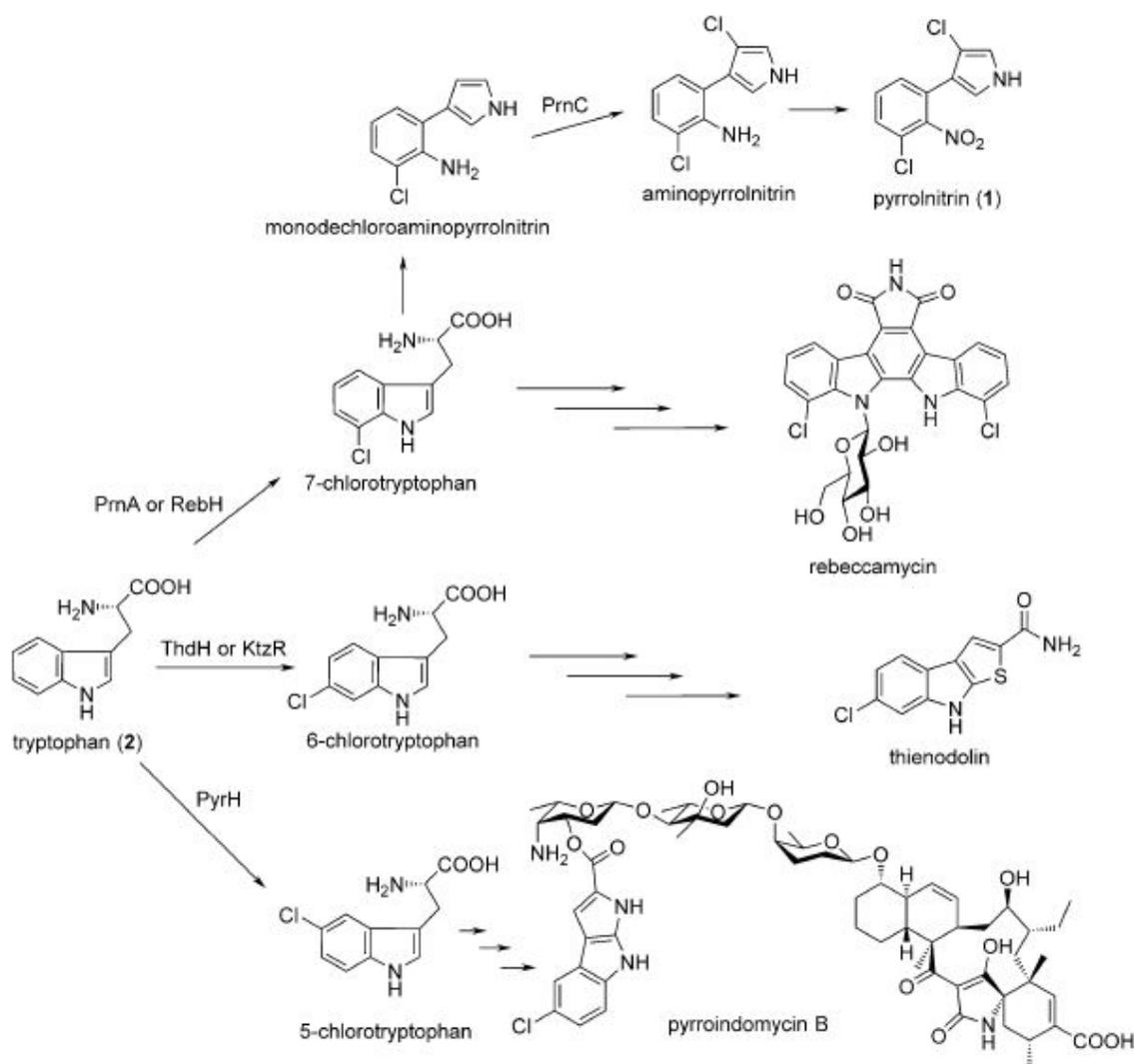


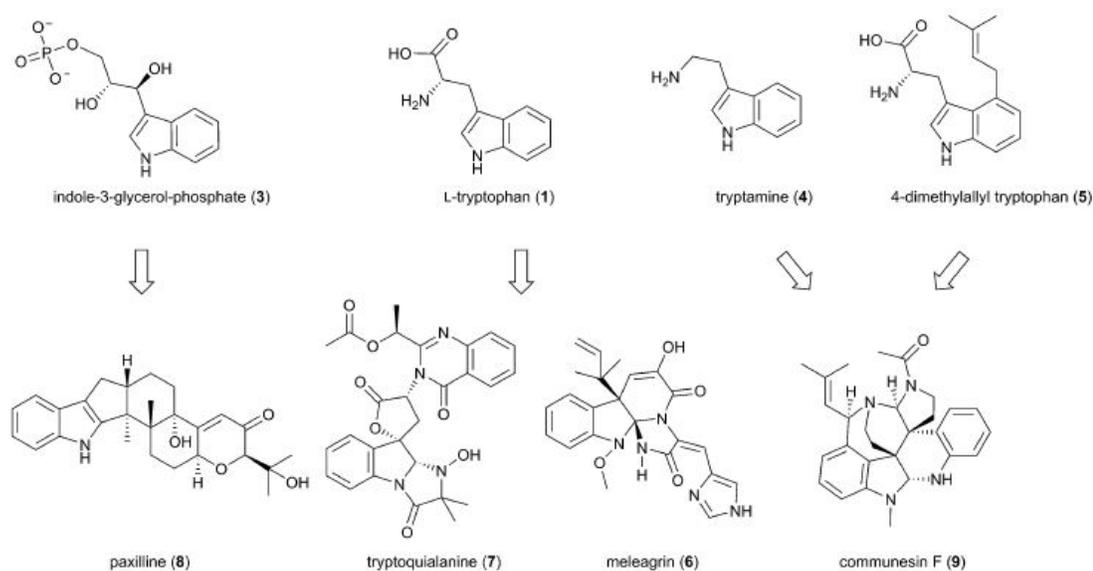
FIGURA 1.5: Regioseletividade apresentada pelas halogenases dependentes de FADH₂. (ADAPTADO de WEICHDOLD *et. al.* 2016)

1.5 Biossíntese de alcaloides dicetopiperazínicos

Alcalóide indólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários contendo átomos de nitrogênio e uma ou mais unidades indólicas em suas estruturas (DUNN, *et. al.*, 2008). São amplamente encontrados em plantas, bactérias, fungos e animais. Fungos, principalmente ascomicetos, são

relatados como produtores destes metabólitos e apresentam potentes atividades biológicas. Nos últimos anos, com o sequenciamento do genoma de vários microrganismos na identificação de genes envolvidos na rota biossintética destes alcaloides tem facilitado à compreensão das etapas enzimáticas envolvidas no processo biossintético. (WIEMANN, *et. al.* 2014) (YAEGAHSI, *et. al.* 2014)

Os fungos utilizam diferentes estratégias para incorporação da unidade indol ao seu metabolismo secundário. O precursor mais encontrado e relatado é o L-triptofano, o constituinte indol presente nas células em maior quantidade. A biossíntese do triptofano começa com o corismato do caminho do ácido chiquímico e envolve os intermediários antranilato e 3-glicerol-indol fosfato, que é convertido em indol e ao reagir com a serina leva a formação do triptofano. Ao sofrer uma descarboxilação, o triptofano forma a triptamina ou pode sofrer uma prenilação em C-4 levando à formação de 4-dimetilaili-triptofano. Experimentos envolvendo marcação isotópica mostraram que estes são os quatros precursores mais utilizados para a produção de alcaloides indólicos encontrados em espécies fúngicas, como mostra o Esquema 1.3.



ESQUEMA 1.3: Precusores derivados do triptofano para formação de alcaloides indólicos de origem fúngica (ADAPTADO DE XU, *et. al.* 2009).

Dentro da classe dos alcaloides halogenados, os bromoalcaloides são encontrados em maior quantidade na natureza. Este grupo é encontrado, predominantemente em organismos eucariotos marinhos, raros em procariotos e praticamente não existentes em plantas terrestres e animais. Alcaloides contendo átomos de iodo são isolados de organismos marinhos, porém há poucos relatos para estes metabólitos. (LEIRÓS, *et. al.* 2015)

1.6 Produção de alcaloides halogenados por *Penicillium chrysogenum*, por modificação do meio de cultura

As modificações no meio de cultura podem levar à indução de novos metabólitos secundários em microrganismos, uma vez que a presença de algumas substâncias pode levar a expressão de genes que se encontravam silenciados, ou até mesmo a inibição de rotas biossintéticas naturalmente

expressas pelos microrganismos em questão. O estudo envolvendo as modificações no meio de cultura é conhecido como *OSMAC* (*One Strain Many Compounds*) e apresenta diversos trabalhos relatando este tipo de abordagem (SILVA, 2011).

Outra possibilidade levantada é que durante o crescimento de microrganismos e a formação dos produtos naturais existe a formação de inúmeros intermediários reativos, entre eles carbocátions, carbânions, espécies radicalares que podem acabar reagindo com algumas espécies presentes no meio de cultura. Por mais que os metabólitos estejam ligados covalentemente a complexos enzimáticos, os intermediários reativos se encontram mais acessíveis para que as reações possam ocorrer, não sendo descartada a hipótese que alguns metabólitos podem ter sua rota biossintética modificada pela interação com os constituintes do meio de cultura.

O fungo *Penicillium chrysogenum*, quando cultivado em meio líquido Czapek contendo 2% de extrato de levedura produz o metabólito secundário roquefortina C, um alcaloide indólico da classe das dicetopiperazinas. Quando ao crescimento do fungo é adicionado NH_4Br na concentração de 65 g/L, o mesmo produz a 11-bromoroquefortina C que é o análogo bromado na roquefortina C. As estruturas da roquefortina C e 11-bromoroquefortina C são mostradas na Figura 1.6 (SILVA, 2011).

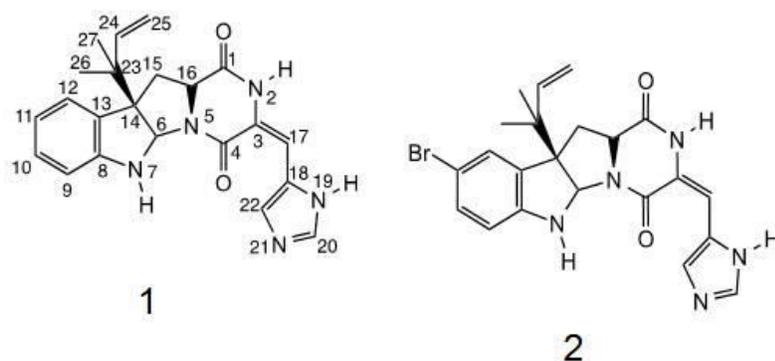


FIGURA 1.6: Estrutura da roquefortina C e 11-bromo-roquefortina C, produzidas por *P. chrysogenum*

Os dois metabólitos foram isolados por cromatografia líquida em escala preparativa e a determinação estrutural foi realizada por meio de análises espectroscópicas como RMN e MS de baixa e alta resolução.

Observou-se também em extratos de baixa polaridade do mesmo experimento citado acima que *P. chrysogenum* produziu metabólitos halogenados detectados por GC-MS. Estes metabólitos (Figura 1.7), provavelmente, são derivados da rota dos fenilpropanóides, devido à presença do grupo metilenodióxi pela ação da enzima fenilalanina amoniliase (PAL) convertendo a fenilalanina em ácido cinâmico (SILVA, 2011).

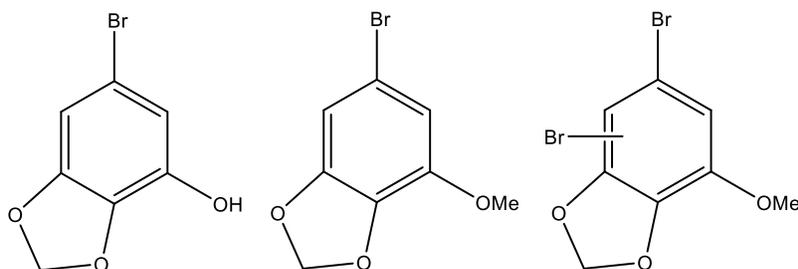


FIGURA 1.7: Metabólitos detectados por GC-MS em extratos de baixa polaridade de *P. chrysogenum* com NH_4Br no meio de cultura.

1.7 Construção de bibliotecas de microrganismos por MALDI-TOF

A presença de microrganismos é constante na vida humana. Desta forma, o conhecimento e a classificação destes se tornam de extrema importância. As técnicas para identificar e classificar devem seguir alguns aspectos gerais: capacidade de identificação universal, baixo custo de operação e rápido processo de transferência de informações. Tais informações devem ser atualizadas regularmente e compartilhadas por meio de acesso a bancos de dados nos quais a identificação em diversas fontes possa ser realizada. (ASSIS, et. al. 2011)

Atualmente, novas técnicas de identificação e classificação de microrganismos estão surgindo na tentativa de agilizar os resultados, diminuir os custos e chegar a identificações mais detalhadas que métodos convencionais ainda não respondem. Uma destas técnicas é a análise por MALDI-TOF. A ionização por MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) é uma técnica branda utilizada, geralmente, na análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas, que tendem a se fragmentar durante o processo de ionização. A ionização por MALDI ocorre pela transferência de energia da luz UV (laser) para uma matriz (a maioria das vezes, um ácido orgânico) e então para o analito em questão. Desta forma mais amena, as moléculas a serem analisadas não sofrem nenhum tipo de fragmentação e podem ser analisadas de forma intacta.

A análise por MALDI-TOF aplicada na identificação de microrganismos analisa-os como uma mistura de biomoléculas que apresentam massas moleculares diferentes. Essa mistura de moléculas gera um

espectro de massas que é característico de cada espécie. Desta forma, diferentes microrganismos apresentam diferentes espectros de massa.

Sendo assim, já existem alguns bancos de dados contendo espectros de massas de alguns microrganismos, sendo que a maioria deles é composto por bactérias patogênicas (HETTICK *et al.*; SHAW *et al.*; 2004). De um modo geral, alguns relatos na literatura demonstram que quando se compara MALDI-TOF com provas bioquímicas automatizadas ou outros métodos, sejam em análises intra ou inter laboratórios, a acurácia obtida foi entre 98 e 99% para as espécies analisadas (SAUER *et al.*; BIZZINI *et al.*; 2010).

Uma das possibilidades para a análise do perfil de biomoléculas de microrganismos é de utilizar células intactas de microrganismos que podem ser retiradas diretamente das colônias crescidas em placas de cultivo. A utilização de células intactas para espectrometria de massa (conhecida como IC-MS, *intact cell MALDI-TOF*) produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, o que funciona como uma impressão digital (“*fingerprint*”), que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em banco de dados (VARGHA *et al.*, 2006). O tempo de análise da amostra após o crescimento em placa é de cerca de 30 segundos enquanto que em outras metodologias esse tempo pode ser de horas e até dias.

Atualmente, a técnica MALDI-TOF tem apresentado grande aplicação em laboratórios de análises clínicas e já é utilizada em laboratórios para confirmação de resultados obtidos por análises clínicas. Esta metodologia apresenta inúmeras vantagens, como o baixo custo, necessita de quantidades muito pequenas de material biológico e pode ser aplicada em larga escala.

A análise só se torna confiável através da comparação com bancos de dados disponíveis comercialmente e a maioria dos microrganismos

depositados são patogênicos e de interesse clínico. Quase não há depositado microrganismos isolados ambientais.

Existe a possibilidade da criação de bancos de dados próprios com a variedade infinita de isolados.

Como uma grande parte dos fungos isolados pelo grupo LaBioMMi e outros grupos de pesquisa associados são do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* este trabalho teve como objetivo montar uma biblioteca do perfil de alguns destes fungos através da técnica IC-MS. Os perfis dos diferentes fungos em diferentes meios de cultura obtidos pelo espectrômetro de massa foram analisados pela ferramenta Biotyper e a junção dos espectros de massa (MSP) levou à criação da biblioteca de microrganismos isolados do meio ambiente.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a produção de haloalcaloides por fungos de ambientes terrestres submetidos à variações no meio de cultura.

Os objetivos específicos foram:

- Produzir, isolar, identificar e bioensaiar os metabólitos secundários halogenados de *Penicillium chrysogenum*;
- Investigar a rota biossintética dos alcaloides halogenados produzidos por *Penicillium chrysogenum*;
- Adicionar diferentes fontes halogenadas ao meio de cultivo do fungo e verificar a influência destes aditivos no metabolismo secundário do microrganismo;
- Detectar os genes que expressam as halogenases de *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii* quando ao meio de cultura são adicionados íons halogênios;
- Verificar a produção de produtos de biotransformação halogenados com a adição de brometo de amônio e compostos aromáticos;
- Estudar o perfil de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Apergillus* por meio de MALDI-TOF através da técnica IC-MS para construção de banco de dados

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

- ✓ Brometo de amônio (VETEC[®])
- ✓ Cloreto de amônio (VETEC[®])
- ✓ L-triptofano (Sigma[®])
- ✓ Bromo (VETEC[®])
- ✓ Fosfato de Potássio (Synth[®])
- ✓ NADH (Sigma[®])
- ✓ FAD (Sigma[®])
- ✓ Agarose (Sigma[®])
- ✓ Brometo de Etídio
- ✓ EDTA (Mallinckrodt[®])
- ✓ SDS (Sigma[®])

3.2 Tampões

- ✓ TAE: Tris-HCl 200 mM pH 8,5 (Sigma[®]), EDTA (Mallinckrodt[®])
- ✓ Tampão para extração de DNA genômico: Tris-HCl 200 mM pH 8,5 (Sigma[®]), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%.

3.3 Kit para purificação das bandas obtidas da PCR

- ✓ Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit #K0691, #K0692

3.4 Meios de Cultura

- ✓ Meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura: Em um Erlenmeyer contendo 1L de água destilada foram adicionados: 30 g de glicose, 3 g de NaNO₃, 0,5 g de MgSO₄x7H₂O, 0,5 g de KCl, 0,01 g de FeSO₄x7H₂O, 1 g de KH₂PO₄, 20 g de extrato de

levedura. Para o cultivo em meio sólido, foi adicionado 13g de ágar para 1 L de água destilada.

- ✓ Meio BDA (batata-dextrose-ágar): Inicialmente 200g de batata foram cozidas com 1L de água destilada. Após a cocção, a mistura foi filtrada com o auxílio de uma peneira para evitar que fragmentos sólidos da batata estivessem presentes no meio de cultura. A esta mistura filtrada adicionou-se 20g de glicose e 15g de ágar.
- ✓ Meio Aveia sólido: Em um Erlenmeyer contendo 1 L de água destilada, adicionar 20 g de aveia e 15 g de ágar.
- ✓ Meio Malte sólido: Em um Erlenmeyer contendo 1 L de água destilada, adicionar 10 g de extrato de malte, 5 g de glicose e 15 g de ágar.
- ✓ Meio LB: Em um Erlenmeyer contendo 1 L de água destilada, adicionar 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 20 g de ágar. O pH deve ser ajustado para 7,0.

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical durante 15 minutos a temperatura de 121°C e 1atm de pressão.

3.5 Soluções para Hibridização do DNA (*Southern Blot*)

- ✓ Solução de desnaturação: NaCl (87,66 g), NaOH (20 g) por litro de água destilada.
- ✓ Solução de neutralização: NaCl (87,66 g), Tris-HCl (60,5 g) em 1 L de água destilada. O pH deve ser ajustado para 7,0 com HCl.
- ✓ 20% SSC: NaCl (175,32 g), citrato de sódio (88,23 g) em 1 L de água destilada em pH 7,0 ajustado com NaOH.
- ✓ Tampão de Bloqueio 5% I: Reagente de Bloqueio 5% (m/v) em tampão de ácido maleico.

- ✓ Tampão de ácido maleico: ácido maleico (11,6g), NaCl (8,76g) em 1L de água destilada em pH 7,5 ajustado com NaOH.
- ✓ 10% Laurilsarcosinato de sódio: Laurilsarcosinato de sódio 10% (m/v) em 1L de água destilada.
- ✓ 10% SDS: SDS 10% (m/v) em 1L de água destilada.
- ✓ Solução de pré-hibridização: 5 mL de 20xSCC, 4 mL de tampão de bloqueio I, 200 uL de 10% laurilsarcosinato de sódio e 40 uL de 10% SDS em 20 mL de água destilada.
- ✓ Tampão de lavagem I (2XSSC + 0,1% SDS): 10% de 20xSCC e 0,1% de SDS em 20 mL de água destilada.
- ✓ Tampão de lavagem II (0,5xSSC + 0,1% SDS): 2,5% de 20xSCC e 0,1% SDS em 20 mL de água destilada.
- ✓ Tampão de lavagem III: 0,3% de Tween 20 em 300 mL de tampão ácido maleico.
- ✓ Tampão de bloqueio II: 3% de leite em pó em 120 mL de tampão ácido maleico.
- ✓ Solução de Anticorpo: 0,005% (v/v) de Anti-DIG-AP em 20 mL de tampão de bloqueio II.
- ✓ Tampão de detecção: 0,6 g de Tris-HCl, 0,23 g de NaCl, 0,5 g de MgCl₂·6H₂O. Completar o volume para 50 mL com água destilada. O pH deve ser ajustado para 9,5 com HCl.
- ✓ Tampão de re-hibridização: 8 g de NaOH e 0,1% (m/v) de SDS em 1 L de água destilada.

3.6 Solventes utilizados

- ✓ Água destilada;
- ✓ Água ultra-pura (Purificada em Sistema Milli-Q[®])

- ✓ Solventes grau P.A. PANREAC[®]
- ✓ Solventes grau HPLC: acetonitrila, isopropanol, metanol J.T. BAKER[®] para análises cromatográficas
- ✓ Fenol, clorofórmio, álcool isoamílico, isopropanol e etanol (Sigma[®])
- ✓ Solventes destilados no Departamento de Química - UFSCar

3.7 Equipamentos

➤ Rotaevaporadores

Rotavapor R-200 com banho de aquecimento – BUCHI[®] B-490

Rotavapor R-114 com banho de aquecimento – BUCHI[®] B-480

➤ Estufas

FANEM[®] 315-SE

Estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O) FANEM[®] 347 CD

➤ Autoclaves

Autoclave vertical Phoenix AV 75 e Soc. FABBE[®] 103

➤ Câmara de Fluxo Laminar

VECO[®] VL FS-12M

➤ Espectrômetro de Massas

Espectrômetro BRUKER MALDI-TOF/TOF ULTRAFLEX

➤ Cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas

Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) - Alliance 2695-WATERS[®] combinado ao módulo WATERS[®] 2696 (DAD) e acoplado ao espectrômetro de massas (MS) QuattroLC- triplo-quadrupolo, ESI - MICROMASS[®]

Cromatógrafo líquido de ultra-alta pressão (UHPLC) Accela High Speed LC-Thermo Scientific[®] acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) LTQ Orbitrap Velos, ESI - Thermo Scientific[®]

➤ Cromatógrafos

Cromatógrafo líquido de alta pressão (*HPLC*) Shimadzu® LC-10AD, auto injetor SIL-10ADVp, combinado ao módulo SPD-M10A-VP (*DAD*)

Cromatógrafo líquido de média pressão (*MPLC*) - Biotage Isolera combinado ao módulo UV- Biotage Isolera;

3.8 Suportes Cromatográficos

➤ Suportes para Cromatografia

Sílica Gel 60 (70-230 Mesh) – MERCK®

➤ Colunas cromatográficas para HPLC

- Synergi Fusion _RP 80A (250 x 4.60 mm, 5 µm), PHENOMENEX®
- Luna Phenyl Hexyl (250 x 4,60mm, 5µm), PHENOMENEX®
- Luna Phenyl Hexyl Preparativa (250 x 21,20mm, 10 µm), PHENOMENEX®
- Luna II C18 (250 mm x 10 mm, 5µm), PHENOMENEX®
- Luna C18 (150 x 4,60mm, 5µm), PHENOMENEX®

3.9 Outros materiais

- GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- Enzimas de Restrição: EcoRI, HindIII, NcoI, PstI, BamHI, EcorV, NotI, XbaI (New England Biolab).

3.10 Primers degenerados

- J1_for: 5' GGC GGC GGC ACS GCS GG 3'
- J2_rev: 5' CST SGA CTC CAG CGG YTC 3'
- J3_for: 5' GAC TGC WCS GGC TTC CGC 3'

- J4_rev: 5' CGG GAT CKT CCA SRT CCA SCC 3'
- J5_for 5'-GTGGTTGGTGGTGGCCCTGGAGGG-3'
- J6_rev 5'-TCG ACC GCT GGC ATC GAC CAA-3'
- J7_for 5'- TGG GCA TGG TTC ATT CCT CTC CAC AAC-3'
- J8_rev 5'- CCC AGA TGA GAA GAA TGG GTC AAT GAA-3'

3.11 Parte Experimental

3.11.1 Reativação dos microrganismos utilizados nos experimentos

Os fungos *Penicillium chrysogenum*, isolado de frutos verdes de *Coffea arábica*, e *Talaromyces wortmannii*, isolado de *Mallus domestica*, foram reativados por meio da inoculação de recortes dos fungos crescidos em placas contendo meio BDA. Após sete dias de crescimento em placas contendo o mesmo meio de cultura suspensões de esporos foram preparadas para posteriores experimentos com estes microrganismos. Para a inoculação dos microrganismos nos experimentos utilizou-se 100 uL das suspensões de esporos.

3.11.2 Cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* para a detecção de metabólitos halogenados contendo átomos de cloro

Para a detecção dos metabólitos contendo átomos de cloro em suas estruturas, o fungo *Penicillium chrysogenum* foi cultivado em meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura. O meio foi suplementado com cloreto de amônio (NH₄Cl) na concentração de 65 g/L. Após quinze dias

o crescimento do microrganismo foi interrompido através da filtração do meio líquido e ao filtrado adicionou-se 50 mL (2x 25 mL) de acetato de etila (AcOEt) para partição líquido-líquido. O micélio foi extraído com 50 mL de etanol (EtOH) e após 24h o mesmo foi filtrado à vácuo para a obtenção dos extratos.

3.11.3 Análise por HPLC-MS/MS do experimento de produção de metabólitos clorados por *Penicillium chrysogenum*

Para as análises dos extratos obtidos no item 3.11.2, foi utilizada uma coluna de fase reversa Phenomenx Luna Phenyl-Hexyl 250x4,6mm (5 mm de diâmetro de partícula) com eluição gradiente e uma vazão de 0,5 mL/min.

O método de análise utilizado no LC é mostrado na Tabela 3.1 e as condições do espectrômetro de massas são mostradas na Tabela 3.2.

TABELA 3.1: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.

Tempo (minutos)	% H ₂ O	% ACN
0	90	10
20	50	50
25	0	100
35	0	100

TABELA 3.2: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da clororoquefortina C.

Ionização	ESI ⁺
Capilar	3,70 kV
Cone	25 V
Extrator	5 V
Lentes RF	0,66 V
Temperatura do bloco da fonte	80°C
Temperatura de dessolvatação	250°

3.11.4 Experimentos para estimativa de produção da roquefortina C e bromoroquefortina C

Para verificar a produção de roquefortina C e bromoroquefortina C, o fungo foi cultivado em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio Czapek enriquecido com extrato de levedura e brometo de amônio (NH₄Br) na concentração de 65 g/L. A cada 5 dias o crescimento do fungo era interrompido por meio da filtração do micélio. Ao meio líquido obtido adicionou-se 50 mL de AcOEt (2x25 mL) para uma partição líquido-líquido e obtenção do extrato. Como os metabólitos a serem detectados se encontram na fase aquosa, o micélio foi devidamente descartado. Foram obtidos sete pontos em triplicata (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 dias) para posteriores análises por LC-MS/MS.

Para as análises da possível formação da bromoroquefortina C utilizou-se uma coluna de fase reversa Phenomenx Luna Phenyl-Hexyl 250x4,6mm (5 mm de diâmetro de partícula) com eluição gradiente e uma vazão de 0,5 mL/min.

As condições utilizadas para a análise são mostradas nas Tabelas 3.3 e 3.4.

TABELA 3.3: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.

Tempo (minutos)	% H ₂ O	% ACN	% MeOH
0	95	5	0
7	90	10	0
15	70	30	0
20	40	30	30
21	0	30	70
24	0	30	70

TABELA 3.4: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da clororoquefortina C.

Ionização	ESI ⁻
Capilar	3,43 kV
Cone	35 V
Extrator	5 V
Lentes RF	0,72 V
Temperatura do bloco da fonte	95°C
Temperatura de dessolvatação	300°

3.11.5 Isolamento da roquefortina C e bromoroquefortina C

Para realizar análises da roquefortina C e bromoroquefortina C por meio de LC-MS/MS, foi necessário isolar uma maior quantidade das mesmas como padrões. Desta forma, o fungo *Penicillium chrysogenum* foi cultivado em 8 litros de meio de cultura Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura e NH₄Br 65 g/L durante 20 dias.

Após o crescimento do microrganismo, o micélio foi filtrado e extraído com 1L de EtOH por 24h. Após este período, o micélio foi filtrado e o extrato concentrado e armazenado. O meio de cultura no qual houve o desenvolvimento do fungo foi utilizado para as etapas de purificação das substâncias de interesse. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (para cada 500 mL de fase aquosa extraía-se 2x 500 mL de AcOEt). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ e, sem seguida, concentrada.

O extrato proveniente do meio líquido foi purificado inicialmente em coluna a vácuo utilizando sílica flash como fase estacionária, e modo de eluição gradiente. A Tabela 3.5 mostra a composição da fase móvel e os códigos dados às frações após a eluição dos extratos. A quantidade utilizada para cada eluente foi de 1 L.

TABELA 3.5: Composição da fase móvel utilizada na separação do extrato em larga escala.

Eluente	Proporção	Código
Hex:DCM	1:1	A
DCM	100%	B
DCM:AcOEt	7:3	C
AcOEt	100%	D
AcOEt:MeOH	7:3	E
AcOEt:MeOH	3:7	F
MeOH	100%	G

Como descrito por SILVA, 2011 a roquefortina C e seu análogo bromado estavam presentes nas frações D e E. Dessa forma, os extratos foram reunidos e os metabólitos de interesse foram analisados por

HPLC-UV em escala preparativa utilizando uma coluna ODS, Shim-Pack (250 x 21,20 mm e 10 μm), H₂O:ACN 1:1 com vazão de 5 mL/min e detecção em λ 325nm. As bandas eluindo em 23,5 e 38,2 minutos foram coletadas para posteriores análises espectroscópicas, como RMN ¹H, COSY, HMBC e HSQC e LC-MS/MS.

3.11.6 Parâmetros para experimentos de detecção de outros metabólitos halogenados derivados dos alcaloides dicetopiperazínicos produzidos por *Penicillium chrysogenum*

As análises iniciais para a detecção de outros possíveis metabólitos halogenados foram realizadas por HPLC-HRMS/MS. O método utilizado na Tabela 3.6 foi utilizado em todas as análises cromatográficas para os extratos contendo substâncias com perfil de metabólitos halogenados. A coluna utilizada para as análises foi Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 250x4,6mm (5 mm de diâmetro de partícula) com eluição gradiente e uma vazão de 0,5 mL/min.

O método de análise utilizado no LC é mostrado na Tabela 3.6 e as condições do espectrômetro de massas são mostradas na Tabela 3.7.

TABELA 3.6: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.

Tempo (minutos)	% H ₂ O	% ACN
0	90	10
20	50	50
25	0	100
35	0	100

TABELA 3.7: Condições utilizadas no espectrômetro de massa.

Ionização	ESI ⁺
Capilar	3,70 kV
Cone	25 V
Extrator	5 V
Lentes RF	0,66 V
Temperatura do bloco da fonte	80°C
Temperatura de dessolvatação	250°

3.11.7 Síntese *in vitro* do bromo triptofano a partir do hipobromito de sódio

Para a síntese do triptofano bromado, foi necessário, inicialmente, produzir o hipobromito de sódio através da adição de 1g de NaOH em 3mL de água destilada em um balão. Esta mistura foi resfriada em banho de gelo e 600µL de Br₂ foram adicionados, gota a gota, a solução que se encontrava resfriada até adquirir coloração amarelada. O NaOBr formado foi adicionado lentamente à uma solução contendo 100 mg de triptofano em 1 mL de MeOH em pH 2,0 (acidificado com ácido fórmico). A reação foi interrompida após a solução adquirir coloração escura e análises por CCD indicarem que o triptofano teria sido consumido totalmente. A reação foi interrompida por meio da evaporação do solvente.

3.11.8 Reação *in vitro* do triptofano com diferentes volumes de NaOBr

Outro experimento foi realizado com a variação de volume de NaOBr utilizado na reação com o triptofano. O mesmo procedimento descrito

acima foi realizado, porém volumes de 1, 10, 50, 100 e 500 μL , 1, 5 e 10 mL foram adicionados em diferentes balões contendo o triptofano em meio acidificado. A obtenção dos extratos procedeu da mesma forma descrita no item 3.11.7.

As condições para análise por LC-MS/MS são mostradas a seguir:

TABELA 3.8: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.

Tempo (minutos)	% H ₂ O	% ACN	% MeOH
0	95	5	0
7	90	10	0
15	70	30	0
20	40	30	30
21	0	30	70
24	0	30	70

TABELA 3.9: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da cloroquefortina C.

Ionização	ESI ⁻
Capilar	3,43 kV
Cone	35 V
Extrator	5 V
Lentes RF	0,72 V
Temperatura do bloco da fonte	95°C
Temperatura de dessolvatação	300°

3.11.9 Reação *in vitro* da roquefortina C com NaOBr

Após a síntese do NaOBr de acordo com o item 3.11.7, a roquefortina C isolada como padrão foi colocada em um balão de fundo redondo contendo MeOH em uma solução final de pH 2 com ácido fórmico. O NaOBr formado foi adicionado, gota a gota, à solução até que a solução final adquirisse uma coloração escura. A solução foi concentrada em rotaevaporador rotativo, e os isômeros da bromoroquefortina C foram analisados por LC-HRMS/MS.

3.11.10 Experimentos com adição de bromotriptofano ao meio de cultura para produção da bromoroquefortina C

Para este experimento, 5mg da mistura reacional de bromotriptofano proveniente do item 3.11.7 foi adicionado ao meio de cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* contendo meio líquido Czapek. Entretanto, algumas modificações foram realizadas no meio de cultura para estudar a influência de algumas fontes na produção da bromoroquefortina C. As condições são mostradas a seguir:

- 3 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapek com 5 mg da mistura de bromotriptofano;
- 3 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapek e 2% de extrato de levedura com 5 mg da mistura de bromotriptofano;
- 3 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapek com 2% de uma mistura de aminoácidos encontrados no extrato de levedura, com exceção do triptofano com 5mg da mistura de bromotriptofano;

Como controle positivo, foram inoculados 3 Erlenmeyers contendo o meio líquido Czapek com 2% de extrato de levedura e NH₄Br 65

g/L e para controle negativo do experimento, o mesmo meio com exceção da adição de NH₄Br.

Para todos os experimentos de verificação da produção de bromoroquefortina C em LC-HRMS/MS as condições são mostradas a seguir:

A coluna utilizada para as análises foi Phenomenx Luna Phenyl-Hexyl 250x4,6mm (5 mm de diâmetro de partícula) com eluição gradiente e uma vazão de 0,5 mL/min.

O método de análise utilizado no LC é mostrado na Tabela 3.10 e as condições do espectrômetro de massas são mostradas na Tabela 3.11.

TABELA 3.10: Condições utilizadas no cromatógrafo líquido.

Tempo (minutos)	% H ₂ O	% ACN
0	90	10
20	50	50
25	0	100
35	0	100

TABELA 3.11: Condições do espectrômetro de massas utilizado nas análises da bromoroquefortina C.

Ionização	ESI ⁺
Capilar	3,70 kV
Cone	25 V
Extrator	5 V
Lentes RF	0,66 V
Temperatura do bloco da fonte	80°C
Temperatura de dessolvatação	250°

3.11.11 Cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* em meio líquido contendo triptofano e NH₄Br

Para verificar a incorporação do triptofano durante o crescimento de *Penicillium chrysogenum* na presença de íons brometo, o experimento foi proposto da seguinte maneira: o fungo foi inoculado em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapek com 2% de extrato de levedura e NH₄Br 65 g/L durante 40 dias. A cada 5 dias o crescimento do fungo era interrompido pela filtração à vácuo do micélio que era extraído com 50 mL de EtOH e o meio líquido era particionado com 50 mL de AcOEt (2x 25 mL) para a formação dos extratos.

3.11.12 Preparo do extrato enzimático para detecção da atividade da halogenase

Para a obtenção do extrato enzimático, o fungo *P. chrysogenum* foi cultivado em meio Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura e NH₄Br 65 g/L durante sete dias em modo estático. Após este período, o Erlenmeyer contendo o microrganismo em crescimento foi colocado em banho de gelo por 15 minutos e rapidamente o micélio filtrado com gaze. O meio líquido foi colocado em tubos Falcon em banho de gelo, enquanto ao micélio foi adicionado nitrogênio líquido para posterior trituração.

Após a obtenção do micélio congelado em pó, foram adicionados 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,2 para cada 10 g de micélio, que foi centrifugado a 12000 rpm em centrífuga refrigerada obtendo-se, o extrato enzimático proveniente do micélio.

O meio líquido foi concentrado em *speed vac* para obtenção do extrato enzimático proveniente do meio líquido.

3.11.13 Ensaio de atividade para detecção da halogenase

Os ensaios para detecção da atividade enzimática da halogenase foi realizado de acordo com o seguinte protocolo: 100 uL dos extratos obtidos no item 3.11.12 foram adicionados em um Eppendorf contendo FAD (10 uM), NADH (2,4 mM), NH₄Br (25 mM), L-triptofano (0,6 mM) e tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,2 em um volume total de 200 uL. A reação foi mantida a 30°C por 90 minutos, 2 e 6 horas para testes iniciais. Após os períodos estipulados, a reação foi interrompida por fervura em banho maria a 95°C por 5 minutos. As proteínas eram removidas por centrifugação e o extrato analisado por LC-MS/MS.

3.11.14 Extração do DNA genômico de *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii*

Inicialmente, os fungos utilizados no estudo foram inoculados e cresceram por 7 dias em meio líquido Czapek em mesa rotatória para a formação de *pellets*. Os *pellets* obtidos foram colocados em almofariz, previamente limpo com SDS e EtOH, para posterior adição de nitrogênio líquido. Após o congelamento, os *pellets* foram completamente triturados com o auxílio de um pistilo. O micélio macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga estéreis (eppendorfs) de 2 mL. Em cada eppendorf foi adicionado 150mg de micélio para 500 uL de tampão de extração de DNA.

Em seguida, adicionou-se 500 ul de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1) para a extração por 10 minutos com o auxílio de um

agitador rotativo. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12000 rpm e 4°C.

O sobrenadante foi transferido para novos tubos de microcentrífuga e a este foi adicionado RNase A (0,2 ug/uL). A solução foi colocada a 37°C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 500 uL de isopropanol com posterior agitação por inversão. A nova solução foi colocada em refrigerador a -20°C por 12 horas e posteriormente centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi retirado e o precipitado contendo o DNA genômico foi lavado com etanol 70% refrigerado (2x 500 uL). Ao final do processo, o DNA obtido foi seco a 37°C por 2 horas. Para estudos utilizando o DNA genômico de *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii*, os mesmos foram solubilizados em 20 uL de água destilada e armazenados em refrigeração a 4°C.

Os eppendorfs contendo gDNA dos fungos foram analisados por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.11.15. Ao gel adicionou-se 2 uL da mistura contendo gDNA e corante e submetidos a tensão de 110V por 50 minutos. Em seguida permaneceram por 10 minutos em solução contendo brometo de etídio e visualizados em luz UV.

3.11.15 Eletroforese em gel de agarose

As análises de DNA genômico, fragmentos de DNA, produtos de PCR e digestão de plasmídeos foram separados de acordo com seus tamanhos por eletroforese em gel de agarose 1%. Para isso, agarose foi aquecida com tampão 1xTAE até sua completa fusão e adicionados em recipientes apropriados para a formação do gel. Os substratos a serem analisados foram

misturados com DNA Gel Loading Dye 6X (Thermo Scientific) e a separação ocorreu em tampão 1xTAE com voltagem e tempo específicos para cada substrato.

3.11.16 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo foram sintetizados pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha).

As sequências dos genes utilizados para construção dos primers degenerados foram obtidas a partir de busca em bancos de dados (NCBI) com as halogenases expressas em organismos procariotos e eucariotos. Através do programa *Multialin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), as sequências foram alinhadas para verificação de regiões conservadas para o desenho dos oligonucleotídeos. Foram desenhados quatro primers pela comparação de halogenases de organismos procariotos (J1_for, J2_rev, J3_for, J4_rev) e quatro primers pela comparação de halogenases expressas por organismos eucariotos (J5_for, J6_rev, J7_for e J8_rev).

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador e as condições são descritas a seguir: 100 ng do gDNA previamente isolado, 50 pmol de cada primer, 1 mM de MgSO₄ e 2U de Pfu DNA Polymerase em um volume total de 50 uL contendo 2 mM de cada dNTP e 10% de DMSO. As condições de amplificação são mostradas na Tabela 3.12.

TABELA 3.12: Condições experimentais para PCR

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Denaturação	95	5
Denaturação	95	0.5
Anelamento	50	0.5
Elongamento	68	3
Elongamento final	68	5

A reação foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.11.15. 2 uL dos produtos foram misturados com corante e submetidos a tensão de 110V por 50 minutos. Em seguida permaneceram por 10 minutos em solução contendo brometo de etídio e visualizados em luz UV.

3.11.17 Purificação dos substratos separados por eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos separados pela eletroforese em gel de agarose foram extraídos utilizando o Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit #K0691, #0692 de acordo com as instruções do fabricante.

3.11.18 Hibridização do DNA genômico de *Penicillium chrysogenum* pela técnica de *Southern Blot*

Para a hibridização do gDNA, inicialmente é necessário que o DNA dos microrganismos seja obtido em fragmentos menores pela ação

de enzimas de restrição. Para o fungo *Penicillium chrysogenum*, as enzimas utilizadas foram: EcorI, HindIII, NcoI e PstI. Para cada enzima de restrição, utilizaram-se as instruções obtidas do fabricante. Para *Talaromyces wortmannii*, as enzimas utilizadas foram: BamHI, EcorV, HindIII, NotI, PstI e XbaI.

Após a obtenção do gDNA em fragmentos, a solução contendo os fragmentos foi separada por eletroforese em gel de agarose (0,7%). Para a separação, utilizou-se 50 uL da solução e as condições de separação foram 50V por 6 horas.

Em seguida, o gel foi colocado em uma solução de brometo de etídio por 15 minutos e visualizado em luz UV. A partir da obtenção dos fragmentos, o processo de hibridização do DNA foi iniciado da seguinte forma;

- *Lavagem do gel*: O gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo o tampão de desnaturação por 30 minutos, seguido de lavagem com água destilada (2x por 15 minutos) e 30 minutos em tampão de neutralização.

- *Transferência do DNA digerido do gel para a membrana*: A bancada foi limpa com etanol 70% e água e coberta com plástico filme seguido de papel filme cortado com o tamanho do gel. O gel de agarose foi colocado em cima do papel, sendo que o lado do gel contendo DNA estava em contato com o papel. Em cima do gel, adicionou-se uma membrana de nylon (o DNA digerido será transferido para a membrana), seguida de 3 camadas de papel Whatman, 10cm de papel toalha e peso de vidro uniforme. A transferência do gDNA digerido para a membrana ocorreu por 12 horas. Após este período, o peso e os papéis foram retirados e a membrana envolta em plástico filme foi colocada em câmara de luz UV por 3 minutos.

- *Marcando o probe*: o produto obtido da PCR com primers degenerados foi escolhido como probe para a busca do gene de interesse. Para isso, adicionou-se 16 uL de água destilada em 1 ug do produto da PCR. Esta solução permaneceu por 10 minutos a 96°C para que a fita dupla do DNA se desfizesse e em seguida resfriada em banho de gelo. A esta solução adicionou-se 4 uL de DIG-High-Prime (Roche) para a marcação do probe. Esta reação ocorreu a 37°C *overnight*. Para interromper a reação, a solução foi colocada a 65°C por 10 minutos. Para iniciar a pré-hibridização, a solução foi colocada a 96°C por 15 minutos e resfriada em gelo.

- *Pré-Hibridização*: A membrana contendo o gDNA digerido foi adicionada em um tubo de hibridização com o lado contendo o gDNA para cima e ao tubo adicionou-se 20 mL da solução de pré-hibridização. O tubo foi colocado por 3 horas em um forno para que a hibridização ocorresse. A temperatura selecionada para todas as reações de hibridização do gDNA de *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii* foi de 63°C.

- *Hibridização e etapas de lavagem*: Após o período estipulado anteriormente, a solução de pré-hibridização foi removida do tubo e adicionou-se 20 mL da solução de hibridização contendo o probe marcado e a hibridização ocorreu em um período de 14h (*overnight*). Após o período de hibridização a solução de hibridização foi retirada (esta solução contendo o probe marcado pode ser reutilizada se armazenado em refrigerador a -20°C) e adicionou-se ao tubo 100 mL de tampão de lavagem (2x50 mL por 15 minutos) e 100 mL de tampão de lavagem II (2x50 mL por 15 minutos). As duas etapas de lavagem ocorreram no forno de hibridização a 63°C.

- *Detecção*: Aguardar o forno retornar a temperatura ambiente e adicionar 100 mL de tampão de lavagem III por 5 minutos. Em seguida, 100

mL de tampão de bloqueio II por 30 minutos, seguido de 20 mL de tampão de bloqueio II contendo 1 uL de anticorpo (anti-DIG-AP) por 30 minutos (esta solução contendo o anticorpo pode ser reutilizada se armazenado em refrigerador a -20°C). Após as etapas de lavagem da membrana retirou-se a mesma do tubo de hibridização cuidadosamente, que em seguida foi colocada em recipiente de vidro com 200 mL de tampão de lavagem III (2x100 mL por 15 minutos) em temperatura ambiente sob agitação. Foram preparados 50 mL de tampão de detecção. Entretanto, 500 uL desta solução foi armazenado em eppendorf para posterior utilização. Os 50 mL de tampão de detecção foram adicionados ao recipiente de vidro contendo a membrana de nylon durante 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação.

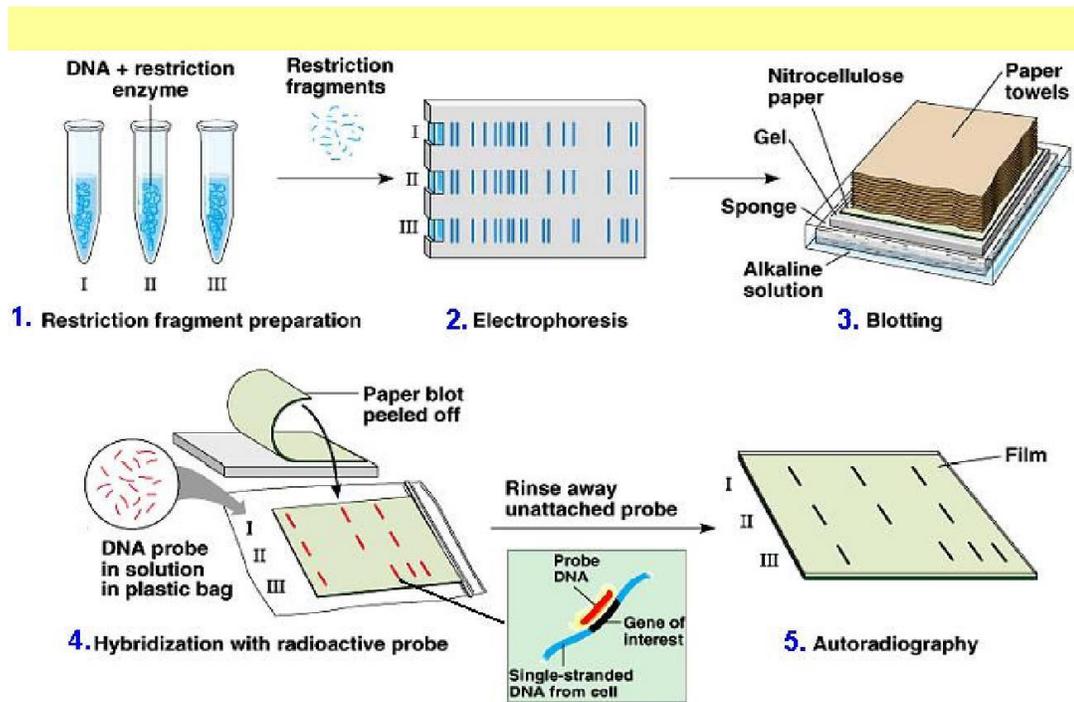
As etapas posteriores foram realizadas no escuro:

Adicionou-se aos 500 uL de tampão de detecção 5 uL do substrato quimioluminescente CRP-STARTM. A membrana foi colocada sob um plástico filme e a solução de tampão de detecção foi adicionada. Uma segunda membrana foi colocada sob a membrana para que o tampão de detecção se espalhasse de maneira uniforme e a mesma foi selada. Um pequeno corte foi feito no plástico para retirada de bolhas e excesso de solução. Com a solução na membrana, um filme radiográfico foi colocado por cima da mesma para incubação por 2 horas. Para a detecção no filme radiográfico, utilizou-se uma solução chamada de *developer* até o filme escurecer. Em seguida o filme foi colocado em água destilada e em seguida em uma solução denominada *fixer*.

- *Reutilizar o probe*: Caso seja necessário realizar o procedimento de hibridização novamente, a membrana pode ser utilizada novamente. Para isso, o filme plástico foi retirado e colocado em recipiente de vidro contendo água destilada. A membrana foi lavada com a solução de rehibridização

(2x100 mL) no tubo de hibridização a 37°C por 30 minutos. Em seguida, lavou-se a membrana com uma solução 2XSSC (100 mL por 30 minutos) e a mesma estava pronta para o processo de rehibridização.

O processo de hibridização de DNA é simplificado no Esquema 3.1.



ESQUEMA 3.1: Resumo do processo de hibridização do gDNA utilizado para detecção das halogenases de *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii*.

3.11.19 Clonagem dos fragmentos obtidos pela técnica de Southern Blot no vetor de clonagem pLITMUS28 – Reação de Ligação

As sequências de interesse obtidas no item 3.11.18 foram inseridas no vetor pLITUMUS28 através da reação de ligação. Cada mistura de ligação continha um volume total de 10 uL, sendo eles 2 uL do fragmento de gDNA digerido com as enzimas de restrição escolhidas pelo experimento de Southern Blot a, aproximadamente, 100 ng/uL, 1 uL de T4 DNA Ligase (6U), 5 uL do tampão T4 DNA ligase (2x) e 1 uL de solução contendo o vetor a 50 ng/uL. O volume total da solução foi completado com água ultra-pura. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 24h no escuro. As misturas da reação de ligação foram utilizadas na transformação por eletrochoque de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B.

3.11.20 Transformação da bactéria *E. coli* DH10B com os plasmídeos recombinantes de pLITMUS28

As suspensões de células eletrocompetentes, previamente armazenadas em refrigerador a -80°C foram mantidas em banho de gelo por 15 minutos. Para cada 50 uL de suspensão de células adicionou-se 1 uL da reação de ligação (produto da reação do item 3.11.19). Esta mistura sofreu o tratamento de eletrochoque e seguidamente adicionada a 250 uL de meio LB. O meio contendo as células foi mantido a 37°C por 1 hora sob agitação (150 rpm). Após este período, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 10 uL de antibiótico (ampicilina

100 mg/mL), 40 uL de X-Gal (50 mg/mL) e 30 uL de IPTG (0,5 M). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

3.11.21 Extração e análise dos plasmídeos recombinantes pLITMUS28 de *E. coli* 10HB

Após a incubação, algumas colônias brancas resistentes (possíveis clones positivos) foram selecionadas para a extração do DNA plasmidial. As culturas selecionadas foram repicadas em Erlenmeyers contendo 25 mL de meio LB líquido e ampicilina (100 mg/mL) e incubadas por 12h a 37°C a 250 rpm. Após o período de incubação, as células passaram por extração do DNA plasmidial utilizando o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

A primeira análise realizada foi a digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição utilizadas para digestão do gDNA dos microrganismos em estudo. Para isto, utilizou-se 1 uL dos DNAs plasmidiais, 1 uL da enzima escolhida para cada microrganismo (10U) juntamente com 1 uL de tampão característico da enzima (10x). A reação a 37°C num período de 2 horas. Após este período, os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) e visualizados em luz UV.

O clone identificado como positivo teve seu DNA plasmidial isolado por meio do kit descrito acima e enviado para sequenciamento na Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha). Após o sequenciamento do plasmídeo, uma busca no banco de dados no NCBI foi realizada para comparação por meio da ferramenta BLAST.

3.11.22 Ensaio biológico da roquefortina e bromoroquefortina C

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade em células tumorais foi realizado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. As células utilizadas neste estudo foram células de glioblastoma (SF-295) e de cólon (HCT-116) mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos a 37°C com 5% de CO₂. Para todos os experimentos, as células foram adicionadas em placas de 96 poços (105 células por poço). Após 24h, roquefortina C ou bromoroquefortina C (5,3 µM) solubilizadas em 1% de DMSO foram adicionadas em cada poço e as culturas foram incubadas por 69h. Os controles negativos (sem a presença de compostos ativos) receberam apenas a mesma quantidade de DMSO. O crescimento das células tumorais foi quantificado pela capacidade das células vivas reduzirem o corante MTT (=3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) de amarelo para roxo (Figura 5). Após o período de incubação as placas foram centrifugadas e 150 µL de meio de cultura recém preparado foi adicionado juntamente com MTT (0,5 mg/mL). Após 3 horas as placas foram centrifugadas e o corante reduzido dissolvido em 150 µL de DMSO, que foi lido em espectrofotômetro comparado com o controle negativo em 595 nm.

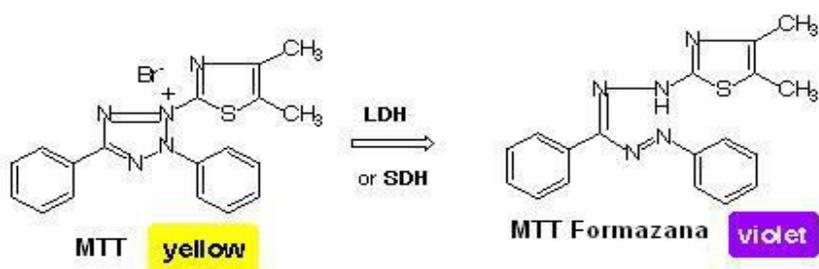


FIGURA 3.1: Redução do corante MTT para MTT formazana, utilizado na detecção da atividade citotóxica de células tumorais.

3.11.23 Experimentos de adição de substratos aromáticos e íons brometo para expressão da halogenase produzida por *Penicillium chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii*

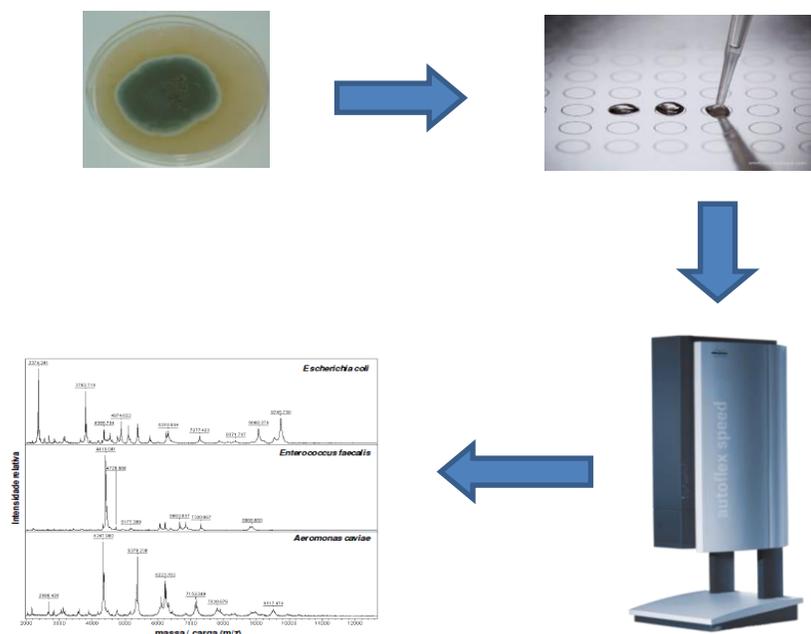
Para verificar se a presença de compostos aromáticos podem sofrer reações de halogenação, como foi observado para o triptofano, os fungos foram inoculados em meio líquido Czapek contendo 2% de extrato de levedura e NH₄Br a 65 g/L. Após autoclavagem dos meios, os substratos foram adicionados (0,5 mg/mL) e os fungos foram inoculados. Como controle negativo do experimento foram preparados Erlenmeyers sem adição de substrato. Após 15 dias o crescimento dos microrganismos foram interrompidos pela filtração do micélio e posterior partição líquido-líquido do meio líquido com AcOEt (2x50 mL) e o micélio foi extraído com 100 mL de EtOH por 24h para a obtenção dos extratos. Os extratos foram analisados por LC-MS/MS para verificação dos possíveis produtos de halogenação.

Os substratos utilizados no experimento foram: L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina, ácido para-hidroxibenzóico, ácido nicotínico, ácido para-aminobenzóico.

3.11.24 Condições de cultivo e análises das linhagens e *Penicillium* e *Aspergillus* da biblioteca do LaBioMMi pra criação da biblioteca de espectros do MALDI-TOF

Todos os microrganismos listados na micoteca do LaBioMMi como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram utilizados na construção da biblioteca de espectros do MALDI-TOF. Estes foram reativados através da retirada de um pedaço de BDA contendo os microrganismos de, aproximadamente, 1cmx1cm e inoculados em placas de Petri. Após 7 dias, os microrganismos foram repicados em placas de Petri e armazenados em BOD a 25°C por 7 dias. Os meios sólidos utilizados para as análises por MALDI-TOF e a construção da biblioteca foram: BDA, Aveia e Malte.

Após sete dias de crescimento, o procedimento de análise dos microrganismos foi realizado da seguinte maneira: em fluxo laminar estéril, um bastão pequeno de madeira, previamente autoclavado, era esfregado no fungo e colocado na placa utilizada para análises por MALDI-TOF. Após a deposição do material fúngico na placa, aplicou-se 10 uL de matriz utilizada para a ionização por MALDI. A matriz utilizada era HCCA (= ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) na concentração 5 mg/mL. Após a secagem da matriz, a placa estava pronta para análise. O Esquema 3.2 mostra a sequência experimental para a construção da biblioteca de microrganismos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*.



ESQUEMA 3.2: Procedimento Experimental para crescimento e análise de microrganismos por MALDI-TOF.

O perfil dos microrganismos foi observado no modo positivo de ionização utilizando um laser SmartBeam-II de 200 hZ (355 nm). A aquisição ocorreu de modo automático no modo linear e controlado pelo software FlexControl (v. 3.3, Bruker Daltonics). Os espectros foram adquiridos em um intervalo de massa de m/z 2.000 a 20.000. Em cada spot contendo os microrganismos, foram realizados 50 disparos do laser de forma aleatória até a aquisição de 500 espectros acumulados com qualidade e resolução aceitas pelo software. Cada spot recebeu os disparos em triplicata e cada microrganismo foi analisado em triplicata. A somatória de todos os espectros de cada microrganismo foi chamada de MSP (main spectrum) os quais foram inseridos na biblioteca do equipamento e utilizados na construção dos dendrogramas de comparação.

4. RESULTADOS

4.1 Produção da clororoquefortina C por *Penicillium chrysogenum*

Trabalhos relatados na literatura (BUTLER, *et.al.*, 2009; NENKEP, *et. al.*, 2010) mostram que ao modificar a fonte de halogênios no meio de cultura, alguns microrganismos são capazes de inserir o átomo de halogênio presente no meio de cultivo em certos metabólitos já produzidos por ele anteriormente. Este fato é observado devido à ação das enzimas responsáveis pelas reações de halogenação em microrganismos, que utilizam átomos de halogênio (bromo e cloro). Em geral, essas reações prosseguem da mesma maneira uma vez que os átomos possuem propriedades físico-químicas semelhantes.

Baseado nestas informações, o fungo *Penicillium chrysogenum* foi cultivado em meio líquido Czapek contendo extrato de levedura e NH_4Cl na mesma concentração de 65 g/L . Os extratos fúngicos obtidos pela extração do micélio com etanol e partição do meio líquido foram analisados por LC-MS/MS a fim de observar a produção de substâncias cloradas.

Através dos experimentos em modo *full scan*, não detectou-se a produção da clororoquefortina C, entretanto através da busca por íons selecionados com m/z 424 verificou-se o aparecimento de uma banda cromatográfica referente a tal íon. Por meio de experimentos de íons fragmentos no modo MS/MS obteve-se o espectro de massa que é mostrado na Figura 4.1, juntamente com o espectro de íons fragmentos da roquefortina C.

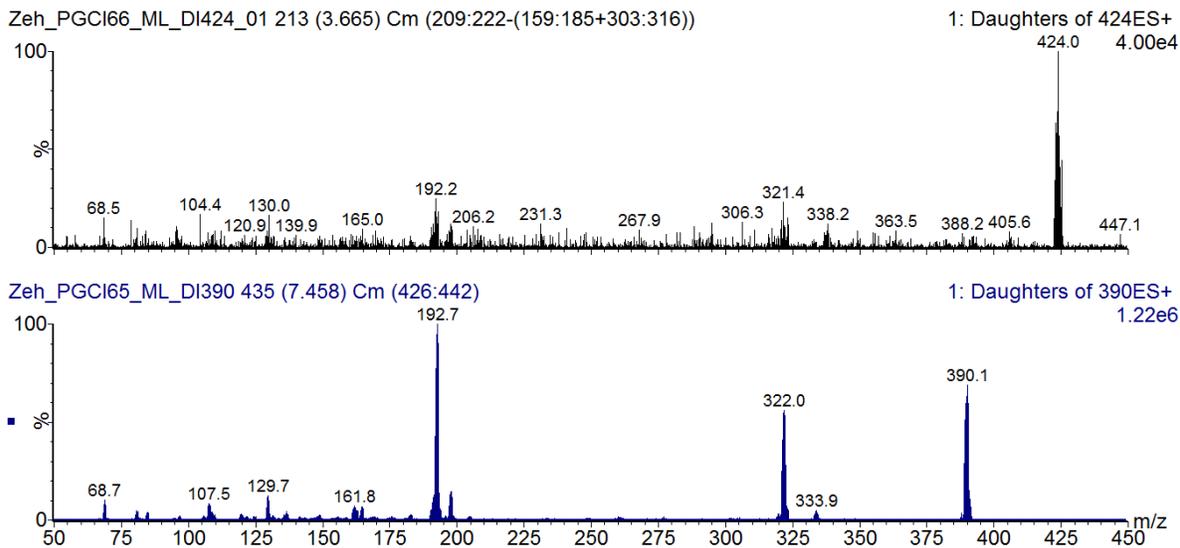


FIGURA 4.1: Espectro de íons fragmentos de m/z 424 correspondente à clororoquefortina C e m/z 390 referente à roquefortina C.

Através da interpretação dos espectros de massas obtidos, observa-se a formação do pico base do espectro de íons fragmentos característico para a roquefortina C (m/z 193). A energia de ionização utilizada para a fragmentação da clororoquefortina C não foi eficiente, não havendo a formação de outros íons característicos da fragmentação da roquefortina C. A semelhança entre os espectros sugere a formação da roquefortina clorada, juntamente com a presença do íon m/z 426 referente a $[M+2+H]^+$ com intensidade de 33%.

Através destes experimentos ficou evidenciado que o fungo *Penicillium chrysogenum* também era capaz de adicionar um átomo de cloro na estrutura da roquefortina C, porém esta foi detectada em baixa concentração – fato evidenciado pela baixa intensidade da corrente iônica nos experimentos MS/MS. Da mesma forma, outros metabólitos clorados não

puderam ser detectados. A Figura 4.2 mostra a estrutura da clororoquefortina C detectada produzida por *P. chrysogenum*.

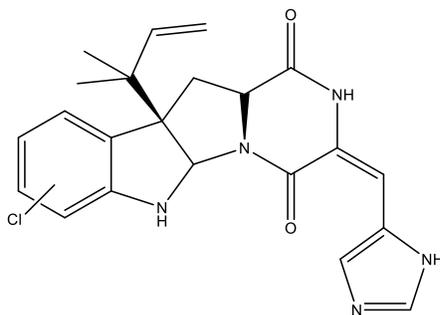


FIGURA 4.2: Estrutura da clororoquefortina C, detectada em extratos do fungo *P. chrysogenum*.

4.2 Curva de crescimento e produção da roquefortina C e bromoroquefortina C

Para verificar o comportamento da produção da roquefortina C e bromoroquefortina C durante o crescimento de *Penicillium chrysogenum*, fez-se o cultivo do microrganismo em meio Czapek contendo 2% de extrato de levedura e NH_4Br e a cada 5 dias o crescimento do fungo era interrompido e o meio líquido e o micélio eram extraídos e analisados por LC-MS/MS. Em cada alíquota era acompanhada a produção dos metabólitos derivados da rota biossintética dos alcaloides dicetopiperazínicos através de experimentos de SRM. As transições escolhidas para as análises foram: roquefortina C: 390 > 322; bromoroquefortina C: 468 > 400 e bromotriptofano: 283 > 196. As transições escolhidas serão discutidas posteriormente. As Figuras 4.3 e 4.4 mostram a curva de produção da roquefortina C e da bromoroquefortina C, respectivamente.

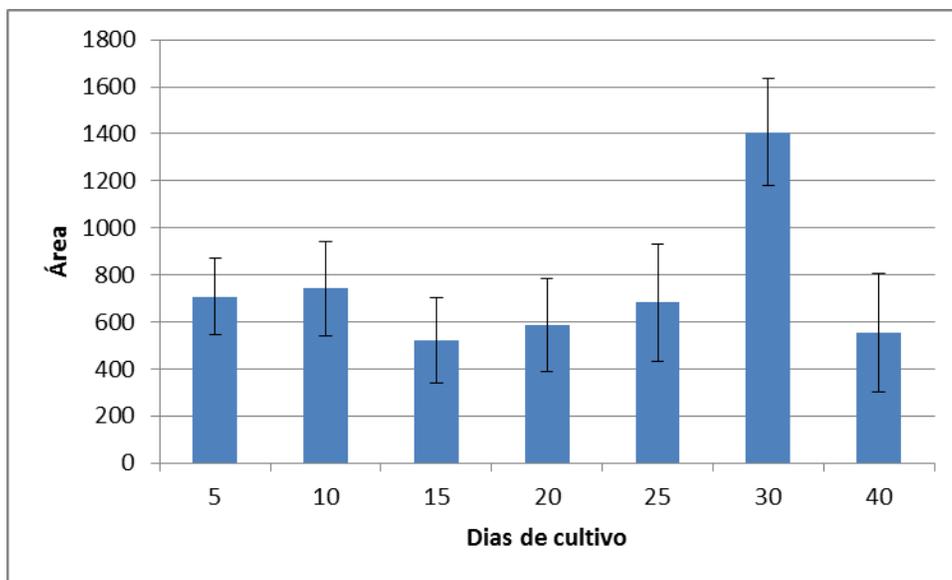


FIGURA 4.3: Curva de produção da roquefortina C produzida por *Penicillium chrysogenum*.

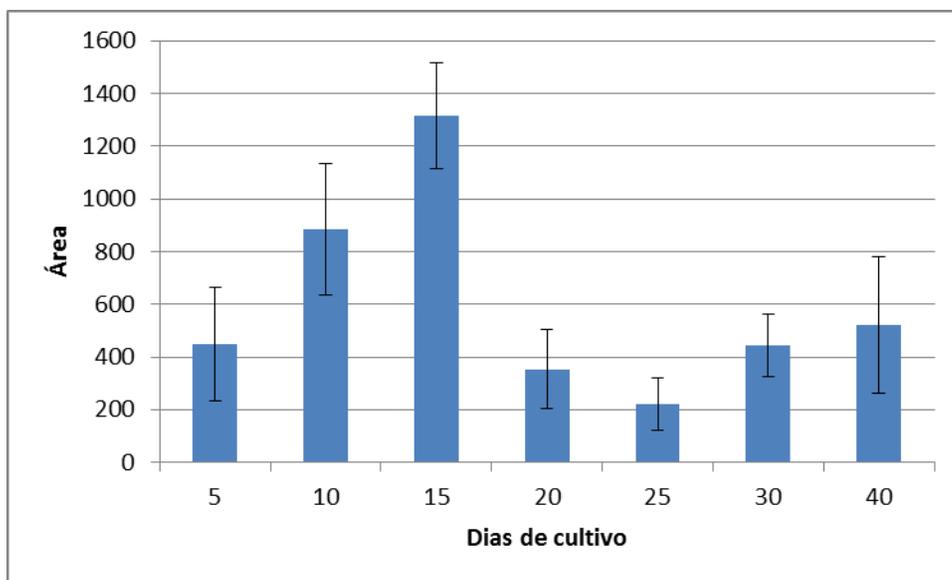


FIGURA 4.4: Curva de produção da bromoroquefortina C produzida por *Penicillium chrysogenum*.

Através destes experimentos observa-se que a maior concentração de roquefortina C se dá em 30 dias de cultivo, enquanto que para a bromoroquefortina C a maior concentração acontece após 15 dias. Além

disso, aferiu-se que a presença de íons brometo no meio de cultura influencia na produção das roquefortinas, já que observa-se primeiramente a produção do metabólito halogenado, enquanto que o maior pico de produção do não halogenado acontece após 15 dias depois do halogenado.

Sabe-se que a halogenação de anéis aromáticos deve acontecer através de reações de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr) após a oxidação dos halogênios para que estes possam se tornar bons eletrófilos. A oxidação dos íons brometo para a formação de um eletrófilo deve ocorrer nos primeiros dias de crescimento do fungo, uma vez que a produção da substância halogenada é observada inicialmente. Além disso, supõe-se que a etapa de halogenação ocorra nas etapas iniciais da biossíntese, uma vez que não se observa o acúmulo de intermediários biossintéticos não-halogenados. Em 5 dias, uma maior concentração do metabólito não halogenado foi detectada, enquanto nos dias 10 e 15 os íons brometo começam a ser oxidados e começam a reagir com os substratos, levando à formação do metabólito halogenado. Após a oxidação dos íons halogênio e consumo dos mesmos, o microrganismo produz majoritariamente a roquefortina C.

Após a constatação de maior produção de bromoroquefortina C nos primeiros 15 dias de crescimento de *Penicillium chrysogenum*, fez-se necessário o cultivo do microrganismo na presença de triptofano, uma vez que este aminoácido é o precursor das roquefortinas. Assim, seria possível verificar o comportamento do aminoácido na produção dos alcaloides.

4.3 Adição de triptofano ao meio de cultura durante o crescimento de *Penicillium chrysogenum*

Após a obtenção dos extratos a cada cinco dias, os mesmos foram analisados por LC-MS/MS por meio de experimentos SRM nas transições citadas acima e a Figura 4.5 mostra a curva de produção do bromotriptofano por *P. chrysogenum*.

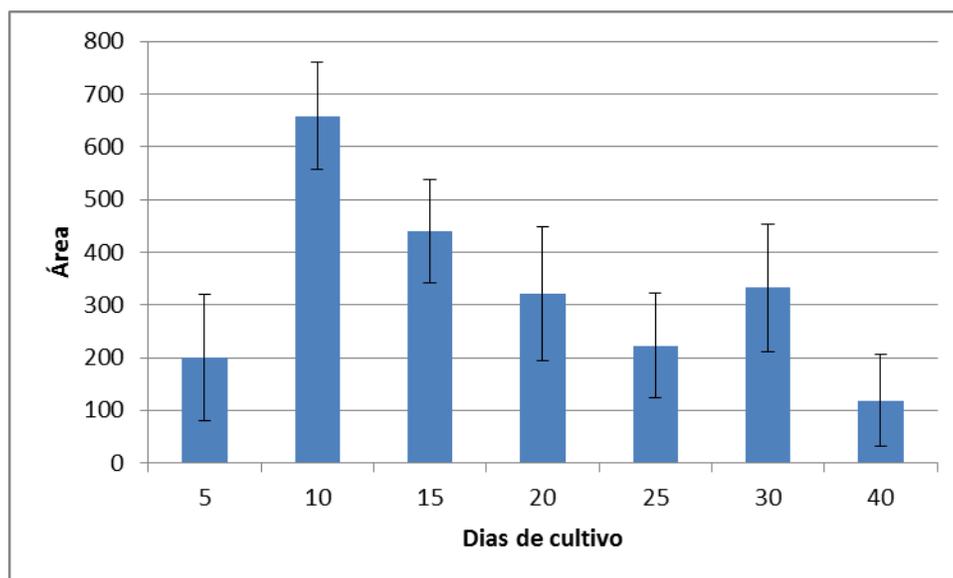


FIGURA 4.5: Curva de produção do bromotriptofano produzido por *Penicillium chrysogenum*.

Observa-se que o triptofano sofre a reação de bromação e o máximo de produção observado foi em 10 dias. Ao analisar os cromatogramas do modo SRM, observa-se também que a produção do bromotriptofano ocorreu de forma regioseletiva, como é observado na Figura 4.6.

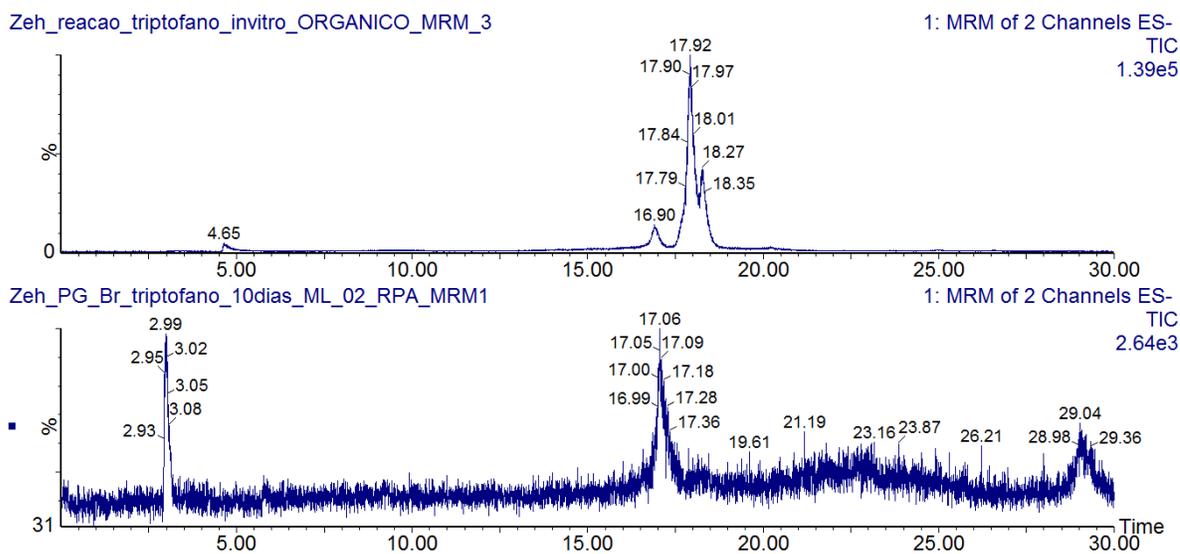


FIGURA 4.6: Cromatograma da produção de bromotriptofano por *P. chrysogenum*.

De acordo com os cromatogramas mostrados acima, o fungo foi capaz de produzir somente um isômero do bromotriptofano, enquanto que a reação *in vitro* produziu os isômeros já relatados acima. A discussão da produção de um único isômero será discutida posteriormente com os outros dados obtidos.

4.4 Detecção de outros metabólitos halogenados derivados dos alcaloides dicetopiperazínicos

Sabendo do potencial enzimático para halogenação do microrganismo, decidiu-se verificar a bromação de outros metabólitos produzidos por *Penicillium chrysogenum*. A verificação deste fato foi realizada inicialmente por experimentos de LC-MS no modo *full scan* pela presença do íon $[M+2+H]^+$ com 98% de intensidade quando comparado ao $[M+H]^+$, referente à presença dos isótopos ^{79}Br e ^{81}Br . A Figura 4.7 mostra os

cromatogramas de íons extraídos de bandas que possuíam em seu espectro de massa as condições citadas acima.

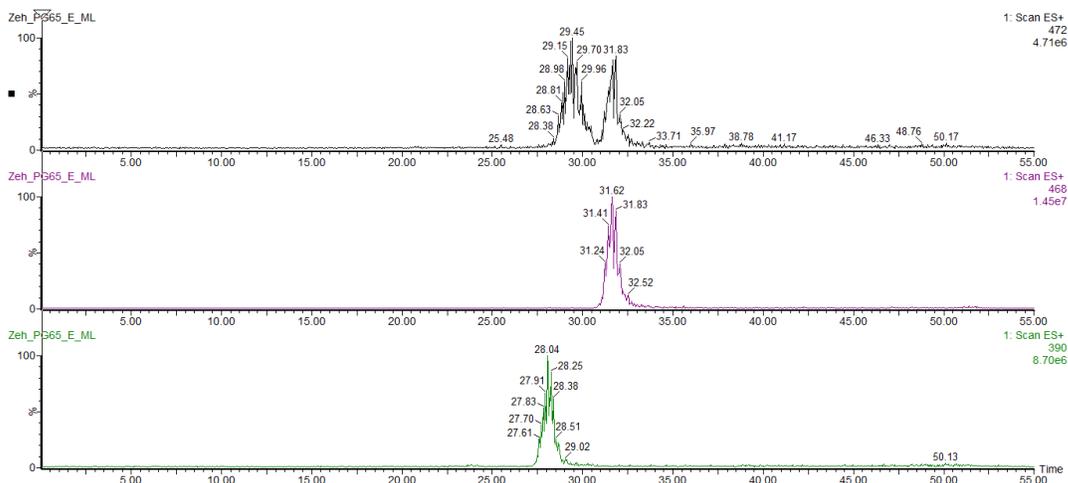


FIGURA 4.7: Cromatogramas de íons extraídos das bandas cromatográficas que possuíam íons com perfil isotópico característico de moléculas contendo átomos de bromo.

Os espectros de massa referente às bandas mostradas acima podem ser vistos na Figura 4.8.

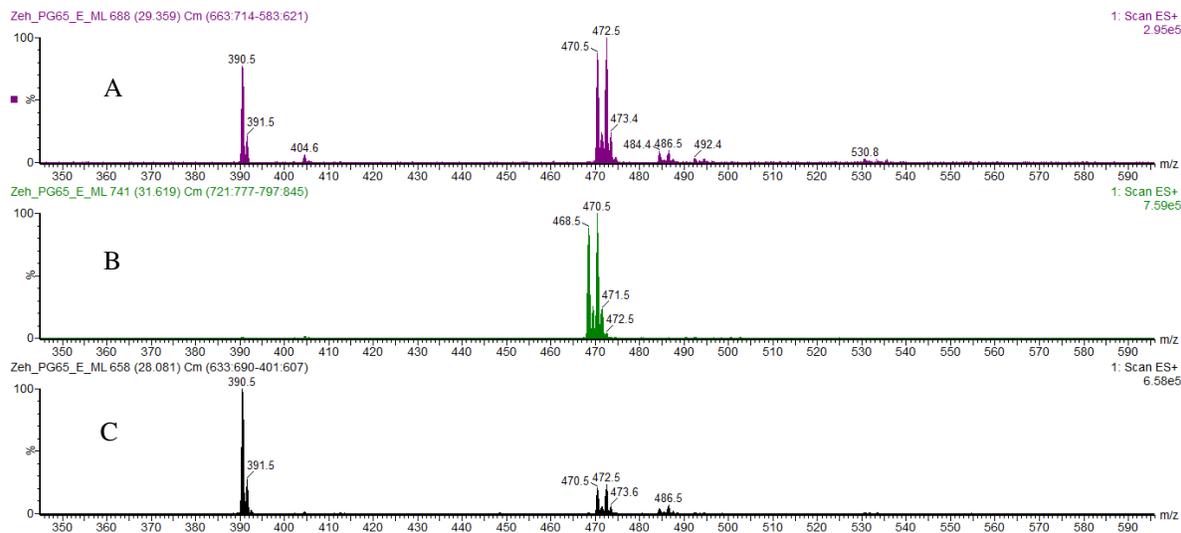


FIGURA 4.8: Espectros de massas das moléculas contendo átomos de halogênios em suas estruturas.

Comparando os resultados obtidos com aqueles já adquiridos anteriormente (SILVA, 2011) mostrado nas Figuras 4.5 e 4.6, observa-se que a banda em 28,08 minutos (Figura C) pertence à roquefortina C, enquanto a banda em 31,62 minutos (Figura B) observa-se a presença da bromoroquefortina C, cujos dados espectroscópicos foram extensivamente estudados anteriormente (SILVA, 2011). Já a banda em 29,36 minutos (Figura A) apresenta um espectro de massa cujo íon mais intenso é o $[M+H]^+$ com m/z 470 e $[M+2+H]^+$ de m/z 472, que apresenta duas unidades de massa a mais que a bromoroquefortina C. Nota-se que a banda em 28,08 minutos (Figura C) também apresenta um íon pouco intenso, porém com proporção isotópica característica de uma molécula contendo átomo de bromo (proporção de 1:1 entre os íons de m/z 484 ($[M+H]^+$) e m/z 486($[M+2+H]^+$)), ou seja, contendo 16 unidades de massa a mais que a bromoroquefortina C.

Pelo fato de todas as moléculas apresentarem tempos de retenção próximos e espectros de UV semelhantes, supôs-se que estas pertenciam a mesma classe de substâncias. Dessa forma, experimentos de MS/MS foram realizados para estudar os íons fragmentos de todas as moléculas a fim de obter mais informações estruturais sobre as mesmas. Entretanto, a concentração destas nos extratos era muito baixa e ao realizar os experimentos no modo MS/MS não foi possível detectar os íons de interesse, uma vez que há perda de sensibilidade ao executar este tipo de experimento em espectrometria de massa. Desta forma, para os estudos de espectrometria de massas no modo MS/MS foi necessário realizar experimentos em alta resolução (HRMS/MS), cuja sensibilidade é maior comparada a um de baixa resolução.

As figuras abaixo mostram o espectro de MS e MS/MS em alta resolução de todas as moléculas derivadas da rota biossintética das roquefortinas.

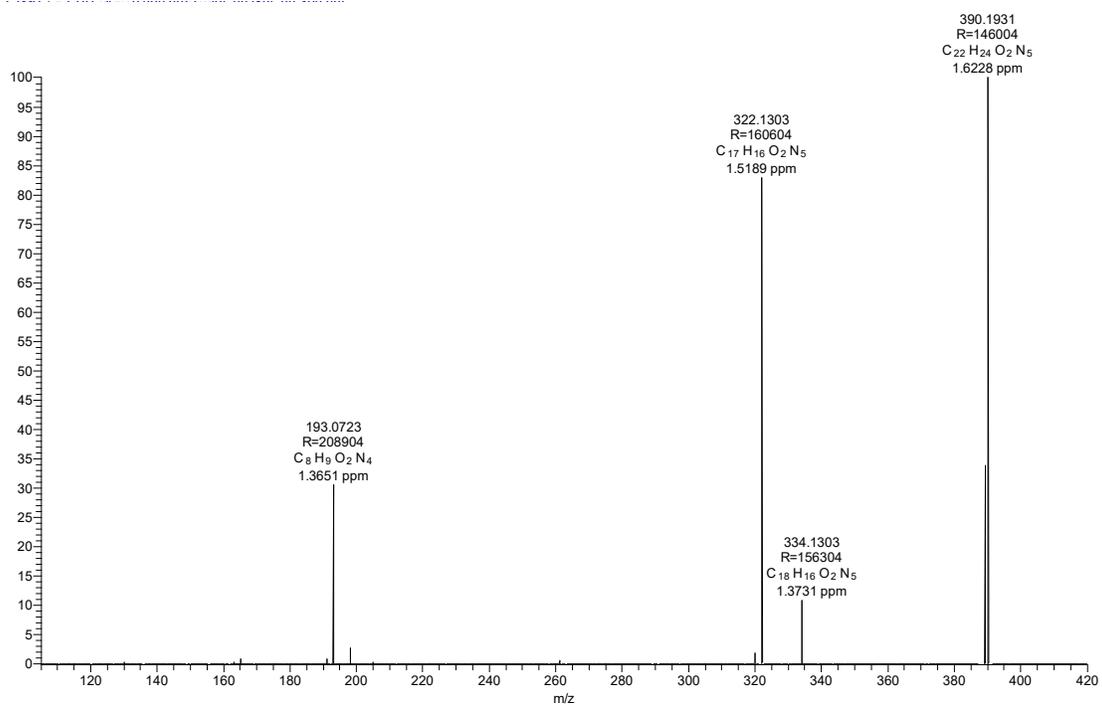
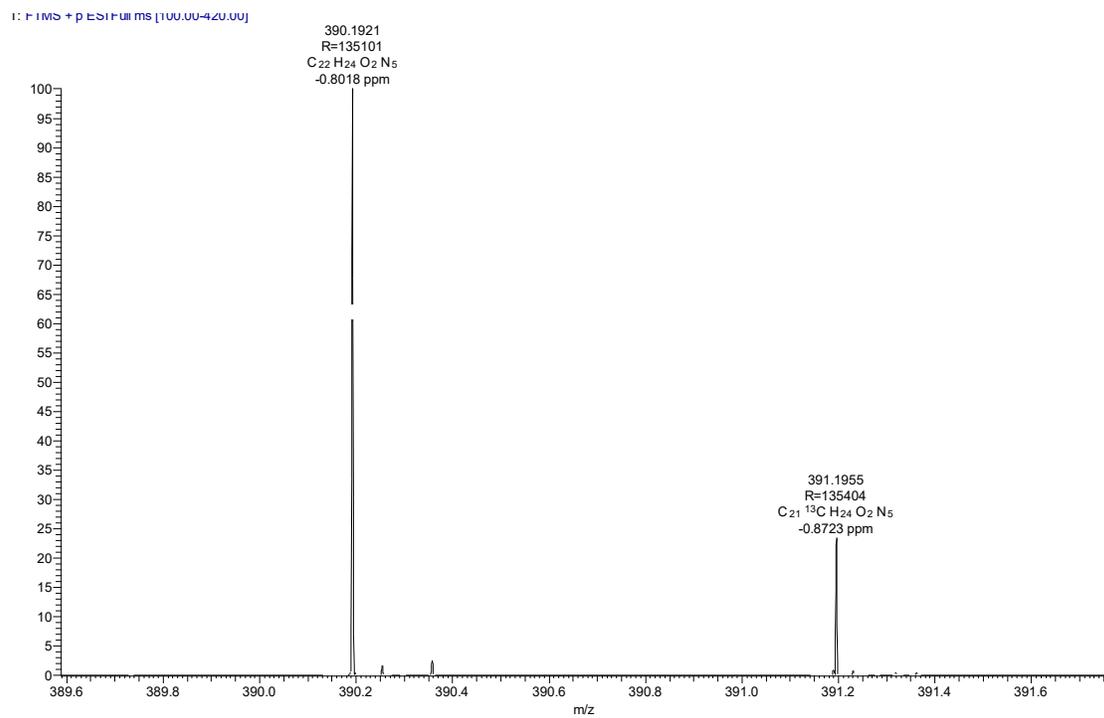


FIGURA 4.9: Espectro de MS e MS/MS da roquefortina C.

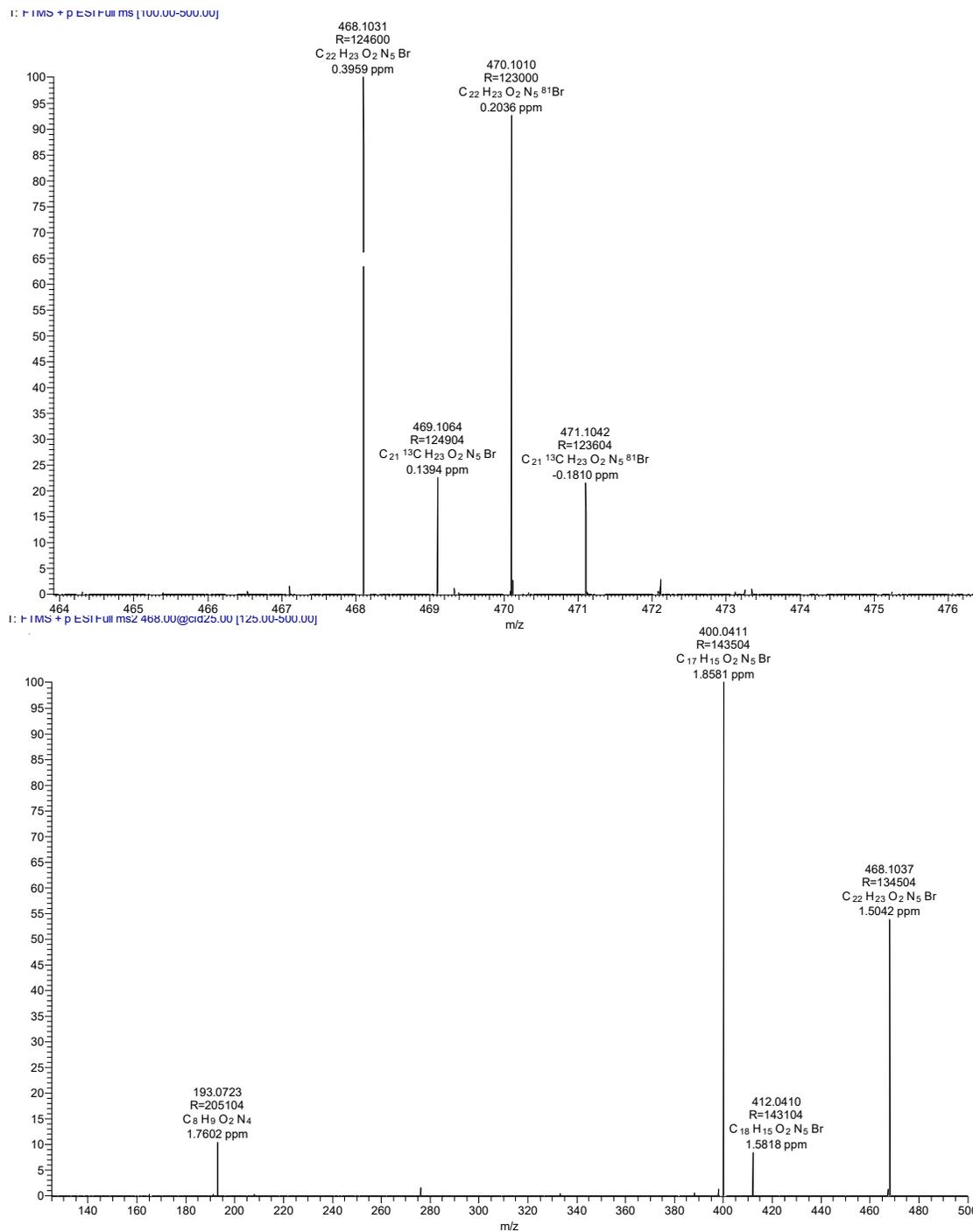


FIGURA 4.10: Espectro de MS e MS/MS da bromoroquefortina C.

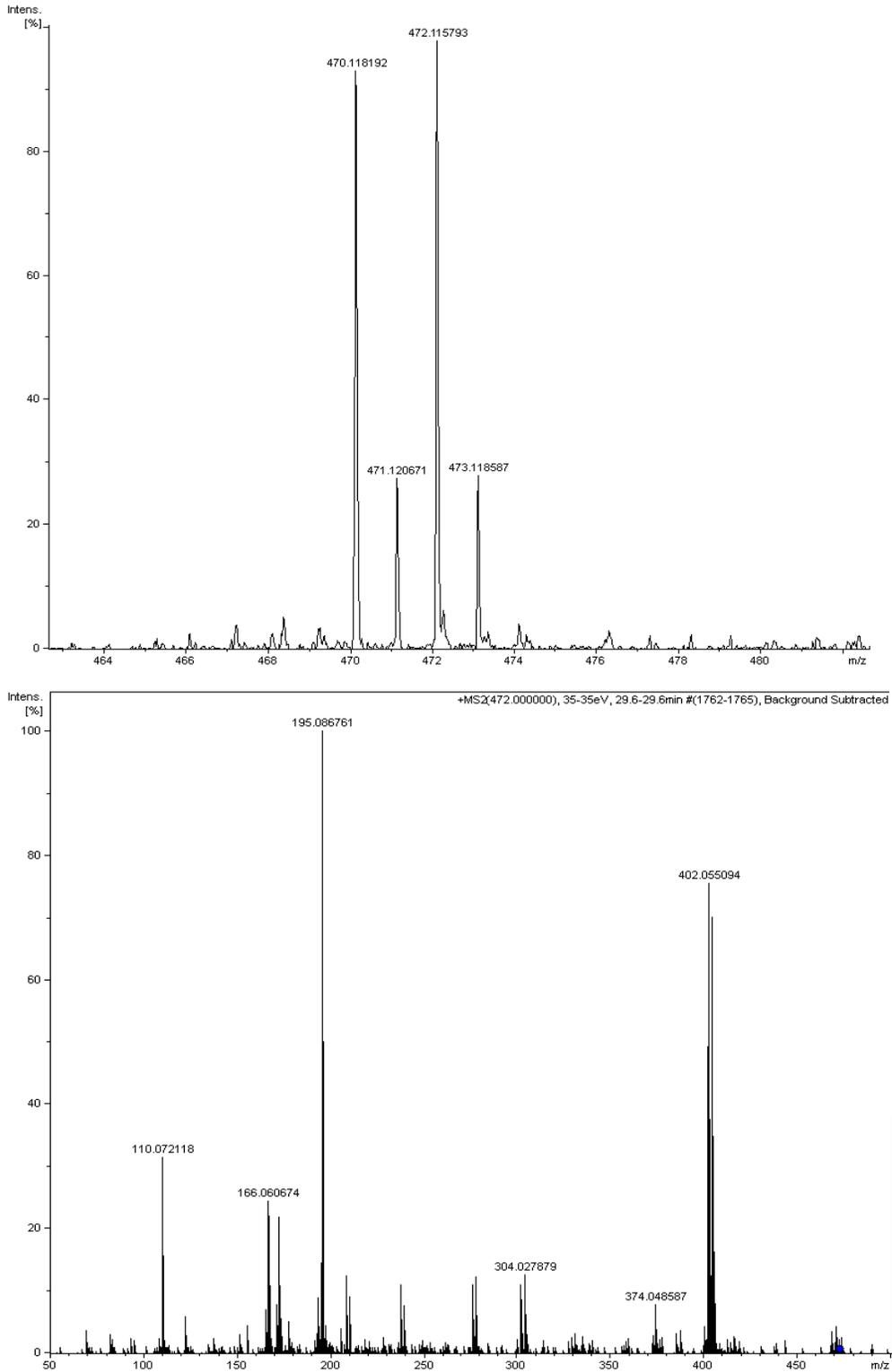


FIGURA 4.11: Espectro de MS e MS/MS do íon m/z 470.

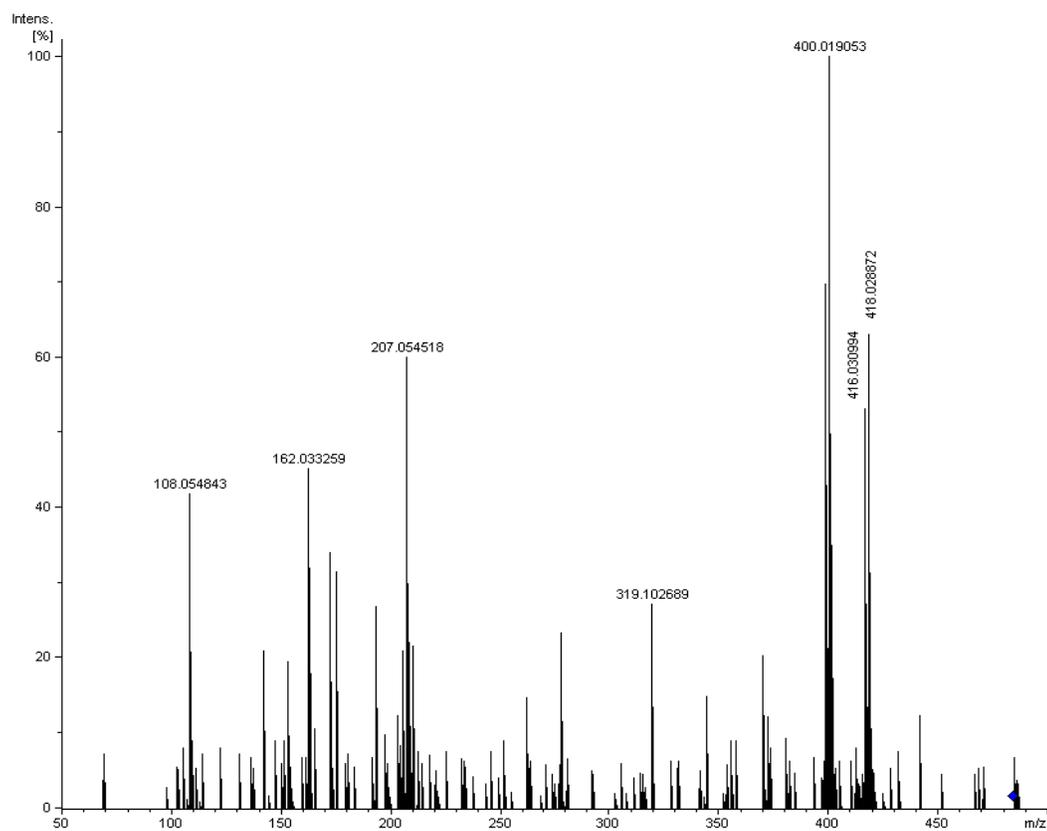
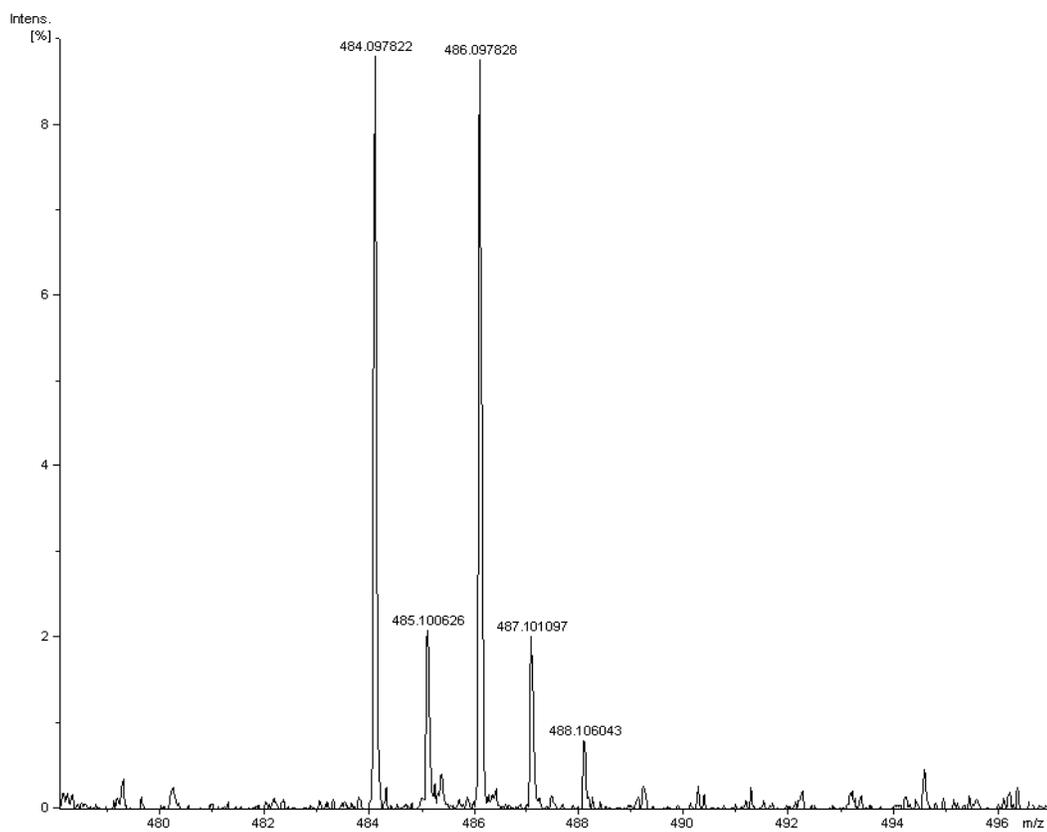


FIGURA 4.12: Espectro de MS e MS/MS do íon m/z 484.

Após a comparação dos dados são observadas semelhanças entre os espectros de íons fragmentos para todos os metabólitos encontrados no extrato de *Penicillium chrysogenum*, indicando que estas também deveriam possuir alta semelhança estrutural.

Para a roquefortina C (**1**) encontrou-se m/z 390,1921 correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{24}N_5O_2$. No espectro de íons filhos, m/z 322,1303; m/z 193,0723; m/z 165,0723 e m/z 69,0448 são os fragmentos encontrados. Para a bromoroquefortina C (**2**) m/z 468,1031 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{23}^{79}BrN_5O_2$) e 470,1010 $[M+H+2]^+$ ($C_{22}H_{23}^{81}BrN_5O_2$) os fragmentos m/z 400,0411; m/z 193,0723 e m/z 69,0450 foram detectados e para o composto **3** m/z 470,1182 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{25}^{79}BrN_5O_2$) e 472,1158 $[M+2+H]^+$ ($C_{22}H_{25}^{81}BrN_5O_2$), os fragmentos m/z 402,0551; m/z 195,0867 e m/z 69,0448 são encontrados. Para o composto **4**, $[M+H]^+$ 484,0978 ($C_{22}H_{23}^{79}BrN_5O_3$) e $[M+H+2]^+$ 486,0978 ($C_{22}H_{23}^{81}BrN_5O_3$) foram encontrados fragmentos como m/z 416,0309; m/z 398,0210; m/z 207,0545 e m/z 69,0448.

A partir dos estudos de fragmentação obtidos por espectrometria de massas de alta resolução e das possíveis fórmulas moleculares, a roquefortina C foi utilizada como modelo para propor a estrutura das novas moléculas halogenadas, uma vez que as moléculas poderiam ser oriundas da mesma rota biossintética.

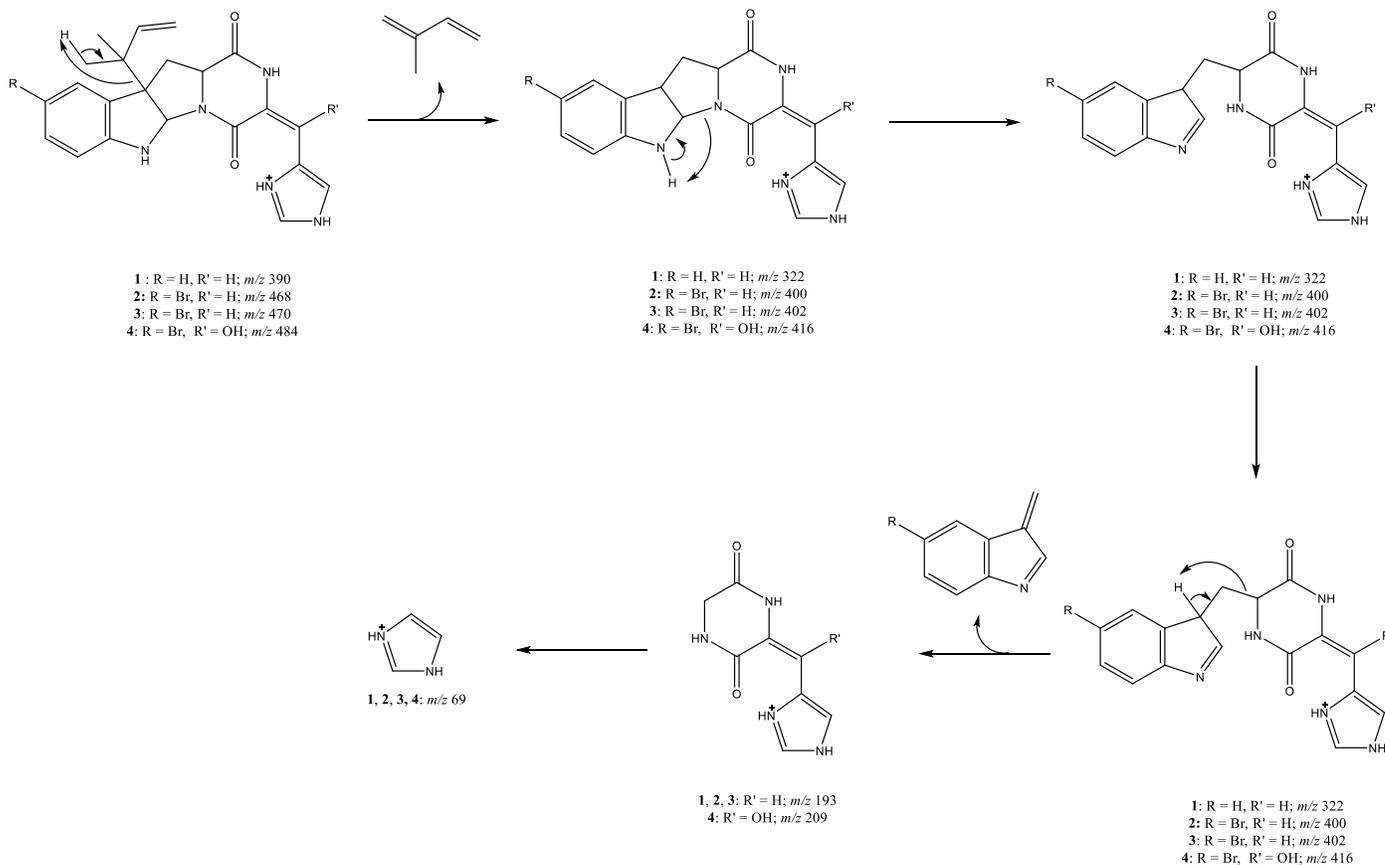
A partir dos estudos com a roquefortina C verifica-se o íon de m/z 390,1921 levando aos fragmentos m/z 322,1303; m/z 193,0723 e m/z 69,0448. Inicialmente observa-se uma perda de 68 u.m.a, a qual pode ser atribuída à perda da unidade de imidazol da histidina ou da prenila. Pelos dados de HRMS, confirma-se que a perda é referente à unidade da prenila, (C_5H_8) por um rearranjo [1,3] de hidrogênio, conforme pode ser visto na primeira etapa da proposta de fragmentação abaixo. Após a perda da unidade

C₅H₈, há uma abertura do anel de cinco membros contendo o átomo de nitrogênio e posterior rearranjo [1,3] de hidrogênio, havendo a perda do grupo indol. Esta perda ocorre no resíduo de triptofano da molécula, levando à formação do íon m/z 193.

Todos os metabólitos detectados possuem íons de m/z próximas às encontradas para a roquefortina C. O perfil de fragmentação e a intensidade dos íons também foram semelhantes, levando a uma maior confirmação que todas as substâncias possuem semelhança estrutural, salvo a presença de alguns outros átomos.

Em todos os experimentos de MS/MS o íon m/z 69 foi detectado e de acordo com os estudos de HRMS/MS, este é referente à formação do imidazol protonado (proveniente do resíduo de histidina). Como este fragmento foi comum a todos os compostos, este pode ser utilizado como íon diagnóstico para os metabólitos provenientes da classe dos alcaloides dicetopiperazínicos. Assim, experimentos de íons precursores de m/z 69 podem levar a identificação de novos metabólitos desta classe. O experimento citado foi realizado, porém os dados não são mostrados aqui uma vez que as mesmas moléculas foram detectadas.

A partir das informações obtidas dos experimentos de espectrometria de massas em alta resolução, a proposta de fragmentação da roquefortina C e seus derivados halogenados é mostrada no Esquema 4.1.



ESQUEMA 4.1: Proposta de fragmentação para os metabólitos isolados e detectados no extrato de *Penicillium chrysogenum*.

A substância **3**, apresenta duas unidades de massa a mais que a bromoroquefortina C e nos experimentos de MS/MS os íons m/z 402 e m/z 195 também apresentam duas unidades de massas a mais que **2**. O íon imidazol protonado é também observado, constatando que não há diferença na porção contendo o imidazol na molécula. A perda de 68 u.m.a inicial, assim como a perda da unidade indólica é a mesma, ou seja, a diferença seria então a redução de uma dupla ligação na unidade da histidina da molécula. A

substância **3** foi atribuída a roquefortina D contendo um átomo de bromo em sua estrutura, aqui denominada bromoroquefortina D. A roquefortina D é um metabólito já relatado na literatura como uma substância produzida durante a rota biossintética dos alcaloides dicetopiperazínicos. Durante a formação da roquefortina C, a roquefortina D é oxidada levando a formação de **1**. A biossíntese destes metabólitos será discutida posteriormente, pois é essencial para o entendimento da formação dos metabólitos halogenados.

O mesmo é encontrado em **4**, cuja diferença é de 16 u.m.a correspondente a presença de um átomo de oxigênio extra na molécula. Na proposta de fragmentação este átomo é posicionado também no carbono da dupla ligação (C17) contendo uma hidroxila. Os fragmentos observados na proposta estão de acordo com a estrutura encontrada nos experimentos de HRMS/MS.

Desta forma, as estruturas propostas para os metabólitos já relatados anteriormente (SILVA, *et. al.*, 2014) e as novas substâncias são mostradas na Figura 4.13.

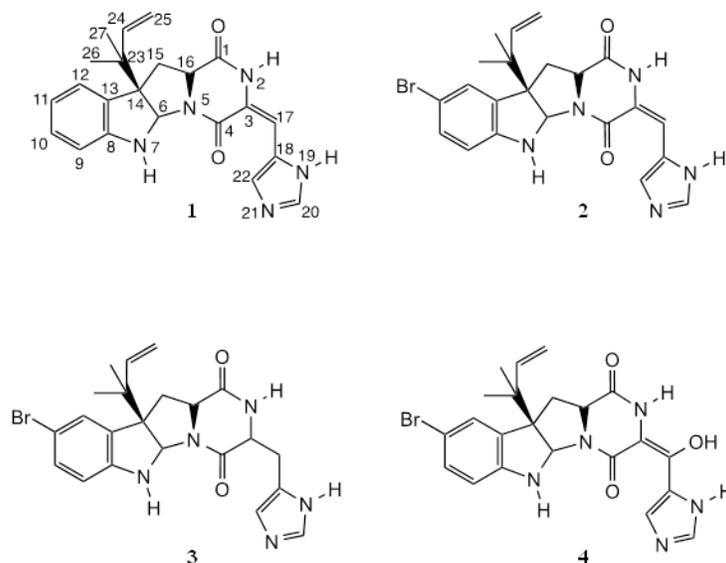


FIGURA 4.13: Estruturas propostas para os alcaloides isolados e detectados de *Penicillium chrysogenum*.

Todos os dados obtidos por espectrometria de massas em alta resolução são resumidos na Tabela 4.15.

TABELA 4.1: Dados obtidos por HRMS/MS para os alcaloides derivados da rota dos alcaloides dicetopiperazínicos.

Cpd	[M+H] ⁺	Fórmula	Δ (ppm)	Fragmentos MS/MS importantes
1	390.1921(a)	C ₂₂ H ₂₄ N ₅ O ₂	-0.8018	322.1303 (b), 193.0723 (c), 165.0776, 69.0448(ImH)
2	468.1031(a) 470.1010(a)	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂ ⁷⁹ Br C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂ ⁸¹ Br	0.3959	400.0411(b), 193.0723(c), 69.0448(ImH)
3	470.1182(a) 472.1158(a)	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₂ ⁷⁹ Br C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₂ ⁸¹ Br	0.8508	402.0551(b), 195.0867(c), 69.0448(ImH)
4	484.0978(a) 486.0978(a)	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃ ⁷⁹ Br C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃ ⁸¹ Br	0.1239	416.0309(b), 398.0210(b-H ₂ O), 207.0545, 69.0448(ImH)

4.5 Investigação da rota biossintética

Em estudos anteriores (SILVA, 2011), foi observado que a indução de novas rotas metabólicas por meio da adição de nutrientes halogenados ao meio de cultura do fungo *Penicillium chrysogenum* levou a produção de novos metabólitos halogenados de baixa a média polaridade, dentre elas a bromoroquefortina C, até então inédita na literatura. Quando submetido a condições normais de cultivo (sem a presença de sais contendo ânions halogenetos), o fungo era capaz de produzir roquefortina C, uma

micotoxina comumente encontrada em espécies de *Penicillium* (VERPOORTE, *et. al.*, 1999).

Por meio de revisões bibliográficas (Refer.), observou-se que a roquefortina é um alcalóide dicetopiperazínico, cuja rota biossintética tem sido amplamente investigada devido a grande atividade farmacológica atribuída aos alcaloides pertencentes a esta classe de produtos naturais. A biossíntese destes metabólitos é iniciada pela condensação dos alcaloides triptofano e histidina levando a formação da histidilriptofanildicetopiperazina (HTD), dihidrohistidilriptofanildicetopiperazina (DHTD), roquefortina D, roquefortina C, glandicolina A, glandicolina B e meleagrina. Todos os genes para cada etapa enzimática já foram detectados, isolados e caracterizados. A rota sugerida por ALI, *et.al.* (2013) sugere que a enzima RoqA (uma NRPS) aceita a L-Histidina e o L-Triptofano como substratos levando à produção dos compostos HTD e DHTD. A dimetilalilriptofano sintetase RoqD é capaz de prenilar HTD e DHTD levando à formação da roquefortina D e roquefortina C, respectivamente, sem a síntese de um intermediário e o envolvimento da RoqM como era descrito anteriormente. Desta forma é proposta uma ramificação na rota biossintética destes metabólitos secundários. A partir da formação da roquefortina C, a mesma é convertida em glandicolina A e B envolvendo duas monoxigenases (RoqM e RoqO). Consequentemente, o metabólito meleagrina é formado a partir da glandicolina B sob a ação de uma metiltransferase (RoqN). A rota biossintética dos alcaloides dicetopiperazínicos é mostrada na Figura 4.14, onde todos os genes envolvidos são apresentados.

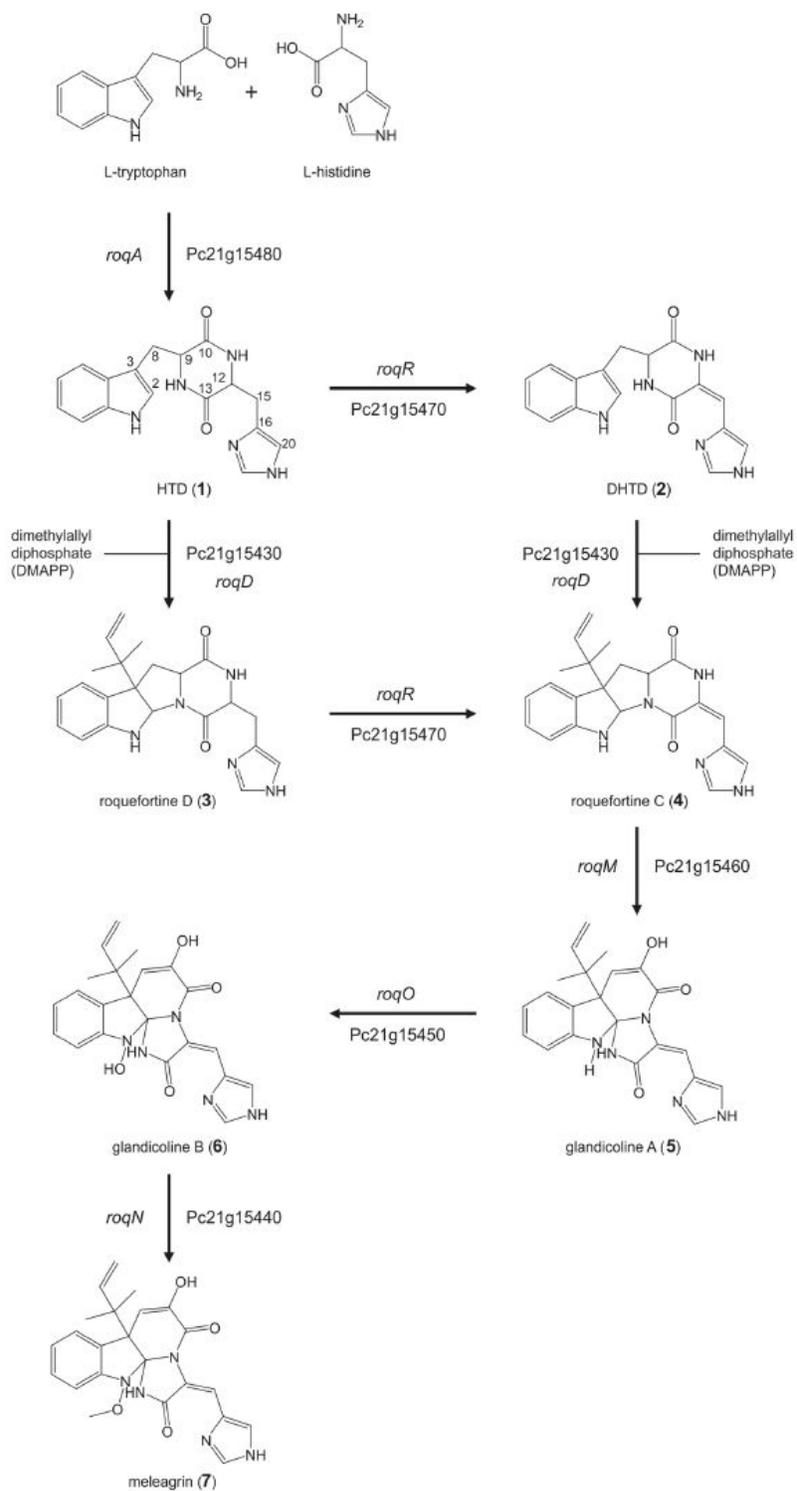


FIGURA 4.14: Rota biossintética proposta para a formação dos alcaloides dicitopiperazínicos.

Pelo fato de todos os metabólitos serem similares em sua estrutura e possuírem o mesmo perfil de fragmentação, sabe-se que o átomo de bromo está na mesma posição de acordo com os dados espectroscópicos obtidos da bromoroquefortina C (C11). Como citado acima, a condensação dos dois aminoácidos para a formação desta classe de alcaloides é interessante, pois utilizam os dois aminoácidos em sua forma livre fazendo com que o bromo esteja na mesma posição do anel indólico para todas as moléculas, uma vez que todos os metabólitos encontrados são precursores biossintéticos.

Embora os alcaloides halogenados formados sejam derivados das roquefortinas, o processo de halogenação ainda não foi relatado para estes alcaloides. Dessa forma, a investigação da halogenação no anel indólico foi um dos propósitos deste trabalho de doutorado. Como a posição do átomo de bromo é a mesma para todos os metabólitos e o triptofano é utilizado como aminoácido livre para a condensação com a histidina, sugere-se a hipótese de que a reação de halogenação ocorre no aminoácido em sua forma livre, antes da biossíntese dos alcaloides ser iniciada. Outra suposição seria da halogenação após a formação das roquefortinas, ou seja, a halogenação ser a última etapa da biossíntese das bromoroquefortinas.

Estas duas hipóteses foram testadas durante o trabalho de maneira a contribuir nos estudos da rota biossintética dos alcaloides bromados. Há na literatura diversos relatos de enzimas responsáveis por estes mecanismos de halogenação. De todos os tipos de enzimas relatados, as halogenases dependentes de FADH₂ foram as que, possivelmente, mais se aproximaram das reações observadas nos haloalcaloides devido à semelhança do substrato. Contudo, não há relatos na literatura da ocorrência destas enzimas em organismos eucarióticos.

Os primeiros estudos relacionados à halogenação das bromoroquefortinas têm como suposição que a primeira etapa biossintética dos alcaloides seria a halogenação do aminoácido triptofano. Desta forma, seria necessário obter um padrão de bromotriptofano para possíveis comparações com os produtos formados pelo fungo *Penicillium chrysogenum*.

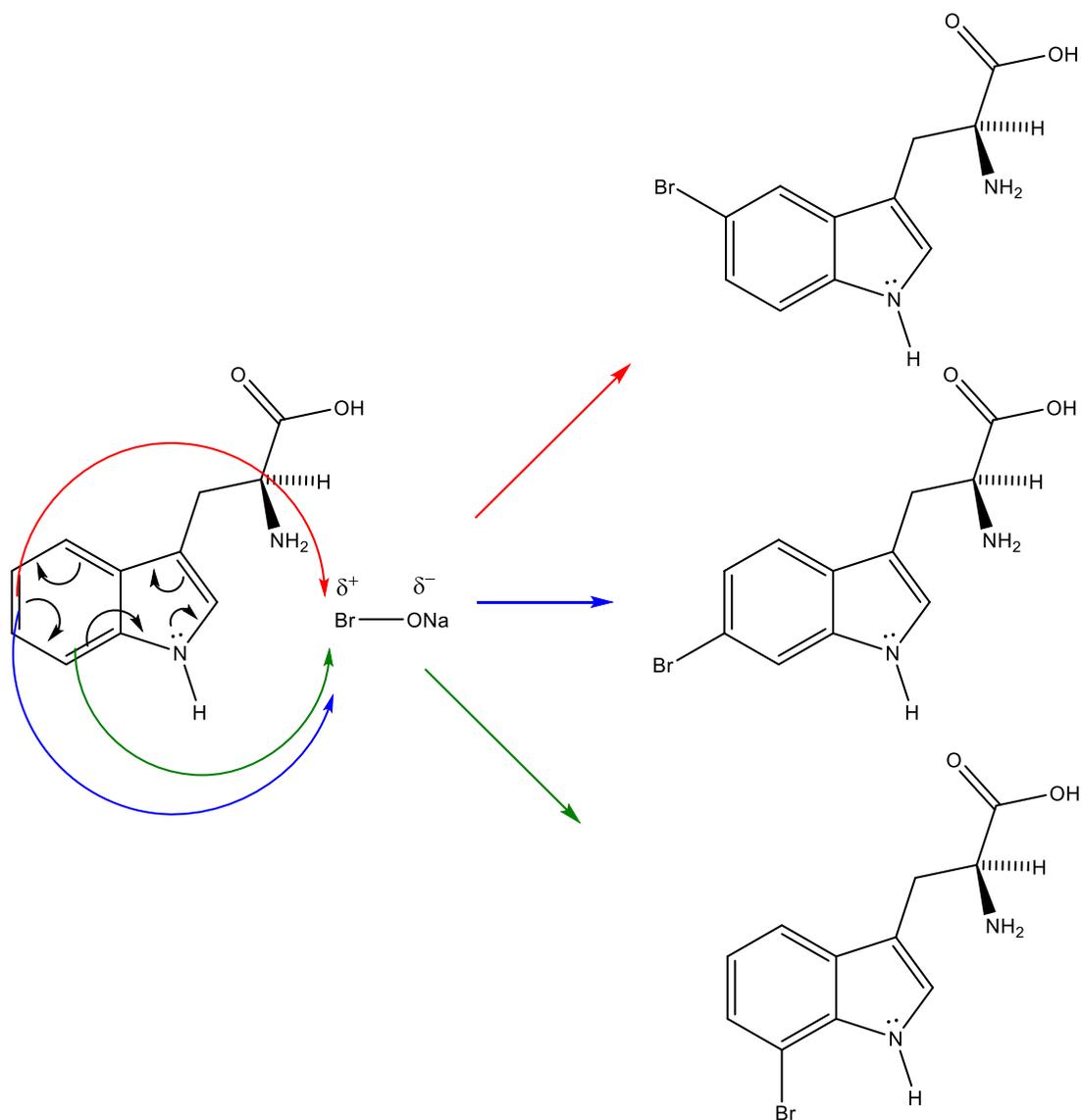
Para a reação do padrão, o método aplicado foi a reação do triptofano com o hipobromito de sódio (NaOBr), que seria o mesmo intermediário reativo das halogenases dependentes de FADH₂ (vanPEE, *et. al.*, 1996). Este método foi escolhido para verificar o comportamento *in vitro* da reação e compará-lo com o mecanismo *in vivo*. Desta forma, o objetivo desta síntese, além de fornecer o padrão de bromotriptofano, foi de verificar a regioseletividade da reação de halogenação.

4.6 Reação de halogenação do triptofano na presença de hipobromito de sódio (NaOBr)

A reação do triptofano com NaOBr ocorre por meio de uma substituição eletrofílica aromática, na qual um eletrófilo substitui um outro grupo, geralmente hidrogênio. A substituição eletrofílica é característica de compostos aromáticos e um importante meio de introdução de grupos funcionais em anéis aromáticos. O mecanismo desta reação ocorre em duas etapas principais: ataque a um eletrófilo levando a formação de um intermediário catiônico e a restauração da aromaticidade do anel pela perda de um próton.

Ao utilizar o NaOBr como eletrófilo na reação com o triptofano é possível prever a formação de isômeros do bromotriptofano, uma vez que a

estabilidade do intermediário catiônico levaria a uma delocalização da carga positiva ocasionando a formação dos isômeros de posição. O mecanismo da reação de triptofano com NaOBr é mostrado no Esquema 4.2.



ESQUEMA 4.2: Mecanismo proposto para a formação dos isômeros do bromotriptofano.

Os extratos obtidos da reação foram analisados por LC-MS/MS em busca dos possíveis derivados bromados do triptofano. Nos experimentos de *full scan* não foi possível verificar a presença do triptofano bromado (m/z 283). Assim, experimentos de íons fragmentos e SRM foram realizados possibilitando observar a formação de três bandas cromatográficas referentes a este íon. Para todos os experimentos de SRM utilizados neste trabalho, as transições escolhidas para o bromotriptofano foram: $283 > 196$ e $283 > 81$. A Figura 4.15 mostra os experimentos de íons fragmentos e SRM para m/z 283.

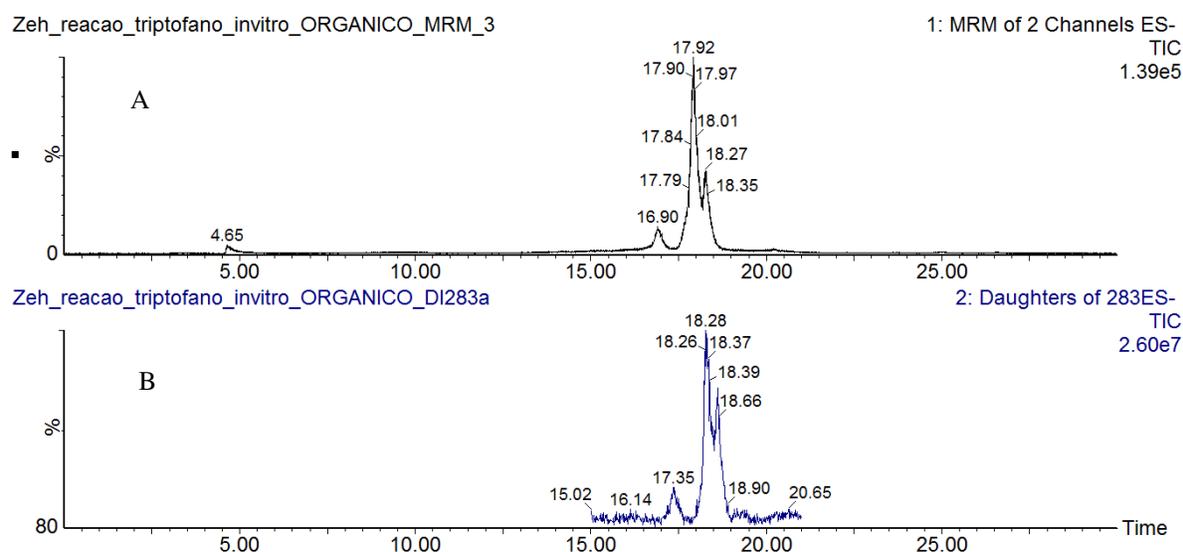


FIGURA 4.15: Detecção do bromotriptofano por experimentos de MS/MS (SRM (A) e íons fragmentos de m/z 283 (B)) após a reação do triptofano com NaOBr.

As bandas cromatográficas detectadas no experimento de íons fragmentos cujos tempos de retenção eram, respectivamente, 16,90; 17,92 e 18,66 minutos, apresentam o mesmo espectro de massa, indicando que estas se tratavam de isômeros estruturais que possivelmente diferenciavam-se pela posição do átomo de bromo no anel indólico. A Figura 4.16 mostra os espectros de massa para cada banda cromatográfica.

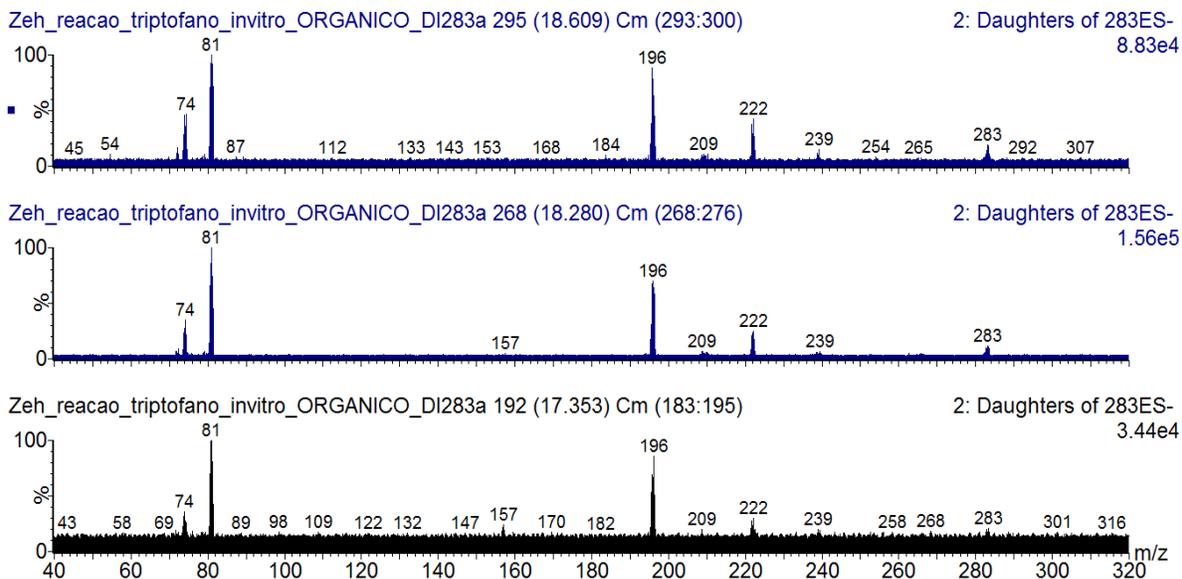
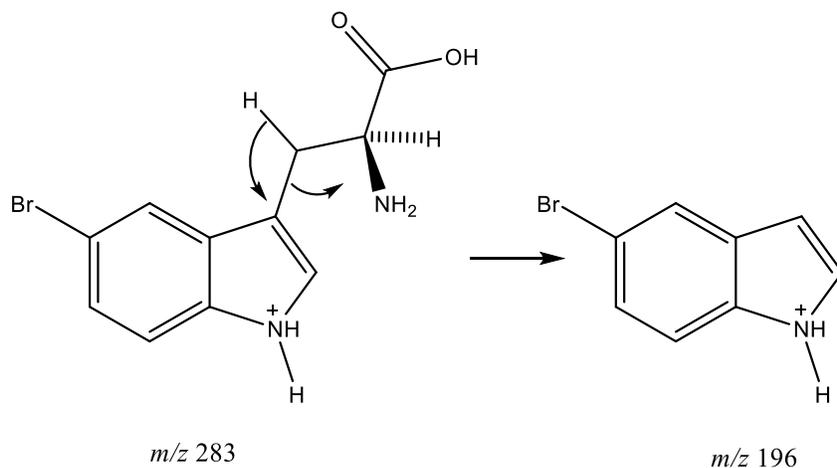


FIGURA 4.16: Espectros de MS/MS para cada banda cromatográfica detectada nas frações da reação do triptofano com NaOBr. (A) 18,61 minutos; (B) 18,28 minutos; (C) 17,35 minutos.

A partir da proposta de fragmentação do bromotriptofano é possível prever que para os três isômeros o átomo de bromo está presente no anel indólico, o que é condizente com o mecanismo de reação e para os diferentes tempos de retenção. A proposta de fragmentação é mostrada no Esquema 4.3.



ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para o bromotriptofano.

A formação do íon de m/z 196 a partir da fragmentação de m/z 283 se deve através de um rearranjo [1,3] de hidrogênio levando à formação do anel indólico protonado. Como o íon detectado refere-se à porção indólica protonada e apresenta as proporções isotópicas de átomos de bromo, confirma-se que o halogênio encontra-se ligado ao anel aromático em diferentes posições, levando a formação dos três isômeros que possuem tempos de retenção semelhantes e o mesmo espectro de íons filhos.

Para todos os experimentos de SRM utilizados neste trabalho, as transições escolhidas para o bromotriptofano foram: $283 > 196$ e $283 > 81$.

4.7 Formação do bromotriptofano *in vitro* com diferentes volumes de NaOBr

Os extratos obtidos das reações com diferentes volumes de NaOBr foram analisados por LC-MS/MS por meio de experimentos SRM e as transições utilizadas foram as mostradas no item 4.6. Os cromatogramas são mostrados na Figura 4.17.

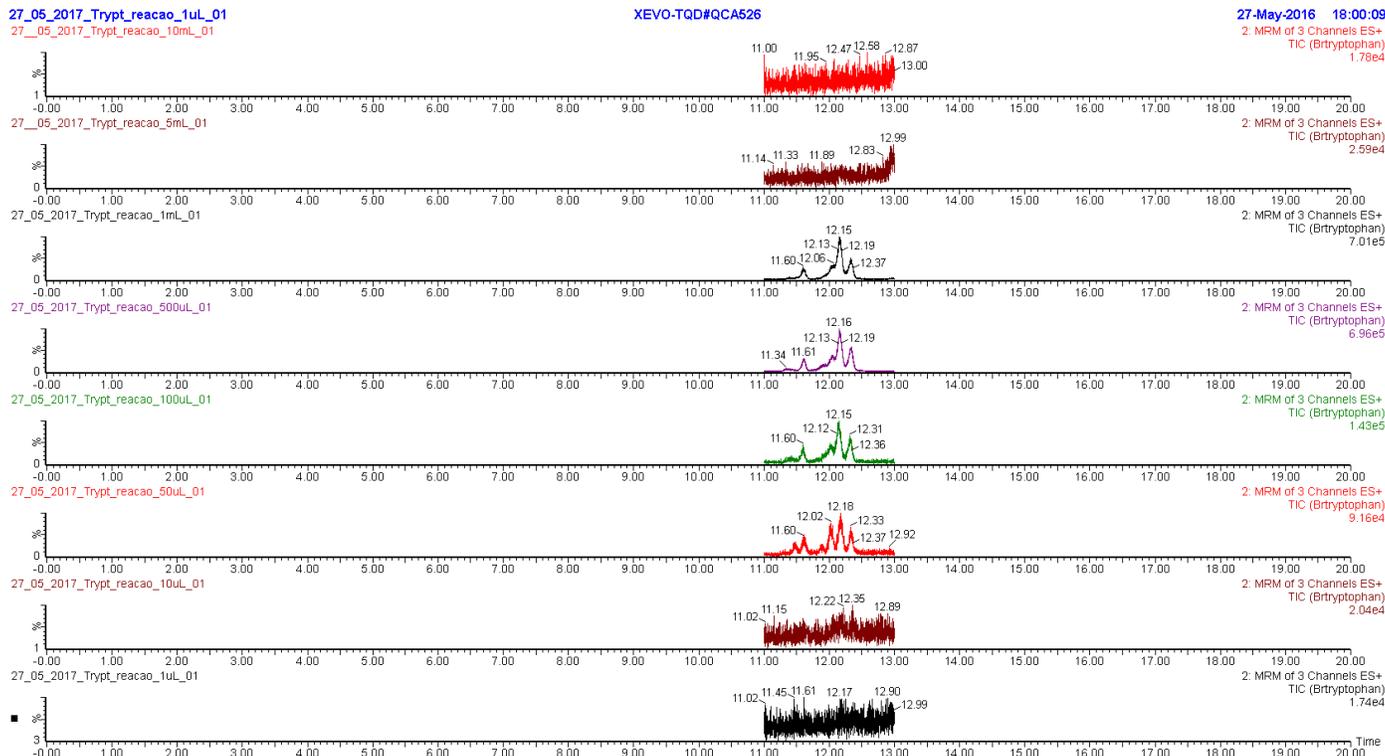


FIGURA 4.17: Cromatogramas obtidos das reações do triptofano com diferentes volumes de NaOBr.

Observa-se que a partir da reação do triptofano com 50 μL de NaOBr, houve a formação dos mesmos isômeros do bromotriptofano, também detectados na reação sem controle da quantidade de agente oxidante. Através destes experimentos, concluiu-se que independente do volume de agente oxidante adicionado, ocorre a formação dos mesmos produtos e portanto, não há regioseletividade nesta reação. O NaOBr é considerado um agente oxidante forte o que justifica a falta de regioseletividade na reação. Ao adicionar uma grande quantidade (como 5 e 10 mL) deste reagente, não há a formação dos compostos de interesse e há a completa degradação do triptofano, como é mostrado na Figura 4.17. Desta forma, a bromação no triptofano *in vitro* ocorre de forma descontrolada.

Ao verificar que em qualquer volume de NaOBr adicionado ao meio reacional ocorre a produção dos isômeros do bromotriptofano, a hipótese de que a bromação do triptofano realizada por *Penicillium chrysogenum* pode ocorrer na presença de um sistema enzimático que é capaz de produzir somente um isômero, ou seja, a regioseletividade observada nesta etapa ocorre devido à presença de enzimas atuantes na rota biossintética.

4.8 Adição de bromotriptofano ao meio de cultura durante o crescimento de *Penicillium chrysogenum*

A execução deste experimento teve por finalidade verificar a habilidade do fungo em utilizar o bromotriptofano obtido *in vitro* na produção de bromoroquefortina C, uma vez que não havia no meio de cultura nenhuma outra fonte de bromo. Dessa forma, se de fato houve a produção da bromoroquefortina C por vias enzimáticas, é esperado que o fungo consiga reconhecer o bromotriptofano como substrato da rota biossintética de produção do alcalóide halogenado.

Após a síntese do padrão de bromotriptofano, o extrato bruto reacional contendo os isômeros foi adicionado ao meio de cultura e após 15 dias de cultivo, os extratos fúngicos obtidos em todas as condições de crescimento foram analisados por LC-HRMS/MS. Os resultados obtidos mostraram que para os experimentos contendo meio Czapek com bromotriptofano e Czapek com uma mistura de aminoácidos presentes no extrato de levedura (com exceção do triptofano) e bromotriptofano não houve a formação da bromoroquefortina C. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram os

cromatogramas de *full scan* e de íons selecionados para estes dois experimentos. O metabólito esperado não foi detectado nos extratos provenientes do meio líquido e nos provenientes do micélio.

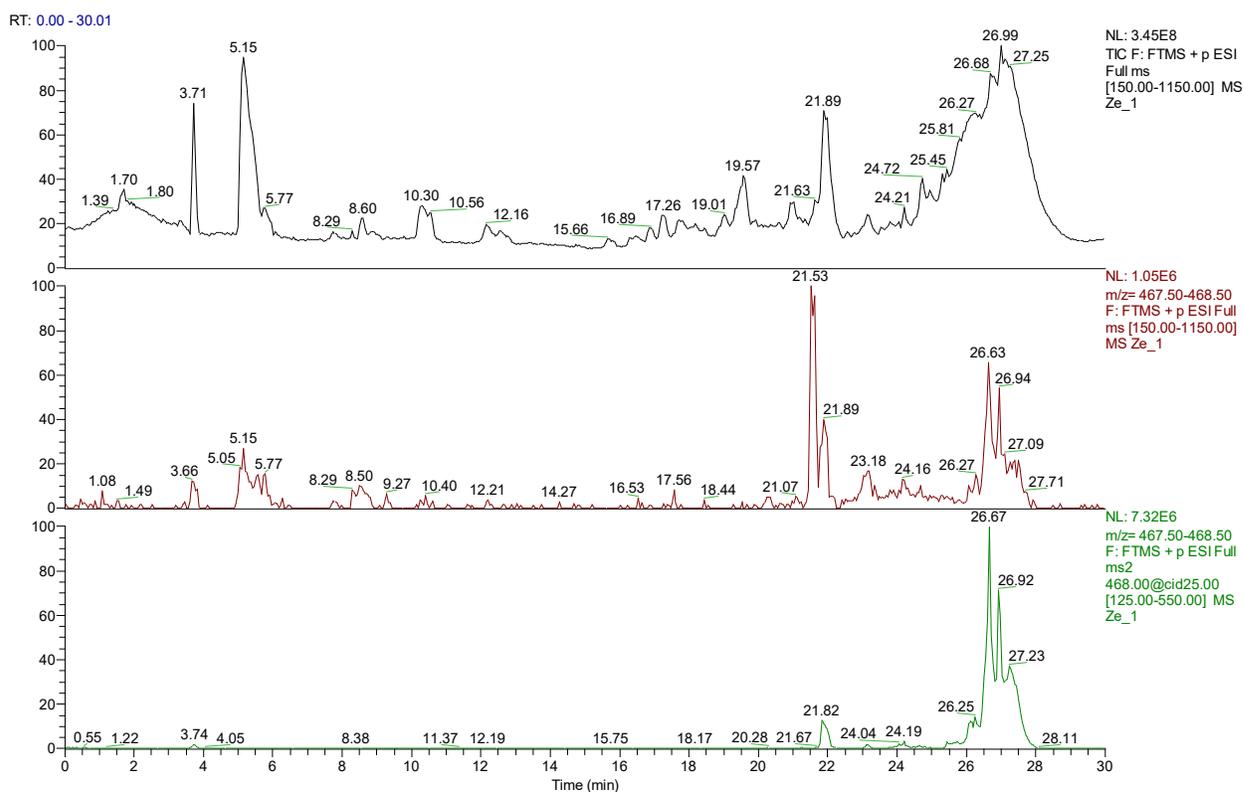


FIGURA 4.18: Cromatograma do experimento de crescimento de *P. chrysogenum* em meio Czapek com bromotriptofano. A: Cromatograma em modo *full scan*; B: Cromatograma de íons selecionados m/z 468, C: Cromatograma de íons fragmentos de m/z 468.

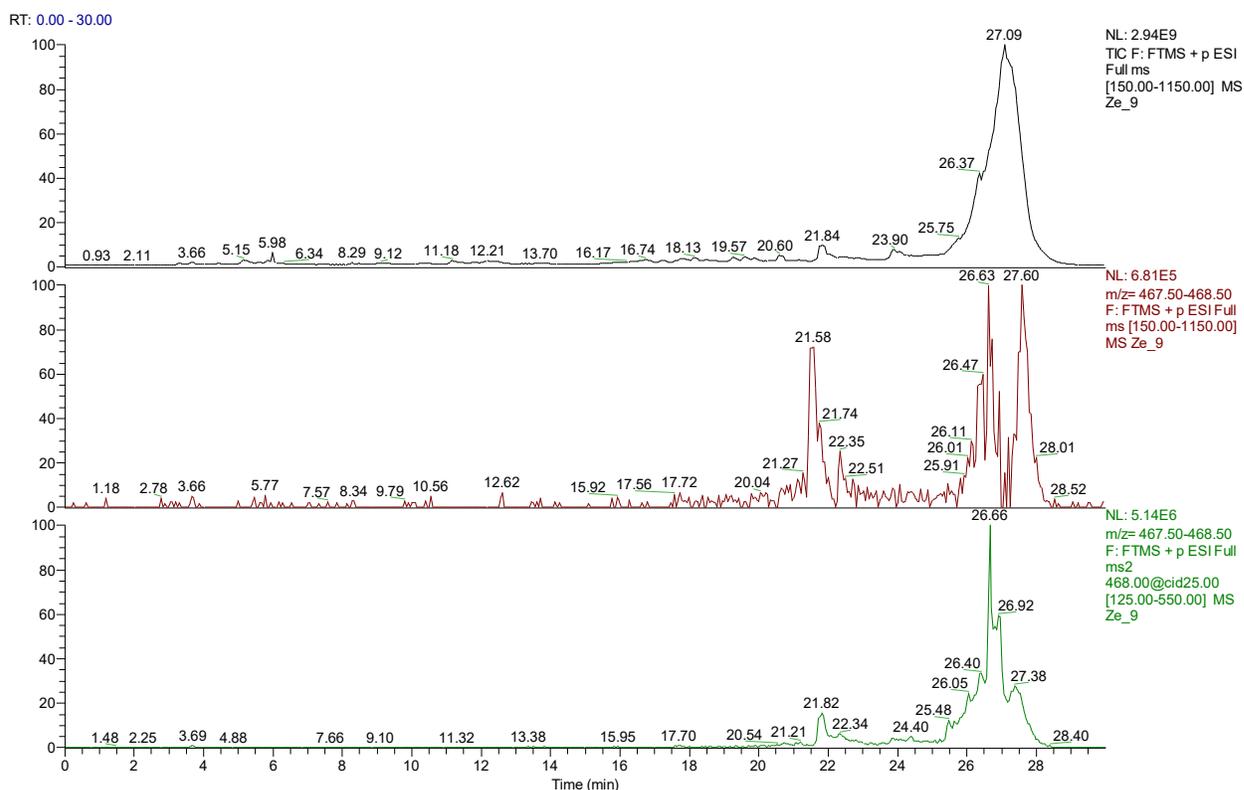


FIGURA 4.19: Cromatograma do experimento de crescimento de *P. chrysogenum* em meio Czapek's com mistura de aminoácidos e bromotriptofano. A: Cromatograma em modo *full scan*; B: Cromatograma de íons selecionados m/z 468, C: Cromatograma de íons fragmentos de m/z 468.

Nas análises do extrato do meio líquido obtido do experimento de crescimento do fungo em meio Czapek's contendo 2% de extrato de levedura e a mistura de bromotriptofano, foi observada uma banda em 23,90 minutos contendo o íon m/z 468,1022 e seu isótopo M+2 de m/z 470,1004 cujos dados são os mesmos já observados para a bromoroquefortina C, previamente detectada e isolada. Experimentos de íons fragmentos foram realizados para confirmar a produção do metabólito bromado. Por comparação do espectro de íons fragmentos para a substância detectada e aquela isolada previamente, observou-se que os mesmos fragmentos foram encontrados para o metabólito

presente na banda em 23,90 minutos. As figuras 4.20 e 4.21 mostram, respectivamente, as bandas cromatográficas, e o espectro de íons fragmentos da bromoroquefortina C.

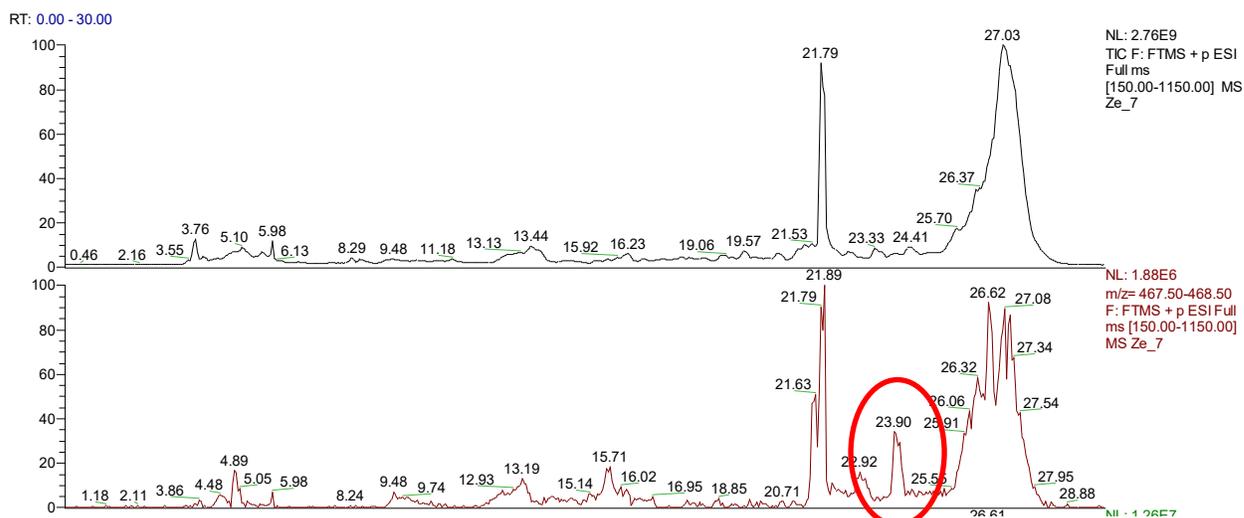


FIGURA 4.20: Cromatograma full scan e de íons selecionados do meio líquido para o experimento de crescimento de *P. chrysogenum* em meio Czapek's contendo 2% de extrato de levedura e bromotriptofano. A: Cromatograma em modo full scan; B: Cromatograma de íons selecionados m/z 468.

Ze 7 #926-939 RT: 23.83-24.14 AV: 7 NL: 1.00E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 468.00@cid25.00 [125.00-550.00]

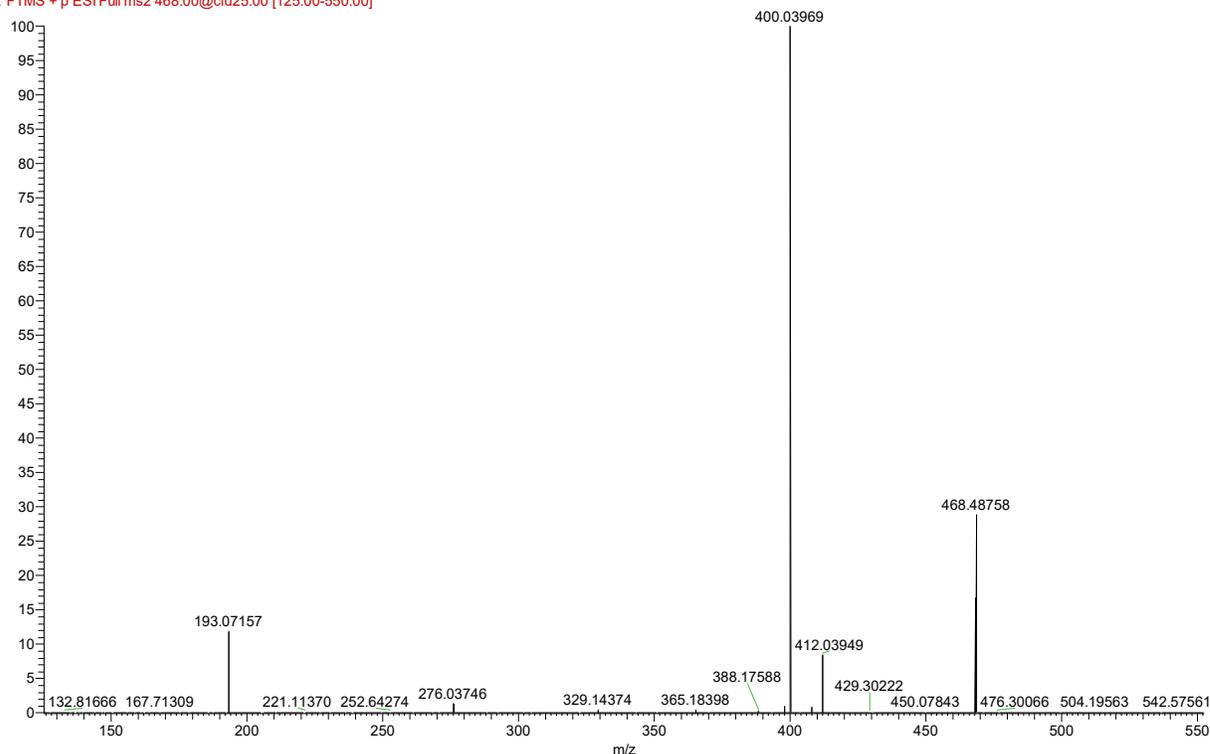


FIGURA 4.21: Espectro de íons fragmentos da bromoquerofortina C.

Com a adição dos isômeros de bromotriptofano, observou-se a formação de uma banda cromatográfica referente à bromoquerofortina C, não sendo evidenciada a presença de isômeros da bromoquerofortina C, uma vez que os isômeros do precursor halogenado levaria a formação dos isômeros do metabólito halogenado. Os experimentos de MS e MS/MS mostram que somente uma bromoquerofortina C foi produzida pelo fungo, porém ainda não se sabe qual o motivo deste fato ter ocorrido, uma vez que somente a halogenação do triptofano parece ser regioesletiva e a condensação entre o triptofano e a histidina não seria interrompida pela presença dos outros isômeros do aminoácido halogenado. Esperava-se que outros isômeros da bromoquerofortina C fossem formados, entretanto nenhum deles foi detectado.

4.9 Semi-síntese da bromoroquefortina C com NaOBr

O extrato reacional foi obtido de acordo com o item 3.11.9 e analisado por LC-HRMS/MS e o cromatograma *full scan* e de íons selecionados é mostrado na Figura 4.22.

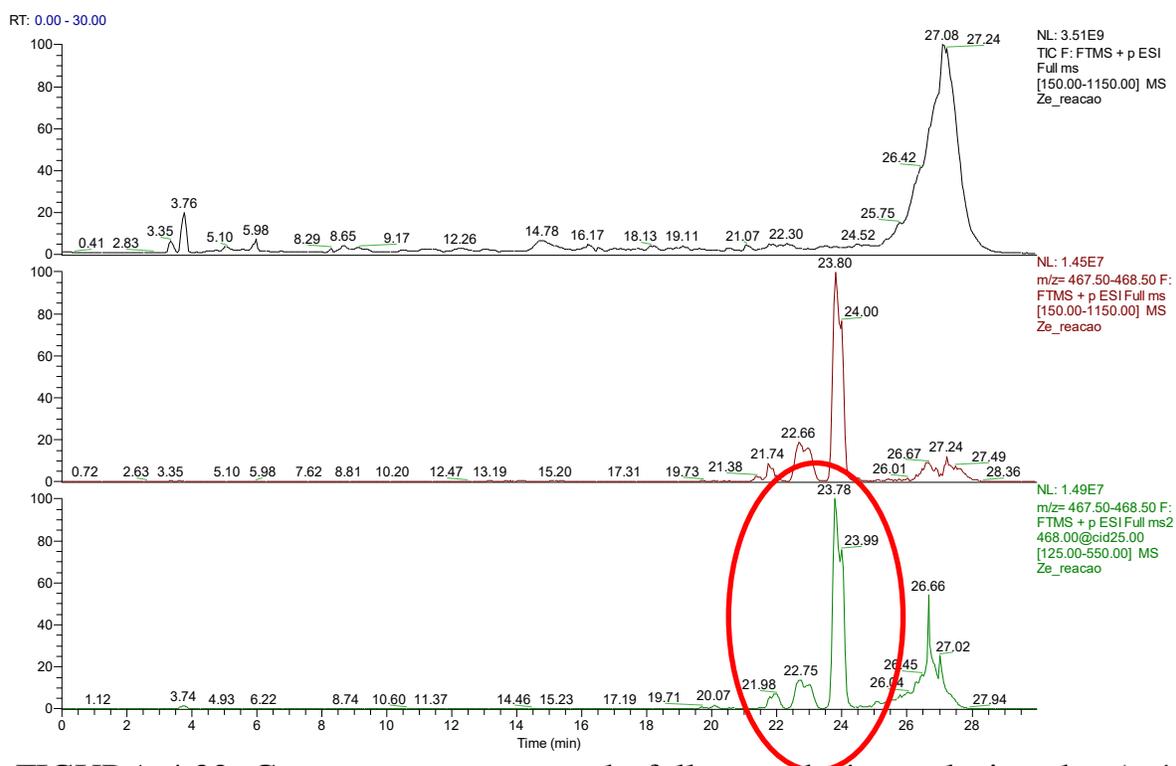


FIGURA 4.22: Cromatogramas no modo full scan, de íons selecionados (m/z 468) e íons fragmentos de m/z 468 para os produtos de reação da roquefortina C com NaOBr. A: Cromatograma em modo full scan; B: Cromatograma de íons selecionados m/z 468, C: Cromatograma de íons fragmentos de m/z 468.

De acordo com o cromatograma mostrado na Figura 4.22, a reação da mistura contendo a roquefortina C com NaOBr levou à produção da bromoroquefortina C e alguns isômeros de mesma massa que puderam ser verificados por experimentos de íons fragmentos. Os espectros de massa para

os três isômeros (21,98; 22,75 e 23,78 minutos) é o mesmo, ou seja, a reação ocorre por meio da substituição eletrofílica aromática no anel indólico do triptofano.

Ao reagir triptofano e roquefortina C com NaOBr não há regioespecificidade reacional, diferentemente do que foi observado e na produção de bromoroquefortina C por *P. chrysogenum*. Desta forma, acredita-se que há de alguma forma uma regioesletividade que pode ser comandada pela presença de um sistema enzimático no processo de halogenação da roquefortina C, como foi discutido anteriormente.

A presença de uma enzima responsável pela halogenação seria capaz de fornecer essa seletividade enquanto que durante a reação dos substratos com NaOBr não seria possível obtê-las levando a formação dos isômeros de posição da bromoroquefortina C e do bromotriptofano.

4.10 Investigações iniciais do sistema enzimático responsável pelas reações de halogenação em *Penicillium chrysogenum*

Para verificar a hipótese da presença de um sistema enzimático responsável pela regioesletividade da halogenação nos alcaloides dicetopiperazínicos e se a primeira etapa da biossíntese da bromoroquefortina C seria a halogenação do aminoácido triptofano, alguns experimentos foram realizados para esta verificação.

Relatos na literatura mostram que a halogenase dependente de FADH₂ são estáveis em tampão fosfato de potássio e que as reações ocorrem por 6 horas a 30°C (ZHU, *et. al.*, 2009). Após a obtenção dos extratos

enzimáticos, observou-se que em todas as condições testadas o bromotriptofano não foi detectado por experimentos de íons fragmentos e SRM, no qual são mostrados na Figura 4.23.

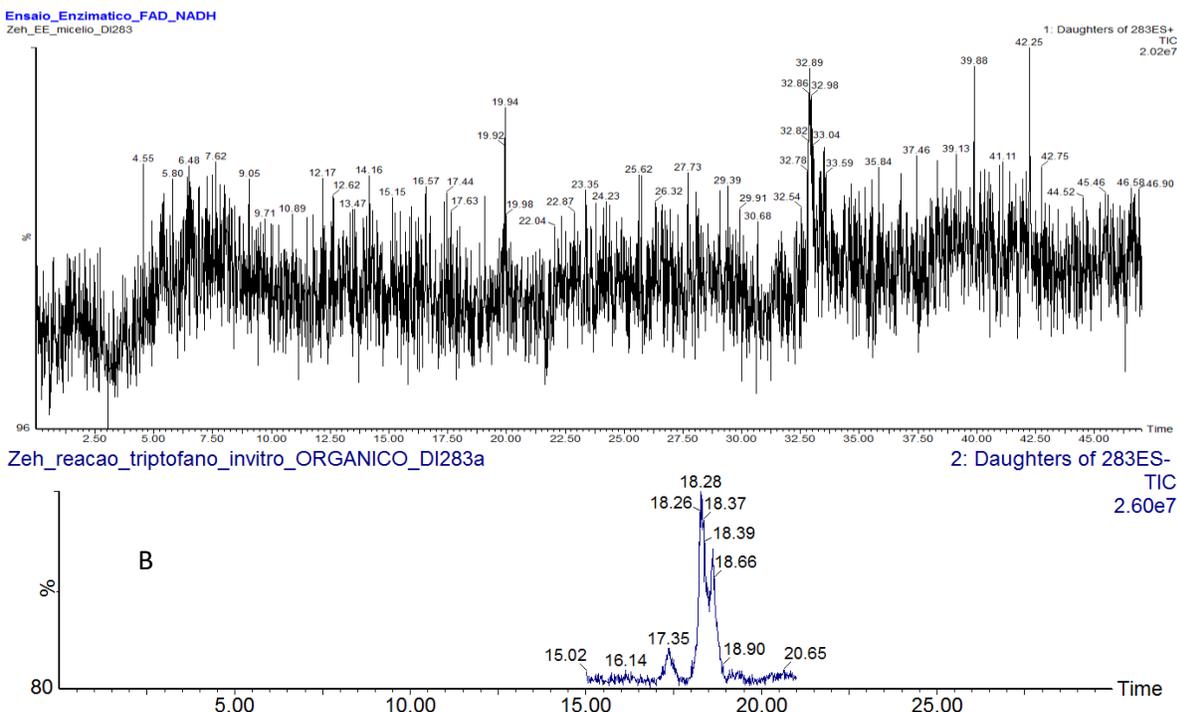


FIGURA 4.23: Cromatogramas provenientes dos ensaios enzimáticos para detecção de uma possível halogenase presente em *Penicillium chrysogenum*.

4.11 Biotransformação de substratos aromáticos na presença de NH_4Br no meio de cultura

As halogenases dependentes de FADH_2 relacionadas necessitam de centros ricos em elétrons como substrato. Dessa forma, a reação de halogenação ocorre, na maioria das vezes, em metabólitos secundários contendo anéis aromáticos.

Como a halogenação dos substratos aromáticos é a primeira etapa da biossíntese dos metabólitos, fez-se necessário um experimento no qual o

objetivo foi observar o comportamento de alguns substratos aromáticos durante o crescimento de *P. chrysogenum* e *Talaromyces wortmannii* na presença de íons brometo.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram analisados por LC-MS na busca de possíveis reações de halogenação e os cromatogramas obtidos dos extratos de *Talaromyces wortmannii* são mostrados na Figura 4.24.

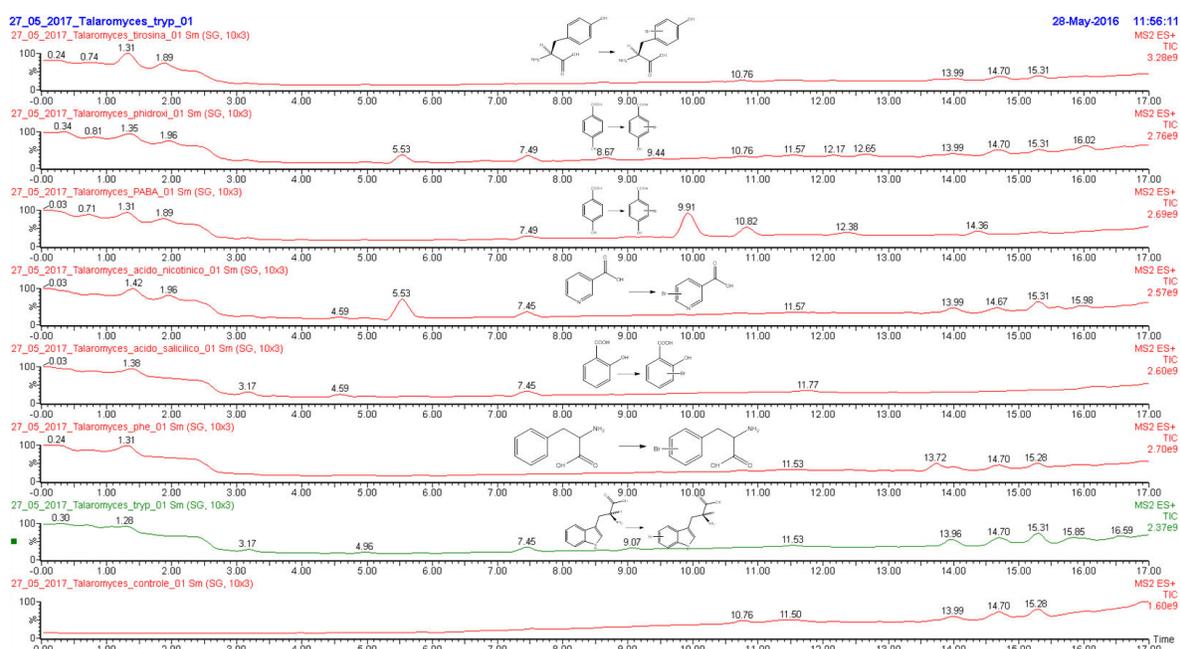


FIGURA 4.24: Cromatogramas dos extratos do crescimento de *T. wortmannii* na presença de substratos aromáticos.

Após as análises dos dados obtidos observou-se que os substratos não foram consumidos durante o crescimento dos microrganismos, não gerando os íons esperados para cada substrato. As condições utilizadas para a verificação da halogenação podem não ter sido adequadas, uma vez que nenhum produto de biotransformação foi observado.

Dessa forma, não se pode concluir se a seletividade enzimática deve ser restrita somente ao triptofano e não a outros substratos aromáticos, como é observado para organismos eucariotos.

4.12 Detecção da halogenase de *Penicillium chrysogenum*

A atividade de halogenases dependentes de FADH₂ nativas não foi reportada, até o momento, para nenhum organismo produtor destas enzimas. Isso se deve à atividade da mesma que é relatada como pouco expressiva nos organismos. Desta forma é necessária a utilização de ferramentas moleculares para a detecção das enzimas. A clonagem e expressão heteróloga das proteínas para posterior detecção da enzima são as etapas fundamentais para a verificação da existência de uma enzima em organismos vivos.

Para detectar a presença de uma halogenase em *Penicillium chrysogenum*, uma parte do trabalho foi realizada na Universidade Técnica de Dresden – Alemanha sob a orientação do Prof. Dr. Karl-Heinz vanPée, especialista em estudo de halogenases de microrganismos. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a possível detecção e expressão da halogenase presente em *Penicillium chrysogenum*.

Inicialmente, o protocolo testado para a extração de DNA genômico foi eficiente, pois de acordo com a Figura 4.25 podemos ver uma boa quantidade de DNA isolado. A concentração aproximada para cada fração é de aproximadamente 20 ng/5µL.

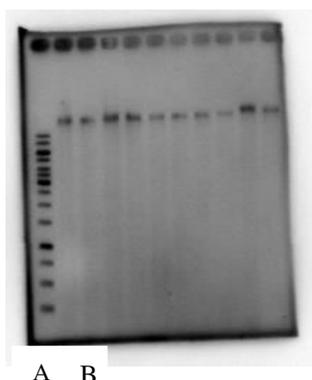


FIGURA 4.25: Gel de agarose revelado com brometo de etídio com as frações contendo DNA genômico de *Penicillium chrysogenum*. (A) Marcador 1kb; (B) frações de gDNA.

Há na literatura relatos de metabólitos secundários halogenados, cujos átomos de halogênios se encontram na porção indólica das moléculas. Por meio de comparação entre a sequência de aminoácidos dessas halogenases produzidas por organismos procariotos, quatro regiões foram consideradas conservadas e utilizadas para o desenho dos primers para reações de PCR. As enzimas utilizadas como modelos e as regiões conservadas são mostradas na Figura 4.26.

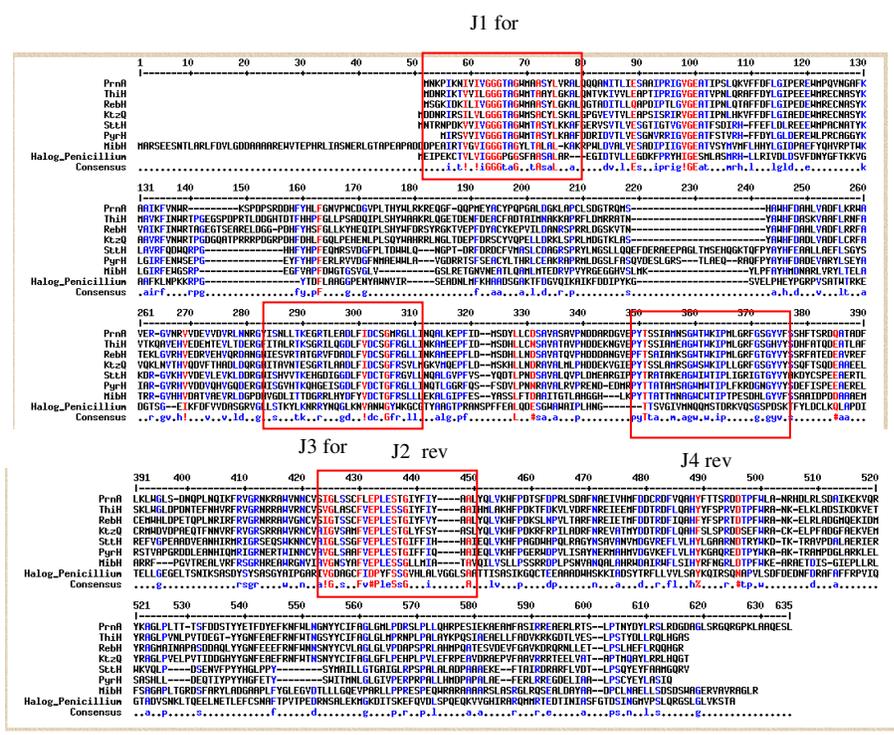


FIGURA 4.26: Comparação das seqüências de halogenases relacionadas na literatura e utilizadas para desenho dos primers.

As combinações dos primers utilizadas para as reações e o tamanho dos fragmentos esperados foram:

$$A = J1_for + J4_rev - 900 \text{ bp}$$

$$B = J2_rev + J3_for - 450 \text{ bp}$$

$$C = J1_for + J2_rev - 1170 \text{ bp}$$

$$D = J3_for + J4_rev - 180 \text{ bp}$$

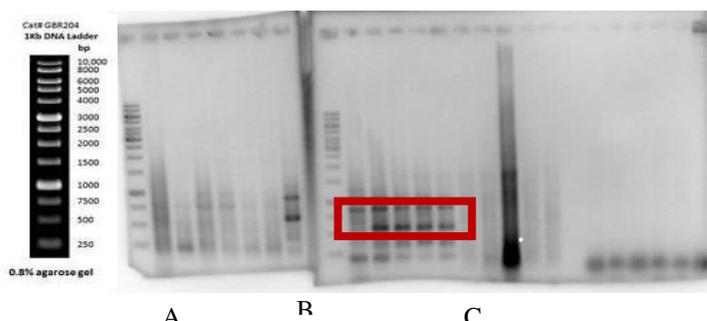
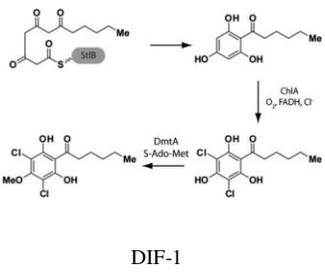
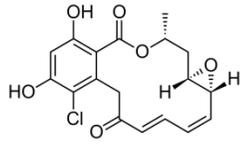


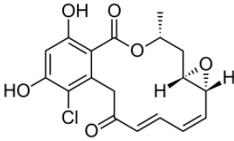
FIGURA 4.27: Gel de agarose 1% dos produtos da PCR com as diferentes combinações de primers.

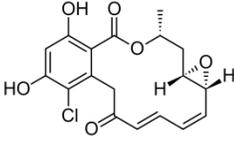
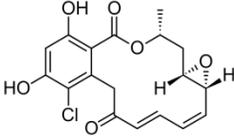
Na combinação dos primers J2_rev com J3_for verificou-se o aparecimento de duas bandas de tamanho esperado pela reação. Estas bandas foram isoladas e sequenciadas e os resultados foram comparados com sequências já depositadas no banco de dados *NCBI* por meio da ferramenta *BLAST*, que procura por regiões similares na sequência obtida, porém o resultado do sequenciamento foi negativo para alguma enzima similar a uma halogenase relatada na literatura.

Como a utilização de sequências de halogenases oriundas de organismos procariotos não foi eficiente decidiu-se então procurar na literatura as enzimas responsáveis por mecanismos de halogenação em organismos eucariotos. A Tabela 4.2 mostra os organismos eucariotos (fungos) produtores, os metabólitos halogenados, a sequência relatada na literatura e a referência.

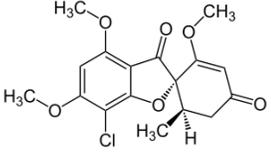
TABELA 4.2: Referências de fungos produtores de metabólitos halogenados e suas sequências de aminoácidos para criação de novos primers degenerados.

Nome	Substrato	Organismo	Metabólito	Sequência de aminoácido	Referência
ChIA	Phenyl (2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-hexan-1-one	<i>Dictyostelium discoideum</i>	 <p>DIF-1</p>	<p>MDTNIINHYDIIIIGGGIAGL SATRHLLLKMPELSGRIAVI EPRSERRDNLDEDYKVGES TVEVSAMFFAKELELQDYL IENHPPKFSLQFHWPRELSK TDTIEDYYSTWAVKNPDIQ AFQLNRCKIERDLLKMVIA QGAVYYHGRVRNVDNLD NDDMKSIDVEILSEVESGA DFKLQQSIERITLTTDYIVD ASGRNFTVGSRTDNILKDP KHLFGLDNASTWVRVKNT ERSLDFDKSQDVTCSWTYD TNHFFGPGYWIWMIPLERG SRDYSIGVSYHRDKIQPSQL NSLDKFMSFLEKNQKLLYN LIKSGEIVDFHRWPKLAHTS KTFFSKNNWCVIGDAAAIF DPFYSTGMVMIAMEIECLT EMLKFKLSNAANDYHRRV EAFDKLIRCVTQINNHLIKD HSNHLGNASIMSWRIYFES STYFSILLPAYIGKYHLCPIF SDHFTTDHENGLALRNQLL ATLDYANENSINIGFMDNH RGGQLLGDWSPTSSWDYD HALSLAKYGHKRLNLPKCL SWSNFYLSLIICKLYYRVY GIGALWNSSFFKLSNNTTY RFSKFYFLSKLHSFNMIGTP NNDYYDKIQKDFKSYNYN QNNIVDWKY</p>	Neumann, Walsh, Kay 2010
RadH	Phenyl (PKS)	<i>Chaetomium chiversii</i>	 <p>Radicol</p>	<p>MSIPKSCEVLVAGGGPAGS YAASALAREGVDVVLEA DKHPRYHIGESMLPSIRPLL RFIDLEETFEKHGFQKCLG AAFKLTAKREGYDFVAA HGPNGYSWNVVRSEDEL</p>	Wang et al. 2008

				<p>LFKHAAKSGALTFQGKVV DSLEFEPYDSDFPSGGKVA NPGRPVAARWSAKDGRSG TISFQYLVDATGRAGITSTK YLKNRKFNEGLKNLAIWG YYKGARPWAEGTPRENQP YFEGMRDGAGWCWTIPLH NGTVSVGAVLRSDLFFAKK KSLGEDVTNAMIMAECKM LCPTIKELLEPAELVSDIKQ ATDYSYSASAYAGPYFRIV GDAGCFIDPFSSGHHLAM AGALAAAVSIRASMKGDC SEYEASNWHARKVDEGYT LFLLVVMAALKQIRMQEPP VLSIDDDGFDRAFQFLKP VIQSGSAEIVKRFTKKEVS EAIDFAVLALDNMAGAGE HANETNGSNGTGETGDAK TLENITVEDEKVLGIRILA KVAPSADMKDLEGT AIDGF MPRLEHGHLGLNRV</p>	
RadH`	Phenyl (PKS)	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	 <p>Radicicol</p>	<p>MEIPHKATVLVIGGGPGGS YTASALAREGIDIVLLEAD VFPRYHIGESLVASMRPFLR FIDLDETFVNYGFVRKNGA AFKLNQKEAYTDFILQPG ADTFAWNVVRSECDLDMF KHASNSGARAFDGVKVTAI EFDPLDESAIDDPGRPVSA SWKAKDGRGTGSISFDYLVD ASGRAGIASTKYLKSRTYN SYLKNVASWGYWRGATPY GVGTSVEGQPYFEALQDGS GWVWFIPLHNGTTSVGVV MNQELATQKKKSSTVTSSR AFYLESVEGARVISQLLQP ANLDGEIKQASDWSYNASS YGSPYL RIVGDAGAFIDPYF SSGVHLAVSGGLSAAVSIA ASIRGDCPEHTAWQWHSQ GVANRYGRFLLVVLGATK QIRARDSPVLNSEGQDGF DAFAVIRPVIQGTADVQGK VSAREVLDAVTFSTNAVRP SAGGQNVVLEESSRSLRSQ VEQEMGDVANSLAKAYKD</p>	

				TDVYEGLMARLERGSLGL KAVGVMG	
RadH ¹	Phenyl (PKS)	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>RIB40</i>	 <p>Radicicol</p>	MSIPEQCTVLVVGPPAGS YAAAALAREGIDTVLLEAD VHPRYHIGESMLPSMRHLL RFIDCEDTFLQHGFTKKVG GAFTLNQTNCEGYTDFIAA GGPNHFSWNVIRSEADELL FRHTAHSGAKTFEAVKVNS VTFTPSPLDTGGRPVASAS YTQKSDGATGVVGFKYIID ASGRAGLLNTKYLKNRKY NQGPKNVAVWAYWKATG KYGEGTPRENSPYFEALTD ESGWAWFIPLHDGTHSVG VVMDQGMMSQKKAVSEL STNARYLSWLKLAPRLNG YLTGGKMVADLKTASDFS YDSSSYAFPYARVAGDAG CFIDPFSSGVHLAITGGLS AATTICAAIRGDCDEVAAA RWHSTKVKEGYSHWLIV LSAYKQMSNQAEPVLSDV GEDNFDRAFNFVKPIIQGTS DVSTKLTQAEFSHTLNFVL KAFDRKIGGDLTSEEEKIY EDIRKTQSQNMSNIESFTM DIIDGRLPRLRGKLGLESV AGMDEDTKHCPTATQQH	
Rdc2	Phenyl (PKS)	<i>Metacoryceps</i> <i>chlamydosporia</i> (fungi)	 <p>Radicicol</p>	MSVPKSCTILVAGGGPAGS YAAAALAREGNDVVLEEA DQHPRYHIGESMLPSLRPLL RFIDLEDKFDAGHFQKKLG AAFKLTSKREGYTDFIAAH GPRGYSWNVVRSEDEILF NHARESGAQAFQGIKINAIE FEPYEEEPNGEKVANPGK PTSAKWSSKDGSSGDIAFK YLVDATGRIGIMSTKYLKN RHYNEGLKNLAIWGYYKN NIPWAQGTPRENQPFEGM RDGAGWCWTIPLHNGTVS VGAVMRKDLFFEKKKSLG ENATNTQIMAECMKLCPTI GELLAPAEVSDIKQATDY SYSATAYAGPNFRIVGDAG	

				CFIDPFFSSGHHLAVAGAL AAAVSINASIKGDCTEYEA SRWHAKKVDEGYTLFLLV VMAALKQIRMQENPVLSD VDEDGFDRAFQFLRPVIQG SGSSEAVKKFTKEDVAQTI DFAVHALNNMAELDMDIP EHMINGDKEGENGV TNGN NGAAKTAGLASNMEKLTN DEEKVLNGLRILGKAAPGG TLADFEGTAIDGLMPRLEH GKLG LNKV	
XP_0021 51004*	???	<i>Penicillium marseffi</i> ATCC 18224	???	MAIPEKTTVLVIGGGPAGS YCASALAREGIETVLEAE KFPRYHVGESMLPSLRHYL RFIEADKKLDAHGFIRKNG ALFKLNSKPAAYTDFVGAG GPNGFNIRSQADDLLFR HAGTSGAKIFDGVKVN SIE FVPSGLPRSDDPCEIPDPG RPVSASWVNKDTGDAGSIK FDYLV D ASGRQGLVSTKY WKNRKMNTGAQLQSVAT WGYWTGGGIVEKGT SREG CPYFEAIADASGWTWYIPL HNGQWSVGVMNQVLA DKKRAAGDGKNVYLQ TIR ETPGLQALLENGELVTELR SASDWSYNATAYSSPYLRV AGDAGCFIDPFFSSGVHLA LTGGFSAATTICASIKGQTS EIGAAIWHTKKVS ESYTRFLVIVSTALKQINEK DEPVISDFDEKTFERAFKHF RPIIQTVDVQGKLSQAEV SQALNFCFRAFHQVDSKEK QNLIEKMRS LAISDPDDL SN EKYSAALKELEAVLTPDQL HILQTIRARQMLRPEDMFT VETIGSDVIDGLSVNMVTG QLGLVHPGKAFKVAPSNK DILALLNGEELSESSIGFKT DPGYQNPTAAAH	Fedorova et al. 2007

GsfI	Phenyl	<i>Penicillium aethiopicum</i>	 <p style="text-align: center;">Griseofulvin</p>	MAIPQSCTVLVAGGGPGGS YTAALAREGVDDVLLLEA DCHPRYHIGESLLPSMRYL LRFIDLEDTFEQHGFQKKL GAFFKLNKASAGYDFIRA NGPNGYSWNVVRSEDEIL FRHATKSGAKTFENVSLKS VNFEPYENDKFTSQDKLTN PGRPVSAEWTKDGCSTI SFDYLV DATGRVGILSTKY LKNRKFNESFRNIAMWGYF KGNIPSPGTDRENQPISEG MRDGGGWVWMLPLHNGT VSI GAVVRKDIFQAKKKAL PEGTTEAQT LASL VALCPTI SSYLEPAELASGIRQAADYS YSANAYAGPNFRIVGDAGC FIDPFSSGHHLLSSALAA ATSINACIRGDCNEFDASR WFAKKVDEGYTLFLVVVM AALKQIRMQEQPILSDLDE EGFDRAFTILRPVIQGAADK ETAPKAKGESITETIDLCLT ALNDLHDTTELQRKLT SIVE AKGTPEQEQLLGKLSPEDET AALHRMRAMHSILPMGEL EDFENSNIDGFKARLEKGS LGLRRERALCRDHAGDLQ M	Chooi et al. 2010
------	--------	--------------------------------	---	---	----------------------

*Observação: Para os organismos sem estrutura e sem substrato, a sequência foi retirada do sequenciamento total do genoma do organismo. O metabólito até o momento não foi isolado e sua estrutura determinada.

A partir dos dados encontrados, as sequências de aminoácidos referentes às halogenases fúngicas foram alinhadas e comparadas pela ferramenta BLAST e o resultado é mostrado na Figura 4.28 .

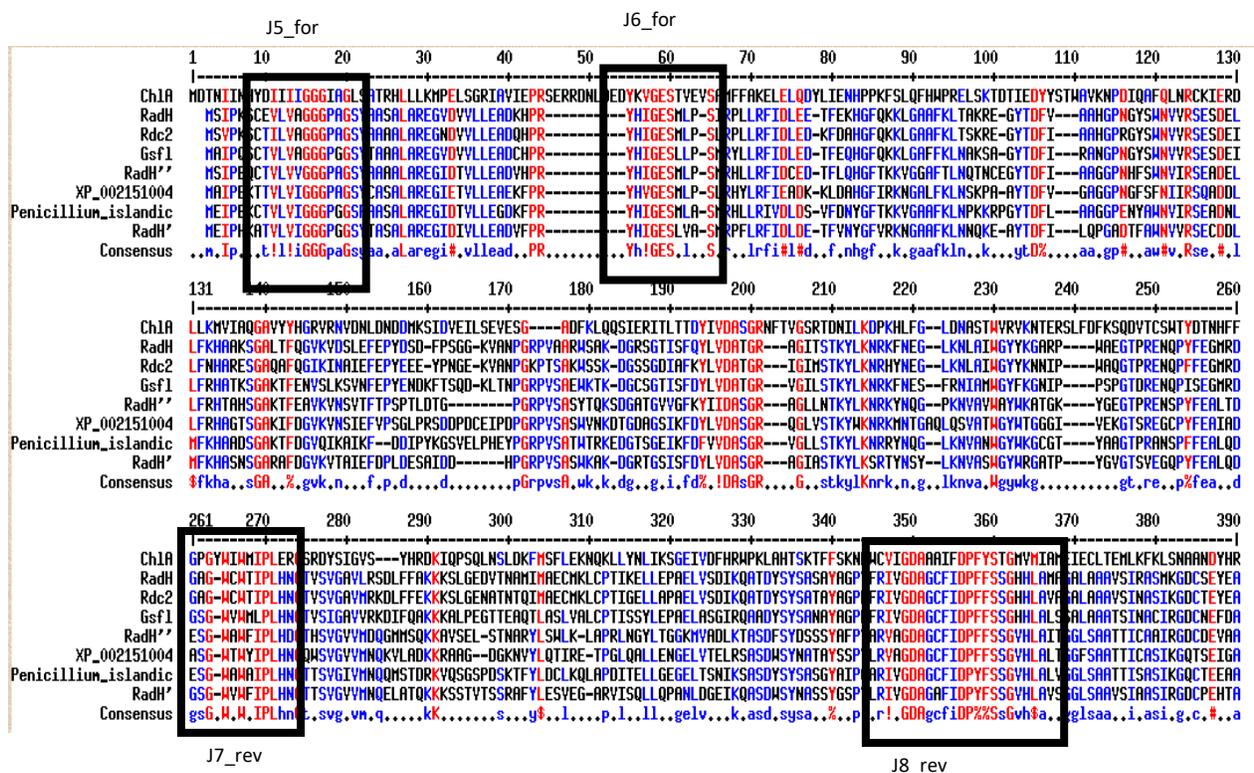


FIGURA 4.28: Alinhamento das sequências de aminoácidos das halogenases produzidas por fungos.

O mesmo procedimento mostrado acima e a combinação dos primers utilizados para a PCR são mostrados abaixo.

$$A = J5_for + J7_rev - 800 \text{ bp}$$

$$B = J6_rev + J8_for - 600 \text{ bp}$$

$$C = J5_for + J8_rev - 1100 \text{ bp}$$

$$D = J6_for + J7_rev - 700 \text{ bp}$$

Depois de 35 ciclos, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel 1% de agarose e o resultado é mostrado na Figura 4.29.

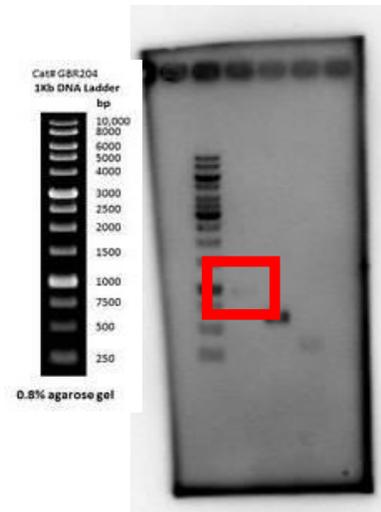


FIGURA 4.29: Gel de agarose dos produtos de PCR utilizando os primers desenhados a partir de sequências de halogenases de fungos.

Para as combinações A, B e C foram observadas bandas no gel após a eletroforese e estas foram isoladas e enviadas para sequenciamento. Das três bandas sequenciadas, a banda proveniente da combinação dos primers J5 e J7 apresentou o resultado mais promissor que é mostrado na Figura 4.30. Este fragmento foi chamado de PEA_1.



Figura 4.30: Sequenciamento do produto de PCR entre os primers J5 e J7.

A sequência de 931 nucleotídeos com GC content de 48% obtida foi traduzida em uma sequência de aminoácidos e é mostrada na Figura 4.31.

```
VHAGFILPGTRPLHGSRGIDTVLLEGDKFPRYHIGESMLASMRHLLRIVDLDSVFDNYGFT
KKVGA AFKLNPKKRPGYTDFLAAGGPENYAWN VIRSEADNLMFKHAADSGAKTFDGVQI
KAIKFDDIPYKGSVELPHEYPGRPVSATWTRKEDGTSGEIKFDF VDASGR /GLLSTKYLK
NRRYNQGLKNVANWGYWKGCGTYAAGTPRANSPFFEALQDESGWAWAIPLHNGTTSVG
IVMNQQMSTDRKVQSGSPDSKTFYLDCLKQLAPDITELLGEGELTSNIKSASDYSYSASGY
AIPGARIVGDAGCFIDPFFLIWEP
931 bp   GC content = 48%
```

FIGURA 4.31: Sequência de aminoácidos traduzida dos nucleotídeos obtidos do produto de PCR (PEA_1).

A sequência obtida contém 931 pares de base que foram traduzidos em 324 aminoácidos. O fragmento obtido no produto de PCR não é o gene inteiro correspondente a uma halogenase, uma vez que as halogenases

de fungos possuem, aproximadamente, 1500 pares de base e 500 aminoácidos. Para organismos procaríotos, as halogenases possuem, aproximadamente, 1800 pares de base e 600 aminoácidos.

A sequência de aminoácidos traduzida foi alinhada e comparada pela ferramenta BLAST com outras possíveis sequências de halogenases expressas por outros microrganismos. O resultado da comparação dos alinhamentos é mostrada na Figura 4.32.

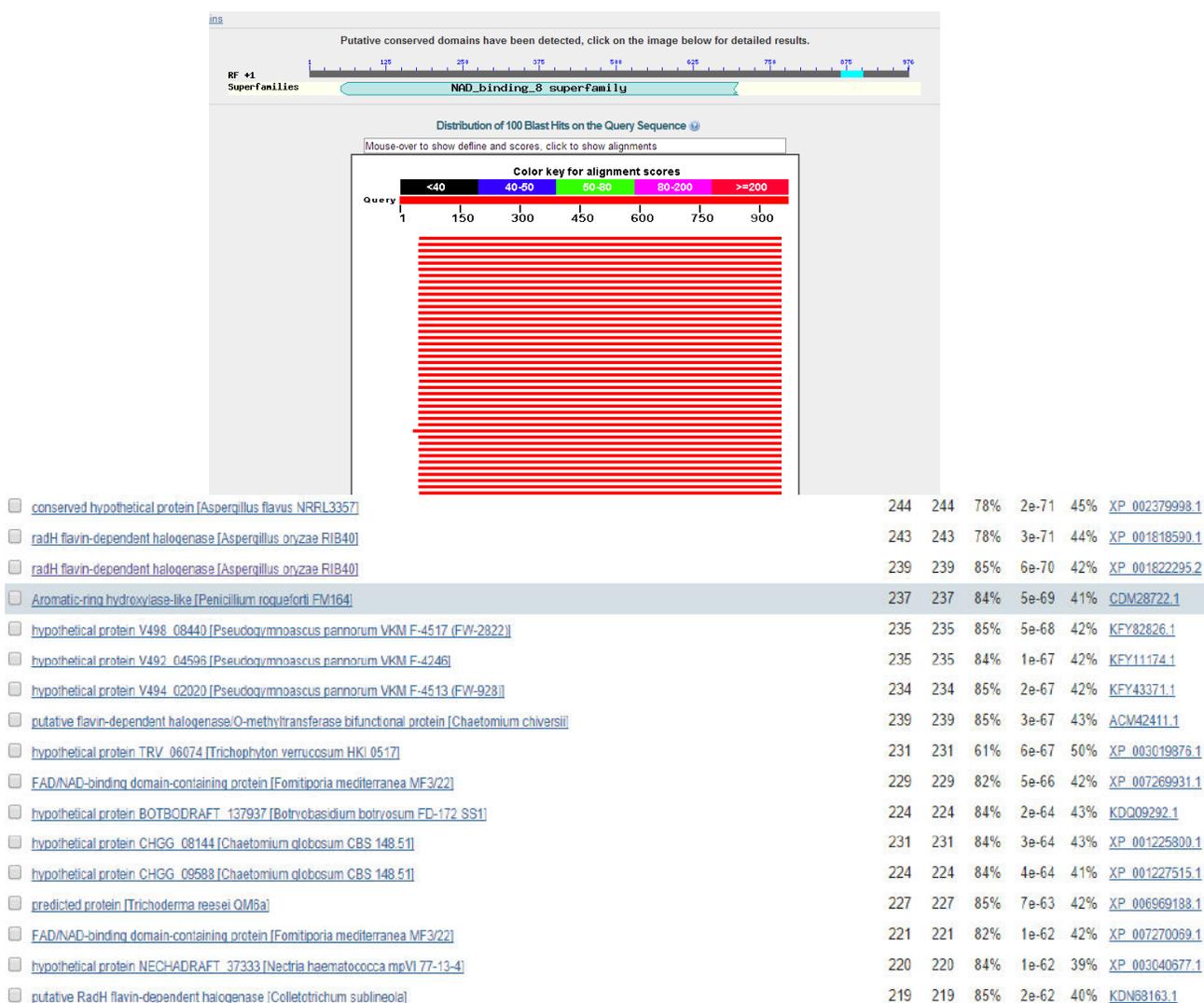


FIGURA 4.32: Resultados do BLAST: Principal domínio obtido no alinhamento e similaridade das enzimas depositadas no banco de dados com o fragmento PEA_1.

O resultado de maior destaque foi a similaridade entre o fragmento PEA_1 e a radH flavin-dependent halogenase de *Aspergillus oryzae* RIB40, como é mostrado na figura a seguir.

Download ▾ GenPept Graphics

radH flavin-dependent halogenase [Aspergillus oryzae RIB40]
 Sequence ID: [ref|XP_001818590.1](#) Length: 549 Number of Matches: 1
 ▶ See 2 more title(s)

Range 1: 28 to 326 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
361 bits(927)	2e-117	Compositional matrix adjust.	184/303(61%)	234/303(77%)	4/303(1%)	+1
Query 49		RGIDIVLLEGDKFPRYHIGESMLASMRHLLRIVDLDSVFDNYGFTKKVGAAFKLNPKKRP			228	
		G+DIVLLE D FPRYHIGESML S+RH LR +DLDS FD+YGF K GAAFKLN K				
Sbjct 28		EGVDIVLLEADVFPYHIGESMLPSIRHFLRFIDLDSKFDVYGFVNKNGAAFKLNPKPE-			86	
Query 229		GYTDFLAAGGPENYAWNVRSEADNLMFKHAADSGAKITFDGVQIKAIKFDIPYKGSVEL			408	
		YTDF+AAGGP ++AWNVRSEAD+LMFKHA ++GA+ FDGV++ +I+F+ I +V+				
Sbjct 87		AYTDFIAAGGPGSHAWNVRSEADHLMFKHAGENGAQVFDGVKVNSEFEQID-GLTVDP			145	
Query 409		PHEYGRPVSAITWRKEDGTSGEIKFDFVVDASGRVGLLSTIKYLNRRYNQGLKNVANWG			588	
		GRPVSATW+ K G G I F++++DA+GR GL+STKY+KNRRYNQGLKNVA+WG				
Sbjct 146		SLSELGRPVSAITWSCKATGGKGSITFEYLIDATGRAGLVSTIKYLNRRYNQGLKNVASWG			205	
Query 589		YWKGCPTYAAGTPRANSPFFFEALQDESGWAWAIPLHNGTTSVGIVMNQMSIDRQVQSGS			768	
		YW G+Y GIPR P+FEA++D SGW W IPLHNGTTS+G+VMNQ+ +I +K ++G+				
Sbjct 206		YWSNAGSYGVGTPREGDPYFEAIEDGSGWVWLIPLHNGTTSIGVVMNQEAATAKKRETGA			265	
Query 769		PDSKTFYLDCLKQLAPDITELLGEGELTSNIKsasdysysasgyaIPGARIVGDAGCFID			948	
		+K YL+ +K P + +LL + EL S++KSASD+SY+AS YA P RIVGDAGCFID				
Sbjct 266		T-TKDLYLNTIKN-TPGVWQLLDKAEQLQSDLKSASDWSYNASSYASPYLRIVGDAGCFID			323	
Query 949		PFF 957				
		PFF				
Sbjct 324		PFF 326				

FIGURA 4.33: Comparação da sequência de aminoácidos entre o fragmento PEA_1 e radH de *Aspergillus oryzae* RIB40.

Em nível de comparação, as halogenases dependentes de FADH₂ depositadas no NCBI foram alinhadas e um dendrograma foi montado, como é mostrado na figura abaixo.

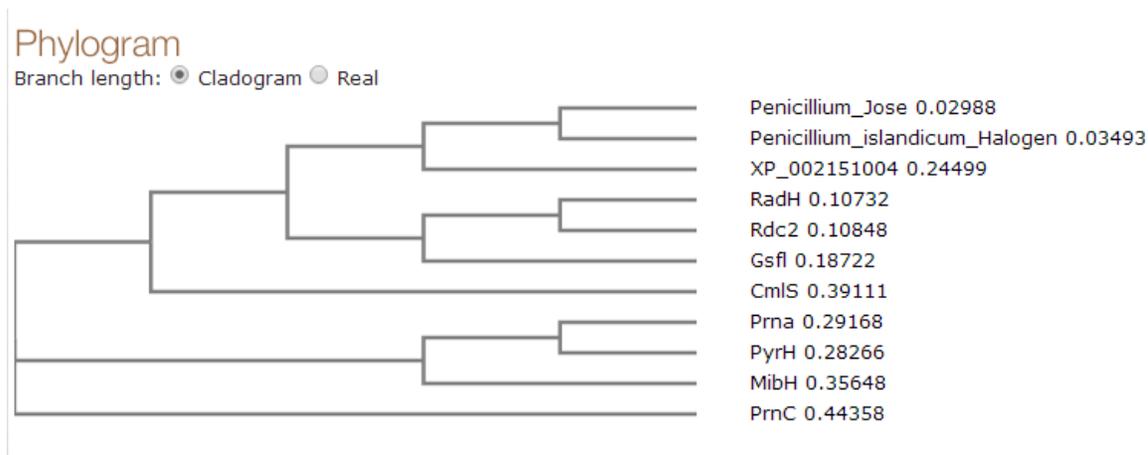


FIGURA 4.34: Dendrograma de todas as halogenases dependentes de FADH₂ para organismos procariotos e eucariotos.

A partir do dendrograma, observa-se a semelhança entre as halogenases fúngicas (*Penicillium_Jose*, *Penicillium_islandicum*, XP_002151004, RadH, Rdc2, Gsfl e Cmsl), especialmente as do gênero *Penicillium*, e as halogenases produzidas por bactérias (Prna, PyrH, MibH e PrnC). Apesar dos substratos utilizados pelos sistemas enzimáticos serem diferentes, observa-se certa semelhança entre as produzidas por eucariotos e as produzidas por procariotos. As regiões das enzimas responsáveis pela oxidação dos íons halogenetos devem ser conservadas, pois o mecanismo de formação dos hipohaleto ocorre da mesma forma para todos os organismos que expressam halogenases dependentes de FADH₂.

Esta região conservada foi encontrada no fragmento obtido (WXWXIPL) e mostra que, provavelmente, o fungo *Penicillium chrysogenum* possui em seu genoma uma halogenase dependente de FADH₂.

Uma comparação foi realizada para verificar se o fragmento encontrado pode ser de uma halogenase. O fungo *Penicillium islandicum* possui uma halogenase dependente de FADH₂ e pelo fato de do genoma ser sequenciado a halogenase foi detectada e a sequência da halogenase de *P. islandicum* foi comparada com o fragmento de *P. chrysogenum*. A Figura 4.35 mostra esta comparação feita por meio de alinhamento das sequências.

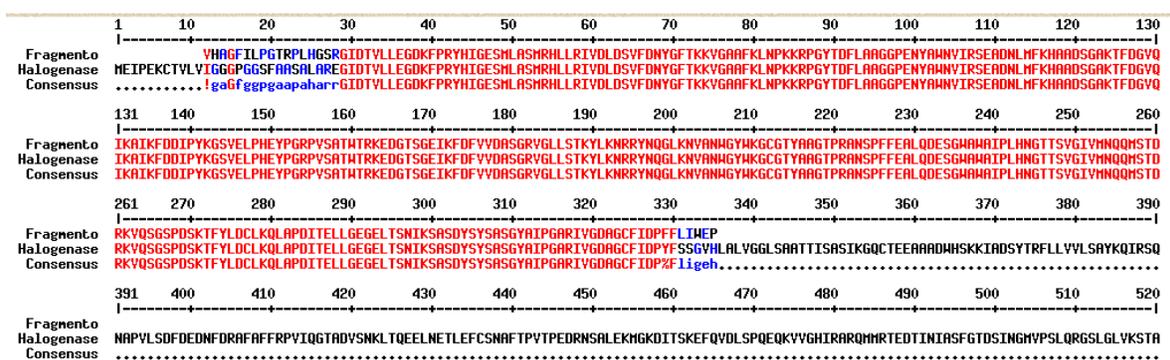


FIGURA 4.35: Comparação entre a halogenase de *Penicillium islandicum* e o fragmento obtido do gDNA de *Penicillium chrysogenum*.

De acordo com a figura acima, a halogenase de *P. islandicum* possui 520 aminoácidos, enquanto o fragmento obtido de *Penicillium chrysogenum* possui em torno de 320 aminoácidos. O fragmento é compatível com a enzima, sendo um forte indício de que o fragmento isolado do gDNA de *P. chrysogenum* possa ser correspondente a uma halogenase. Para a comprovação deste argumento é necessário que o genoma completo seja detectado e isolado.

A busca pelo gene completo foi iniciada por meio de uma técnica amplamente utilizada em biologia molecular: *Southern Blot*.

Nesta técnica, o DNA clivado e separado por eletroforese em gel é imerso em solução alcalina para desnaturar os fragmentos de DNA de fita

dupla. Esses fragmentos são, então, transferidos para uma membrana positivamente carregada, a qual são aderidos, criando uma impressão ou marca. Os fragmentos de DNA são ligados à membrana em posições equivalentes as que eles assumiram no gel após a eletroforese.

O DNA ligado à membrana é incubado com a sonda de DNA contendo uma sequência complementar a uma sequência interna ao gene de interesse. Essa sondagem é feita sob condições de concentração salina e temperatura próximas as condições de desnaturação e renaturação dos ácidos nucléicos. Sob essas condições, a sonda de DNA somente hibridizará firmemente ao seu complemento exato. Frequentemente, a sonda está em excesso molar elevado, comparado ao alvo imobilizado na membrana, favorecendo a hibridização, ao invés do reanelamento do DNA desnaturado. De qualquer maneira, a imobilização do DNA desnaturado na membrana tende, também, a interferir com a renaturação. O local onde a sonda hibridiza na membrana pode ser detectado por vários filmes ou outros métodos que sejam sensíveis a luz ou aos elétrons emitidos pelo DNA marcado. Quando um filme de raios X é exposto a membrana e depois revelado, é produzida uma auto-radiografia, na qual o padrão de exposição do filme corresponde à posição dos híbridos na membrana.

Ao utilizar a técnica de Southern Blot, o principal objetivo foi obter um fragmento maior do gene da halogenase. Ao utilizar enzimas de restrição, fragmentos maiores de gDNA contendo o fragmento da halogenase utilizado como sonda são obtidos. Desta forma, este fragmento maior pode ser inserido num vetor e a clonagem deste fragmento pode ser realizada. Com o fragmento clonado, o sequenciamento do mesmo pode ser realizado, uma vez que há quantidade suficiente para o procedimento. Assim, pode-se obter um fragmento maior do gene, ou até mesmo o gene completo.

O fragmento do gene PEA_1 foi utilizado como a sonda para a hibridização do DNA que foi digerido com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI, HindIII, NcoI e PstI e o resultado da digestão é mostrada no eletroforese em gel na figura abaixo.

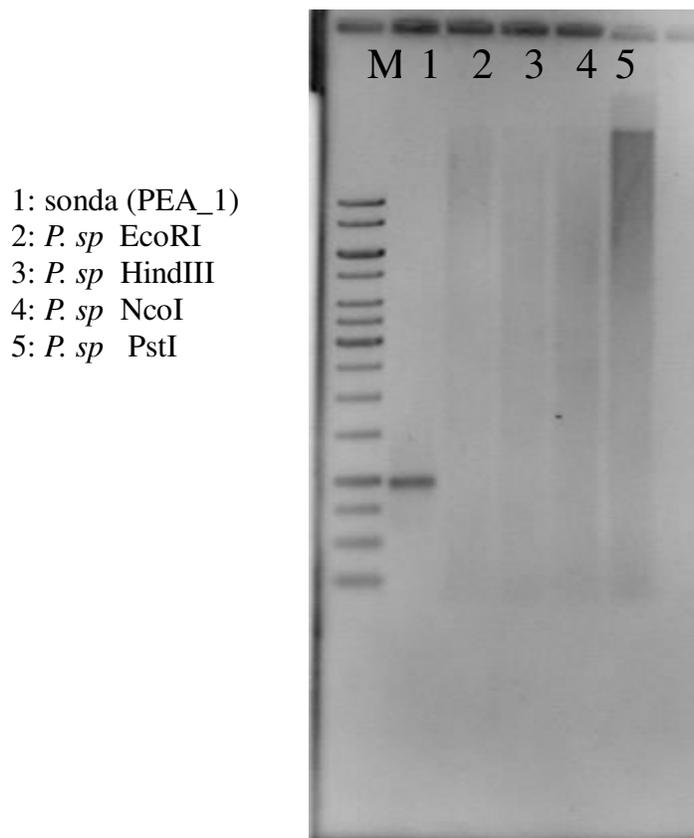


FIGURA 4.36: Eletroforese em gel da digestão do gDNA de *Penicillium chrysogenum*.

O processo de hibridização ocorreu da mesma forma como descrito anteriormente e a auto-radiografia obtida no processo é mostrada na Figura 4.37.

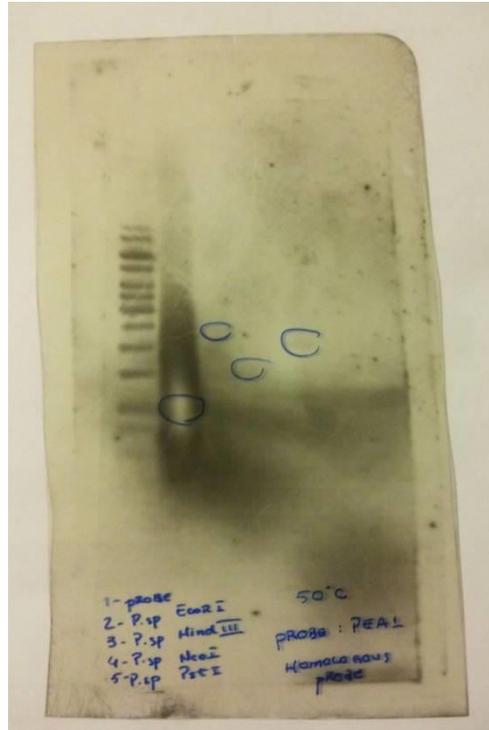


FIGURA 4.37: Auto-radiografia obtida do processo de Southern Blot para o gDNA de *Penicillium chrysogenum*.

Como é observado na figura acima, o fragmento utilizado como probe foi encontrado em todos os gDNA digeridos. Como padrão positivo, após o marker, o fragmento utilizado como sonda foi hibridizado e pode-se observar que possui exatamente o mesmo tamanho. Os gDNA digeridos com EcorI, HindIII, NcoI e PstI também foram hibridizados e os fragmentos contendo o pedaço do gene hibridizado estão em torno de 4kbp.

O fragmento de gDNA digerido com PstI com, aproximadamente, 4kbp foi escolhido para inserção no vetor pLITMUS28. Após a ligação do fragmento com o vetor, o DNA circular foi transformado com células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B e os clones foram selecionados de acordo com a resistência ao antibiótico ampicilina, uma vez que o vetor pLITMUS28

possui um gene de resistência a este antibiótico, como pode ser observado na Figura 4.35.

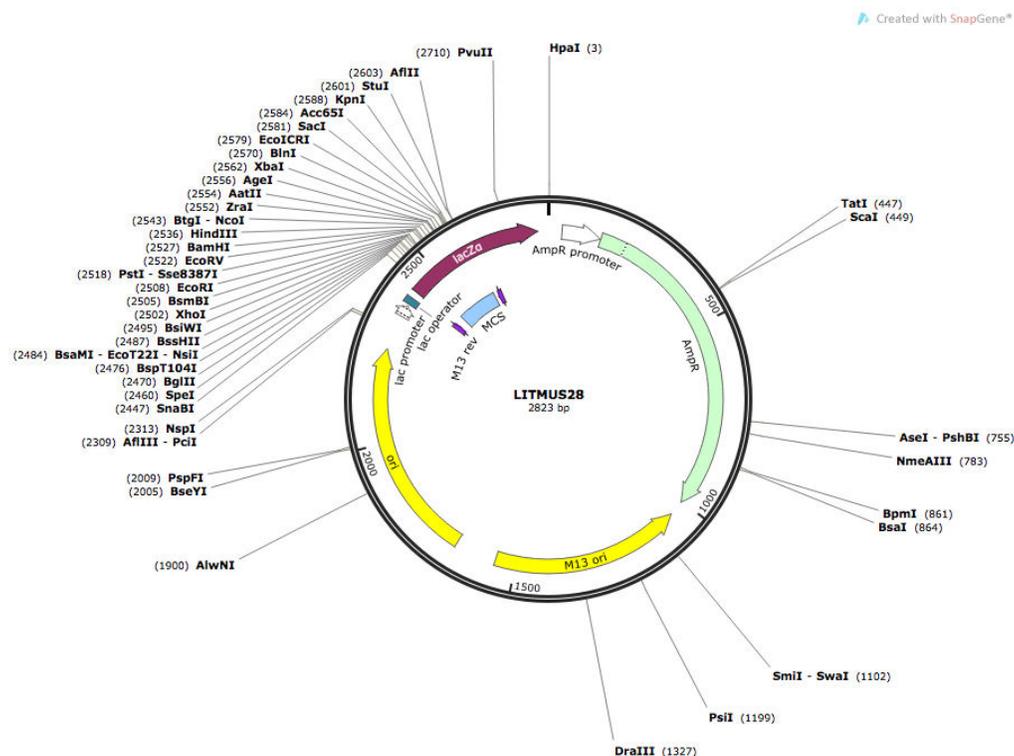


FIGURA 4.38: Mapa do vetor pLITMUS28 utilizado para clonagem dos fragmentos de interesse. (Retirado de http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/LITMUS28/)

Para facilitar na visualização e obtenção dos clones de interesse, o mecanismo de seleção branco e azul de colônias foi utilizado para que o processo se tornasse mais rápido e eficiente.

Após o crescimento das colônias selecionadas em meio apropriado, os clones reagiram com as enzimas de restrição utilizadas no Southern Blot e os fragmentos com tamanhos esperados (aproximadamente 4 kbp) foram enviados para sequenciamento.

Os clones selecionados foram sequenciados e após a comparação pela ferramenta BLAST com as halogenases depositadas no banco de dados NCBI, não houve nenhum alinhamento compatível com halogenases.

As combinações obtidas são mostradas na Figura 4.39.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pc18q00140 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255]	122	181	38%	4e-28	52%	XP_002561861.1
<input type="checkbox"/> Putative cyclase [Penicillium roqueforti FM164]	122	181	38%	4e-28	52%	CDM33990.1
<input type="checkbox"/> conserved hypothetical protein [Aspergillus fumigatus Af293]	119	176	38%	7e-27	49%	XP_748058.2
<input type="checkbox"/> conserved hypothetical protein [Aspergillus fumigatus A1163]	119	176	38%	9e-27	49%	EDP51135.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein NFIA_039260 [Neosartorya fischeri NRRL 181]	118	176	38%	1e-26	49%	XP_001266247.1
<input type="checkbox"/> conserved hypothetical protein [Aspergillus clavatus NRRL 1]	117	174	38%	3e-26	48%	XP_001276246.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [Aspergillus oryzae RIB40]	115	167	38%	8e-26	47%	BAE61514.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein Ao3042_11368 [Aspergillus oryzae 3.042]	115	167	38%	8e-26	47%	EIT83375.1

FIGURA 4.39: BLAST obtido após o sequenciamento dos clones selecionados.

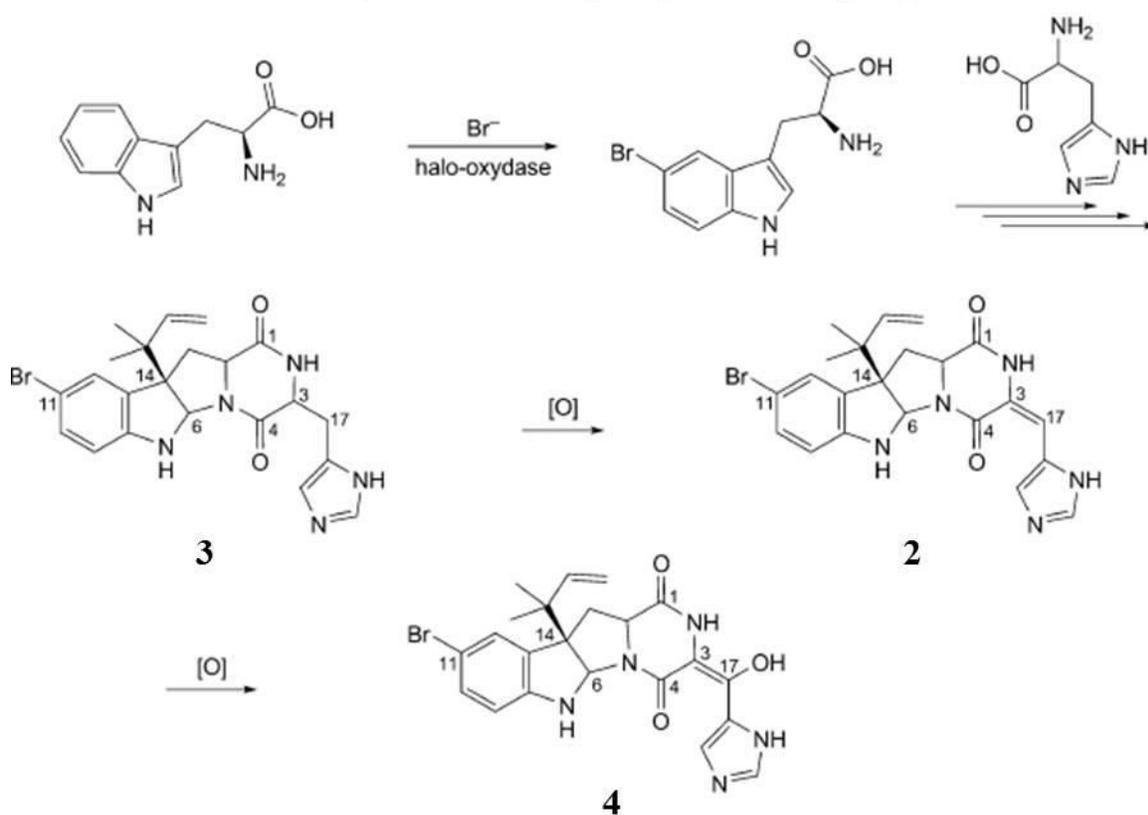
O fragmento clonado obtido tem semelhanças com proteínas de organismos eucariotos (52% de identidade com *P. chrysogenum*), porém não há semelhanças com as halogenases.

A seleção das colônias ocorreu de forma equivocada, ou o fragmento obtido continha genes que também expressam outras proteínas levando a um alinhamento diferente do esperado. Outras formas de obtenção do gene responsável pela reação de halogenação em *P. chrysogenum* podem ser realizadas. Uma delas seria o sequenciamento do genoma do fungo e a busca por contigs nos quais o gene esteja presente. Outra possibilidade seria a construção de uma biblioteca de cDNA para a expressão do gene.

O trabalho envolvendo a busca de uma possível halogenase de *Penicillium chrysogenum*, responsável pela inserção do átomo de bromo no anel indólico nos metabólitos derivados da rota biossintética dos alcaloides

dicetopiperazínicos, não teve seu objetivo final completo. Entretanto, foi obtida uma sequência semelhante a uma halogenase obtida do fungo *Aspergillus oryzae*. Essa informação, juntamente com outros experimentos realizados e discutidos anteriormente inferem que, provavelmente, o fungo *P. chrysogenum* possui uma enzima semelhante a uma halogenase dependente de FADH₂ que é capaz de halogenar o aminoácido triptofano e, assim, continuar com a rota biossintética para a formação das roquefortinas (ZHENER, *et. al.*, 2005)(WEITCHOLD, *et. al.*, 2016).

Desta forma, a proposta biossintética para a formação dos alcaloides dicetopiperazínicos é mostrada no Esquema 4.4.



ESQUEMA 4.4: Proposta biossintética para a formação das roquefortinas halogenadas detectadas e isoladas de *Penicillium chrysogenum*.

A proposta biossintética, baseada nos dados apresentados acima, mostra que a primeira etapa seria a oxidação dos íons brometos para o intermediário hipobromito. Por meio de uma substituição eletrofílica aromática, ocorre a halogenação do anel indólico do aminoácido triptofano. Como a similaridade do fragmento de gene encontrado em *P. chrysogenum* foi compatível com uma halogenase dependente de FADH₂ de *Aspergillus oryzae*, o triptofano encontra-se livre no meio enzimático para que a reação de halogenação ocorra. Após a reação de halogenação, a histidina é condensada ao triptofano e a biossíntese ocorre da mesma forma que as roquefortinas, havendo a formação inicialmente da bromoroquefortina D, com consequente oxidação da dupla ligação entre C3 e C17 para formação da bromoroquefortina C. Após a formação da bromoroquefortina C, há uma posterior oxidação em C17 para a formação da 17-hidroxi-bromoquefortina C.

Os outros metabólitos secundários provenientes da rota biossintética dos alcaloides dicetopiperazínicos não foram detectados nos experimentos de LC-MS/MS em baixa e alta resolução.

4.13 Detecção da halogenase de *Talaromyces wortmannii*

O fungo *Talaromyces wortmannii* isolado de *Mallus domestica* é produtor de alcaloides do tipo clavine, contendo em sua estrutura o aminoácido triptofano. As rugulovasinas produzidas podem ou não conter em suas estruturas um ou mais átomos de cloro.

Rugulovasinas são alcaloides do tipo clavine modificados contendo uma unidade espirolactona com efeitos tóxicos observados em aves.

Os metabólitos foram isolados como mistura racêmica, uma vez que eles podem se interconverter por meio de reação de Mannich.

Ao regular o pH do meio de cultura com HCl, o fungo foi capaz de produzir a cloro-rugulovasina (**6**) e a dicloro-rugulovasina (**7**) e ao realizar mudanças no meio de cultura, trocando as fontes de cloreto por brometo (KBr), o fungo foi capaz de produzir a bromo-rugulovasina (**8**), entretanto, a dibromo-rugulovasina não foi detectada.

As estruturas dos metabólitos halogenados detectados e isolados de *Talaromyces wortmannii* são mostradas na Figura 4.40.

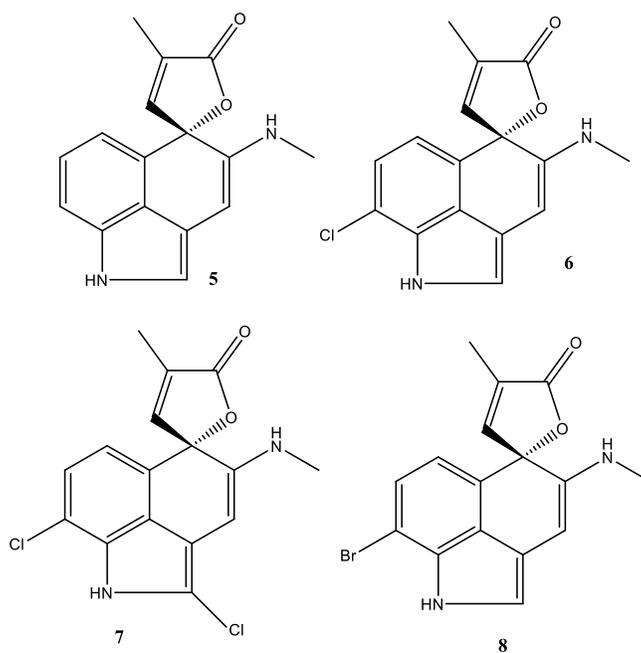


FIGURA 4.40: Estruturas das rugulovasinas, produzidas por *T. wortmannii*.

Nota-se que a halogenação ocorre exclusivamente no aminoácido triptofano nas posições C-2 e C-7. Enzimas específicas de halogenação para os sítios C-7 e C-2 respectivamente às porções derivadas do triptofano já são conhecidas e exploradas. Por exemplo, as enzimas RebH responsável por halogenações em núcleos C-7 e a CmdE em núcleos C-2, que proporcionam a

biossíntese dos metabólitos secundários bacterianos rebecamicina e chondramida-D respectivamente (YEH et al., 2005; RACHID et al.; 2006).

Como o substrato no qual ocorre a halogenação é o triptofano, decidiu-se utilizar os mesmos primers degenerados utilizados para a detecção da halogenase em *Penicillium chrysogenum*.

Após a obtenção do gDNA de *Talaromyces wortmannii*, o mesmo foi utilizado para reações de PCR com os primers J5, J6, J7 e J8. O mesmo procedimento utilizado para *P. chrysogenum* foi realizado e os fragmentos obtidos da reação de PCR são mostrados na Figura 4.41.

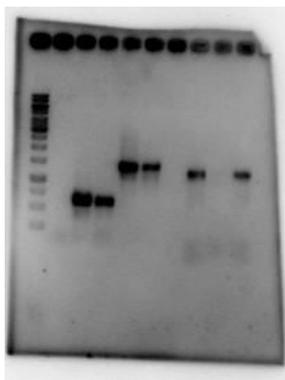


FIGURA 4.41: Gel das PCR de *T. wortmannii*.

Observa-se no gel que a reação X apresentou um fragmento de tamanho semelhante ao esperado para a PCR. Desta forma, o fragmento foi isolado e enviado para sequenciamento para posterior alinhamento pela ferramenta BLAST para comparação com as sequências depositadas no banco de dados NCBI. O resultado do BLAST é mostrado na Figura 4.42.

Download ▾ GenPept Graphics

radH flavin-dependent halogenase [Aspergillus oryzae RIB40]
 Sequence ID: [reflXP_001818590.1](#) Length: 549 Number of Matches: 1
 ▶ See 3 more title(s)

Range 1: 42 to 272 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
243 bits(621)	3e-71	Compositional matrix adjust.	132/300(44%)	169/300(56%)	70/300(23%)	+2
Query 161		RYHIGESMLASMRHLLRIVDLDSVFDNYGFTKKVITVTQVAKGVMPFVEFVDPDINHVFRL			340	
Sbjct 42		RYHIGESML S+RH LR +DLDS FD+YG-----FV F+L			81	
Query 341		AQLSS* <u>TQKSDRDV</u> RITLYLLTFTKIY*LLFQDIDFLAAGGPENYAWNVRSEADHLMFK			520	
Sbjct 82		-----+ + Y-----IDF+AAGGP ++AWNVRSEADHLMFK			115	
Query 521		HAANS <u>GAKT</u> FDGVQIKTIKFEDVPYKGFVALPH-EYPGRPISATWIRKEDGTTIGEIKDFD			697	
Sbjct 116		HA +GA+ FDGV++ +I+FE + G P GRP+SATW+ K G G I F++			173	
Query 698		VVDASGRVGLLSTKYLNRRYNQGLKNVANWGYWKGCGTYAAGTPRANSFFFEALQG*FI			877	
Sbjct 174		++DA+GR GL+STKY+KNRRYNQGLKNVA+WGYW G+Y GTPR P+FEA++			229	
Query 878		VHI* <u>LKIS</u> *AQLSITET <u>ESG</u> WAWA <u>IPL</u> SGTTSVRIWMNQQLPTDRKRNVPVLIQDFLL			1057	
Sbjct 230		-----I <u>ESG</u> W <u>WLIPL</u> NGTTSIGVVMNQEAATAKKRETGATTKDLYL			272	

FIGURA 4.42: Resultado do BLAST do fragmento obtido de *Talaromyces wortmannii*.

De acordo com a figura acima o fragmento possui 44% de identidade com a radH (halogenase obtida de *Aspergillus oryzae*) e possui a mesma sequência característica das halogenases dependentes de FADH₂ (WXWXIPL).

Várias enzimas de restrição foram utilizadas para digestão do gDNA de *T. wortmannii* e a hibridização foi realizada utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. O fragmento isolado foi utilizado como sonda e a auto-radiografia é mostrada na Figura 4.43.

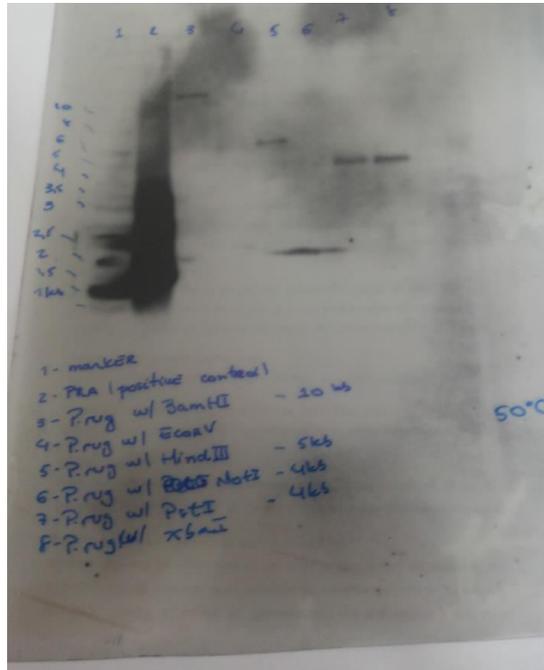


FIGURA 4.43: Auto-radiografia do experimento de Southern Blot para *T. wortmannii*.

A partir dos fragmentos obtidos após a hibridização, o fragmento obtido a partir da digestão do DNA genômico, de aproximadamente 4kbp, com PstI foi escolhido para a ligação no vetor pLITMUS28 e clonagem em *E. coli* DH10B, entretanto o trabalho não foi concluído.

A halogenação em C-2 no triptofano não é comum em metabólitos secundários. Após vasta revisão bibliográfica, observou-se que só há relato de uma halogenase responsável pela reação nesta posição. Possivelmente possa existir duas halogenases responsáveis pelas diferentes posições ou somente uma sem regioseletividade que é capaz de reagir nas posições C-2 e C-7. Trabalhos posteriores deverão ser realizados para a verificação desta hipótese.

4.14 Construção de biblioteca de microrganismos pela ferramenta MALDI-TOF

Para o gênero *Penicillium*, 30 isolados classificados morfológicamente e geneticamente foram analisados por MS e agrupados estatisticamente no dendrograma mostrado na Figura 4.44 para o meio BDA, na Figura 4.45 para o meio Malte e na Figura 4.46 para o meio Aveia.

O objetivo de montar uma biblioteca de isolados é a rápida identificação dos microrganismos em questão. Para isso, deve-se estabelecer o protocolo de crescimento e extração das macromoléculas que se pode observar no espectro de massa. Vários protocolos foram testados e o método mais rápido foi o IC-MS, uma vez que se obtém um perfil capaz de diferenciar os gêneros de vários microrganismos.

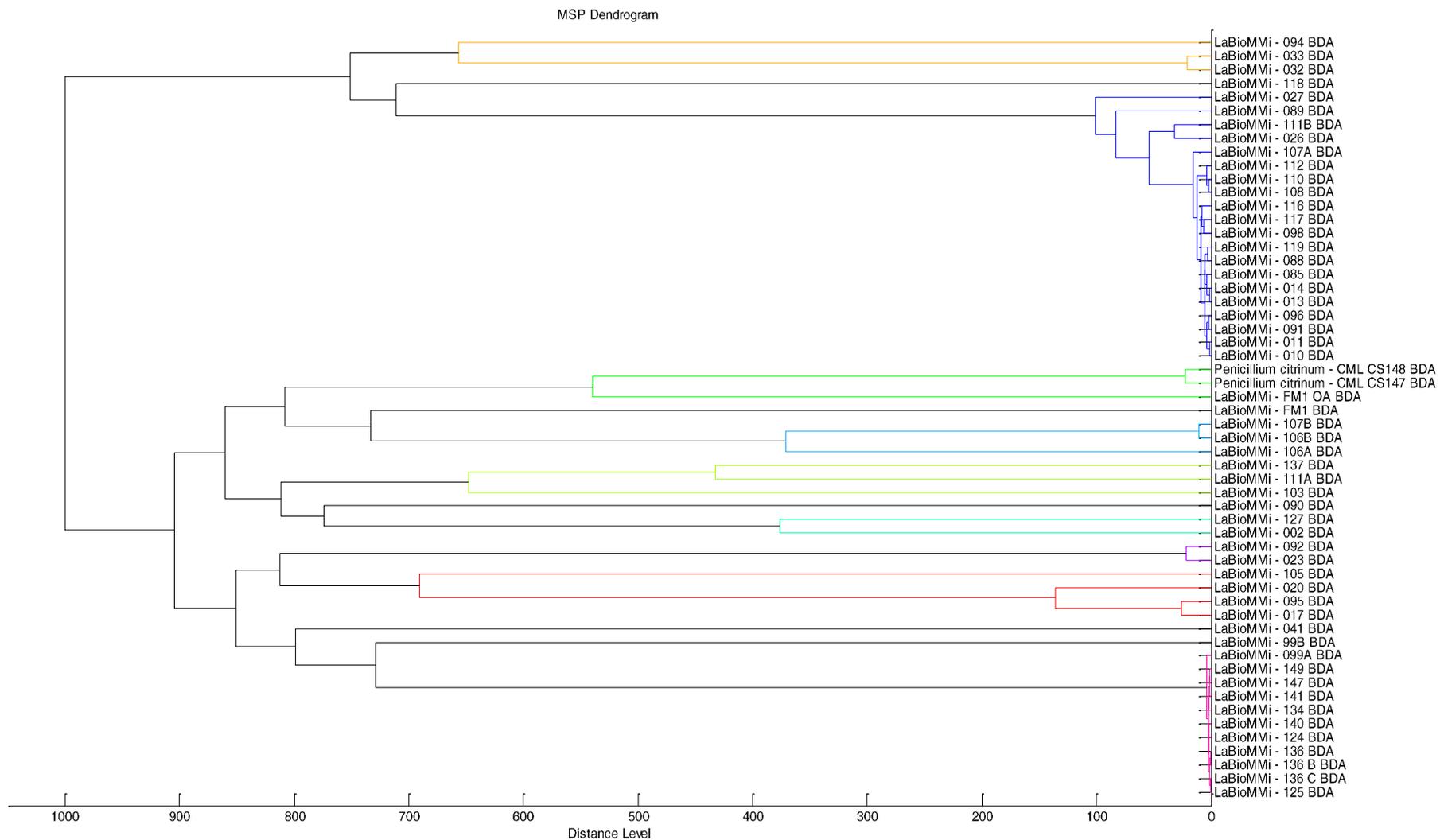


FIGURA 4.44: Dendrograma do gênero *Penicillium* em meio BDA.

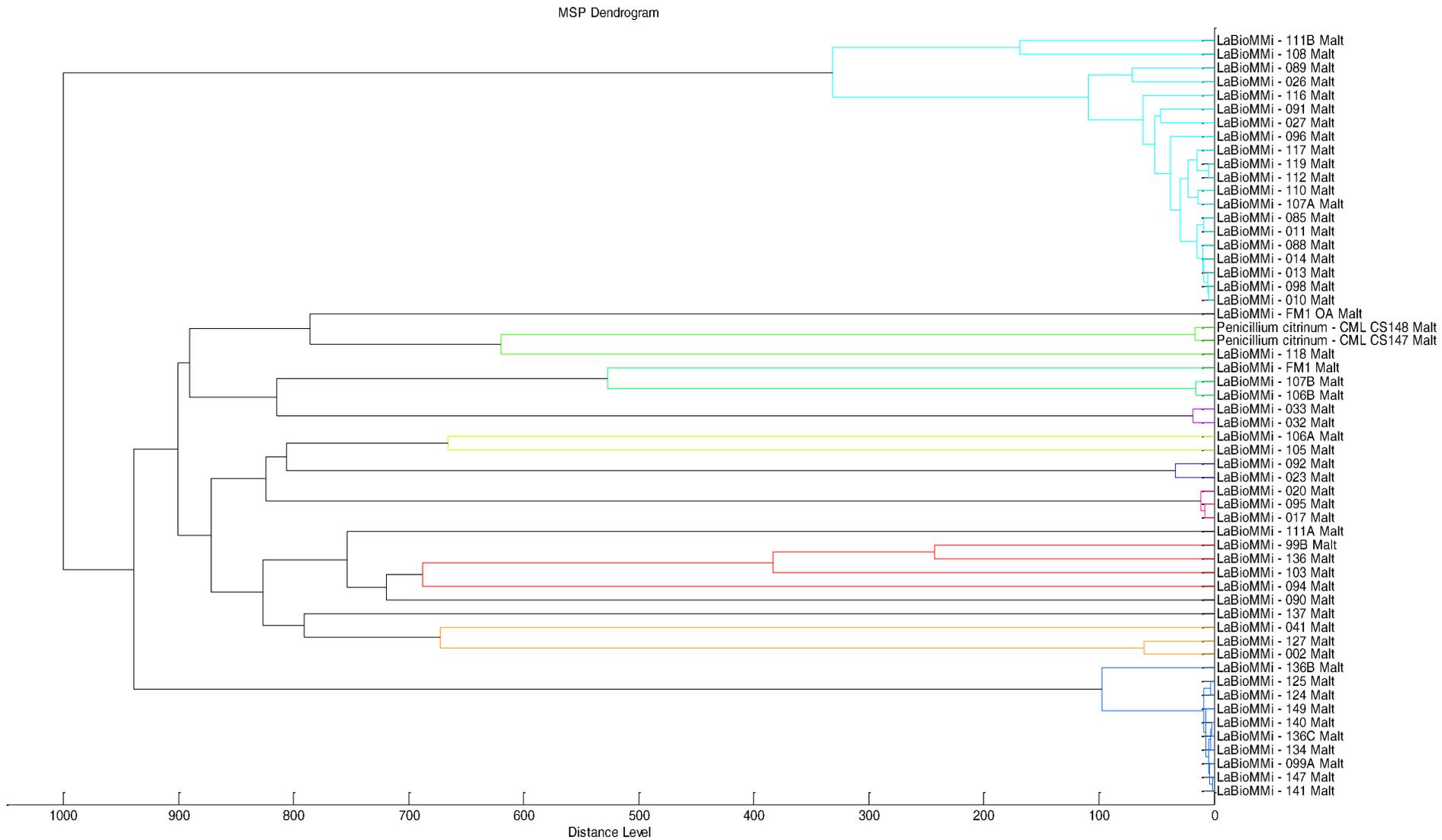


FIGURA 4.45: Dendrograma do gênero *Penicillium* em meio Malte.

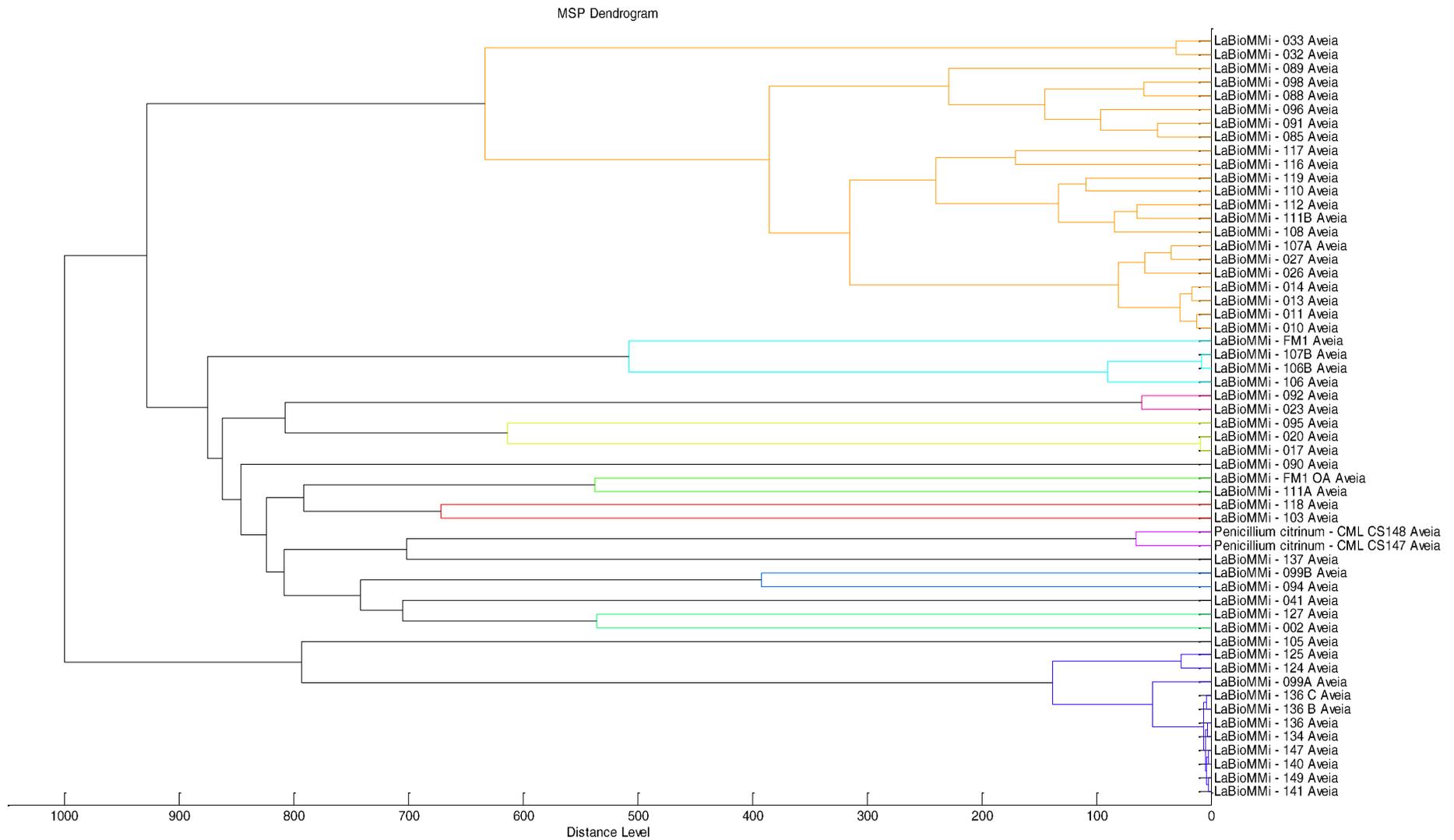


FIGURA 4.46: Dendrograma do gênero *Penicillium* em meio Aveia.

De acordo com as figuras, observa-se que independente do meio utilizado para o crescimento dos microrganismos a comparação estatística é a mesma para o gênero *Penicillium*. As macromoléculas que são observadas no perfil do espectro de massa (“*fingerprint*”) não são influenciadas pela modificação do meio de cultura, sendo elas provenientes do metabolismo primário do fungo, ou até mesmo constituintes das paredes celulares, uma vez que o material analisado nas placas de MALDI foram adquiridos do micélio e dos esporos dos fungos.

Duas linhagens do fungo *Penicillium citrinum* foram obtidas e identificadas como CML CS147 e CML CS148. Os fungos foram analisados por IC MS e a região entre m/z 2500 e 3500 do espectro de massa obtido para os dois se encontra na Figura 4.47.

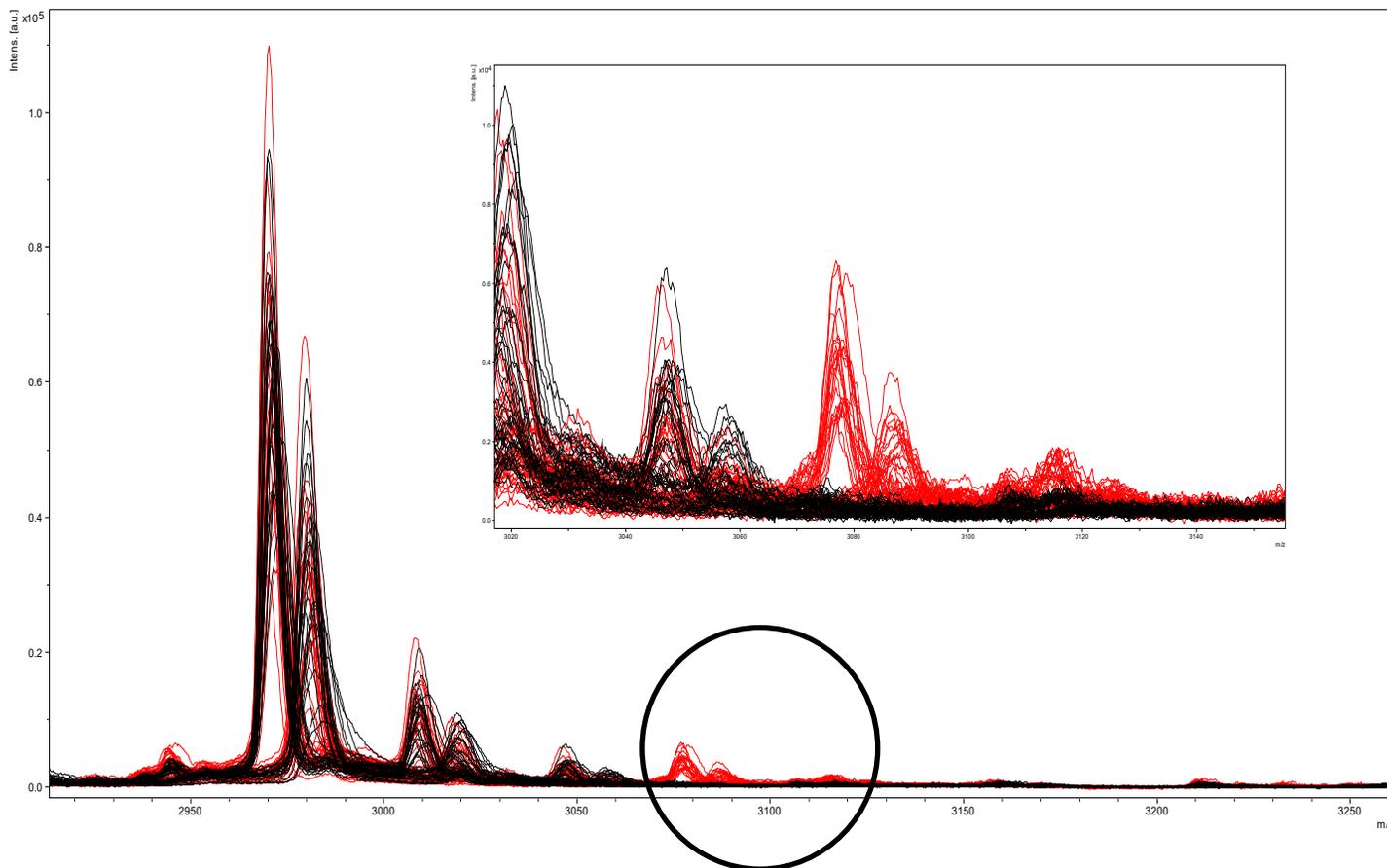


FIGURA 4.47: Comparação entre os espectros de massa para as diferentes linhagens de *Penicillium citrinum*. *Penicillium citrinum* CML CS147 (vermelho) e *Penicillium citrinum* CML CS148 (preto).

Como pode ser observado na figura acima, há uma pequena diferença entre os dois fungos em aproximadamente m/z 3080. Esta diferença no espectro é responsável pela separação entre as duas linhagens nos dendrogramas mostrados anteriormente. O uso da espectrometria de massas para a identificação e diferenciação de microrganismos se mostrou uma ferramenta importante, pois mesmo entre fungos da mesma espécie a técnica foi capaz de diferenciá-los.

Para a construção da biblioteca do gênero *Aspergillus*, 40 linhagens isoladas e identificadas morfológicamente e utilizadas nos experimentos.

Após a obtenção dos espectros das linhagens, análises estatísticas foram realizadas e o dendrograma mostrado na Figura 4.48 mostra o resultado da comparação entre as linhagens.

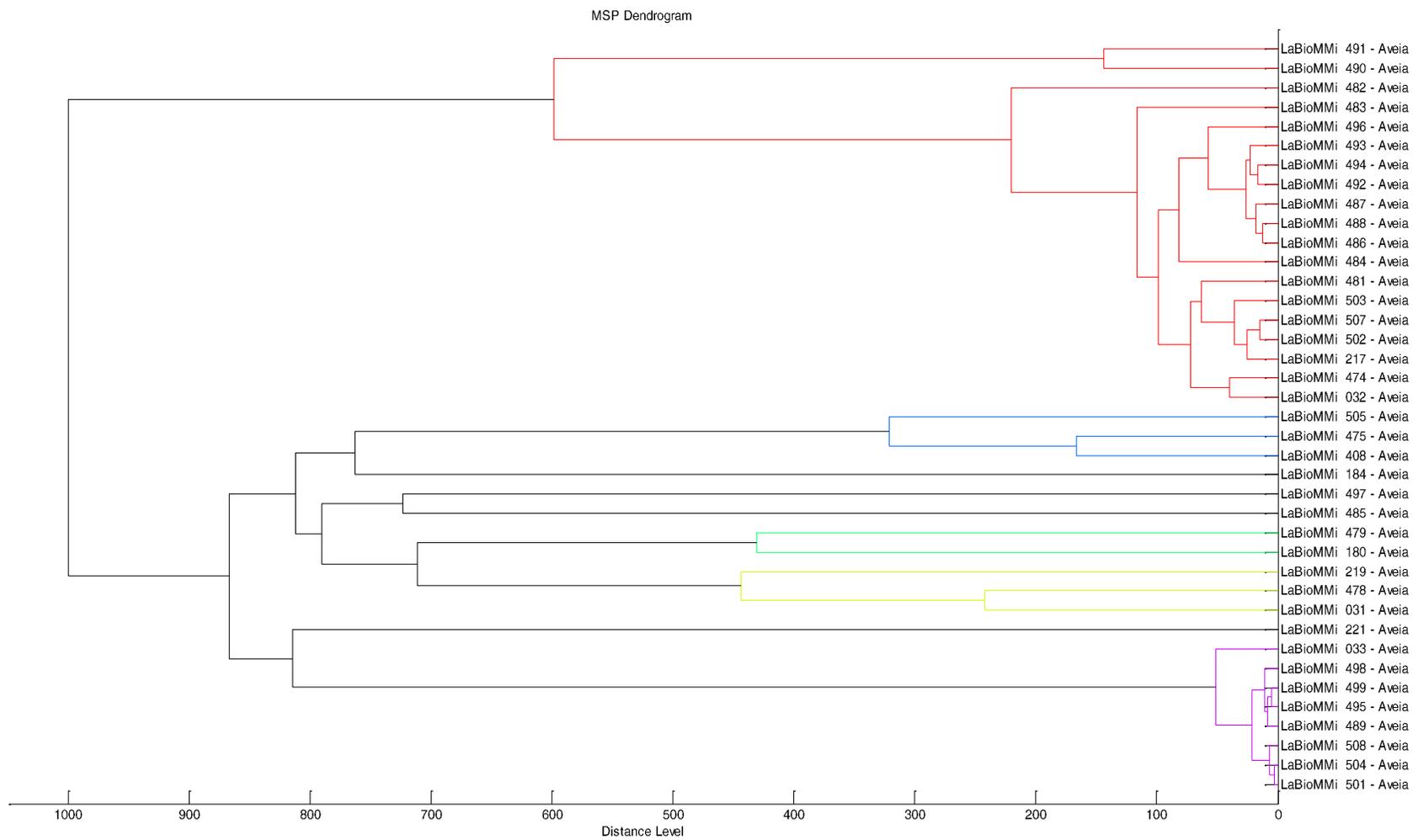


FIGURA 4.48: Dendrograma das linhagens de *Aspergillus* crescidas em meio de aveia.

Como não há diferenciação na classificação dos microrganismos em diferentes meios de cultura, escolheu-se o meio aveia para o crescimento dos fungos gênero *Aspergillus* e criação da biblioteca.

O uso do MALDI-TOF como ferramenta para a identificação de microrganismos se torna cada vez mais viável, uma vez que a construção de bibliotecas tem se tornado mais comuns para comparação. A construção da biblioteca com o perfil de microrganismos no LaBioMMi tende a ser uma fonte de consulta e identificação de microrganismos para pesquisadores que necessitem de uma estratégia rápida de confirmação das espécies isoladas.

4.15 Ensaios de citotoxicidade em linhagens de células tumorais da roquefortina C e bromoroquefortina C.

Para verificar a influência do átomo de halogênio na roquefortina C, ensaios de citotoxicidade da roquefortina C e seu análogo bromado foram realizados pelo Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.3.

TABELA 4.3: Resultado da inibição celular de algumas linhagens tumorais na presença de roquefortina C e bromoroquefortina C.

Linhas Celulares	Roquefortina C (% de inibição)	Bromoroquefortina C (% de inibição)
Glioblastoma (SF-295)	66,07	63,06
Cólon (HCT-116)	17,81	6,73

Das linhagens testadas, nenhuma das moléculas mostrou atividade citotóxica considerável. Todavia, observa-se que a presença do átomo de bromo influencia na citotoxicidade dos metabólitos. Para as células SF-295 há uma pequena diminuição na porcentagem de inibição, já para as células HCT-116 a diminuição ocorre aproximadamente em 50%.

Relatos na literatura mostram que os átomos de halogênio são primordiais para a atividade biológica de alguns metabólitos secundários. Os dois átomos de cloro em vancomicina, um antibiótico para tratamento contra *S.aureus* multi resistente, são necessárias para conseguir a conformação clinicamente ativa deste antibiótico através do controle de atropoisômeros (HARRIS *et al.*, 1985). A eficácia terapêutica da salinosporamida A, um inibidor de proteases, requer a presença de um átomo de cloro. A adição das hidroxilas presentes na treonina das proteases à lactona da salinosporamida leva à abertura da β -lactona e liberação da hidroxila presente na molécula. Esta hidroxila nucleofílica, capaz de restaurar a lactona e eliminar o inibidor, ao invés reage de maneira intramolecular para deslocar o cloreto e formar o anel tetrahidrofurano (GROLL *et al.*, 2006). A sequência das reações prevê uma inibição covalente irreversível e está relacionada ao potencial anticâncer desta substância. A presença de átomos de cloro é relevante para a atividade antitumoral da rebecamincina, entretanto, seu derivado sem átomos de halogênio possui atividade antimicrobiana (RODRIGUES PEREIRA *et al.*, 1996). Da mesma forma, os sesterterpenos halogenados neomangicol A e B mostram efeito citotóxico *in vitro* para linhagem HCT-116, enquanto seu análogo não halogenado (neomangicol C) não possui atividade (RENNERET *et al.*, 1998).

Claramente a presença do átomo de bromo influencia na atividade citotóxica das roquefortinas, porém para este caso foi verificado a diminuição da inibição. Como não foram realizados estudos envolvendo o mecanismo de ação dos

metabólitos com as células tumorais, supõe-se que a posição do halogênio pode ser um fator determinante para a interação entre as células e a bromoroquefortina C. Durante estudos farmacológicos da citisina, um alcalóide quinozilidínico, foi observado que a molécula apresentava atividade biológica quando o átomo de halogênio estava na posição C(3) e perdia totalmente a atividade farmacológica quando o átomo de halogênio se encontrava na posição C(5) devido à falta de afinidade com receptores nicotínicos $\alpha 7$.

5. CONCLUSÕES

O fungo *Penicillium chrysogenum*, relatado anteriormente como produtor dos alcaloides dicetopiperazínicos roquefortina C e bromoroquefortina C foi capaz de produzir a clororoquefortina C quando ao meio de cultura foi adicionado NH_4Cl . Como relatado na literatura, os organismos produtores de metabólitos halogenados (bromados e clorados) geralmente produzem as substâncias contendo átomos de cloro ou bromo dependendo do íon presente no crescimento do microrganismo. Desta forma, o mecanismo utilizado para a substituição eletrofílica aromática é o mesmo, já que os átomos possuem propriedades físico-químicas semelhantes.

Experimentos avaliando a estimativa de produção da roquefortina C e seu análogo bromado mostraram que o máximo de área obtido para a roquefortina C foi em 30 dias, enquanto que para a bromoroquefortina C o máximo de produção foi em 15 dias de crescimento de *P. chrysogenum*. Estes dados corroboram com a verificação da produção do bromotriptofano, que teve seu máximo de produção em 10 dias, indicando que o triptofano bromado pode ser utilizado como precursor para a formação da bromoroquefortina C.

Novos alcaloides halogenados foram detectados por estudos de espectrometria de massas em alta resolução. Todos os metabólitos detectados são derivados da rota dos alcaloides dicetopiperazínicos, como a bromoroquefortina D (precursora da bromoroquefortina C) e a 17-oxi-bromoroquefortina C. Seguindo a rota dos alcaloides dicetopiperazínicos, não foi detectada a produção de outros metabólitos pertencentes a esta rota.

A síntese do triptofano com NaOBr levou à formação de três isômeros do bromotriptofano através de análises por LC-MS/MS. Ao utilizar diferentes volumes de NaOBr observou-se a formação dos mesmo isômeros em todos os volumes de agente oxidante. Pelos dados obtidos por experimentos de íons fragmentos e da separação cromatográfica observou-se que os isômeros obtidos são

de posição. Acredita-se que a regioseletividade observada na produção do bromotriptofano por *P. chrysogenum* ocorre via enzimática já que ocorreu a formação de um único isômero enquanto na reação *in vitro* observou-se os isômeros.

Ao adicionar o bromotriptofano sintetizado ao meio de cultura durante o crescimento de *P. chrysogenum* foi detectada a produção da bromoroquefortina C, entretanto somente um isômero foi detectado sendo mais uma evidência que o microrganismo consegue utilizar o triptofano bromado como precursor para a produção das roquefortinas halogenadas.

A reação da roquefortina C com NaOBr levou à formação da bromoroquefortina C e foram observados no cromatograma três bandas cromatográficas com o mesmo espectro de massa em alta resolução referente à bromoroquefortina C. A falta de regioseletividade observada na síntese do bromotriptofano foi observada na produção da bromoroquefortina C, enquanto que o fungo *P. chrysogenum* produz somente um único metabólito halogenado.

O gDNA dos fungos *P. chrysogenum* e *T. wortmannii* foram isolados e um fragmento correspondente a uma halogenase foram detectados em produtos de PCR utilizando *primers* degenerados obtidos por meio de comparação de sequência de halogenases relatadas para organismos eucariotos. A utilização da técnica de *Southern Blot* para o isolamento de fragmentos maiores contendo o gene completo levou à clonagem de fragmentos de *Penicillium chrysogenum*, porém os resultados obtidos não foram correspondentes a uma halogenase. Para o fungo *Talaromyces wortmannii* obteve-se um fragmento correspondente a uma halogenase, porém experimentos de clonagem do fragmento não foram realizados.

Para organismos eucariotos, a seletividade encontrada na halogenação de metabólitos secundários ocorre em centros ricos em elétrons, fato já relatado para todas as halogenases dependentes de FADH₂. Desta forma a utilização de

alguns substratos aromáticos na presença de íons brometo não levou à formação de seus respectivos produtos de biotransformação halogenados. Outros experimentos com um controle maior das condições de cultivo devem ser realizados para verificação da seletividade dos fungos *P. chrysogenum* e *T. wortmannii*.

MALDI-TOF IC-MS foi utilizado como técnica para construção de uma biblioteca de microrganismos isolados do grupo LaBioMMi e alguns colaboradores. Por meio da obtenção do perfil destes organismos, espectros foram adquiridos e armazenados. Constatou-se que independente do meio de cultura utilizado a comparação por meio de análises estatísticas (construção de dendrogramas) permanece inalterada. Para a construção da biblioteca utilizou-se 30 linhagens do gênero *Penicillium* e 40 isolados do gênero *Aspergillus*.

6. REFERÊNCIAS

ASSIS, D.M.; JULIANO, I. & JULIANO, M.A., “A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos”, Revista da Universidade do Vale do Rio Verde, 9(2): 344, 2011.

BIZZINI, A. & GREUB, G. “Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification”. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 1614, 2010.

BJORN, H.; BETHE, B. & ZEECK, A. “Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity”. *ChemBioChem.*, **3**: 619, 2002.

BLASIAK, L. C. & DRENNAN, C. L. “Structural perspective on enzymatic halogenation.” *Accounts of Chemical Research*, **42**: 147, 2009.

BUNCH, A.W & HARRIS, R.E. “The manipulation of micro-organisms for the production of secondary metabolites”, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **4**: 117, 1986.

BUTLER, A. & SANDY, M. “Mechanistic considerations of halogenating enzymes”. *Nature*, **460**: 848, 2009.

DONG, C; FLECKS, S.; UNVERSUCHT, S.; HAUPT, C.; VAN PEE, K.H. & NAISMITH, J.H. “Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 309(5744): 2216, 2005

DRENNAN, C. L. & BLASIAK, L. C. “Structural Perspective on Enzymatic Halogenation”, *Accounts of Chemical Research*, **42**: 147, 2009.

DUNN, M.F.; NIKS, D.; NGO, H.; BARENDT, T.R. & SCHLICHTING, I., “Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine”, *Trends in Biochemical Sciences*, 33(6): 254, 2008.

FENICAL, W., AND JENSEN, P.R., “Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria”, *Nature Chemical Biology*, **2**: 666, 2006.

GRIBBLE, W. G. The handbook of environmental chemistry, vol.3 , Parte P. Springer, 2003. p.1-15.

GRIBBLE, W. G. Progress in the chemistry of organic natural products, vol.91. Springer, 2010. 9.613.

GUANATILAKA, A.A.L., “Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence” Journal of Natural Products, 69 (3): 509, 2006.

HAMMER, P. E.; BURD, W.; HILL, D.S.; LIGON, J.M & VAN PEE, K.H., “Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains.” FEMS Microbiological Letters, 180(1):39, 1999.

HETTICK, J. M.; KASHON, M. L.; SIMPSON, J. P.; SIEGEL, P. D.; MAZUREK, G. H.; WEISSMAN, D. N. “Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. Analytical Chemistry, **76**: 5769, 2004.

ITOH, N.; MORINAGA, N. & NOMURA, A., “A variety of catalases and bromoperoxidases in genus *Pseudomonas* and their characterization.” Biochimica et Biophysica Acta, 1122(2): 189, 1992.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E. & BORZANI, W. Biotecnologia: Tecnologia das fermentações". São Paulo: Edgard Blucher, 1975 p. 1-18.

KELLER, S.; WAGE, T.; HOHAUS, K.; HOLZER, M.; EICHHORN, E. & VAN-PÉE, K. H., “Purification and partial characterization of 7-tryptophan halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*”. Angewandte Chemie International Edition, 39 (13): 2300, 2000.

KÖNIG, G.M.; EL OMARI, M. & WAGNER, C., “Biohalogenation: Nature’s way to synthesize halogenated metabolites”. Journal of Natural Products, **72**: 540, 2009.

LEIRÓS, M.; ALONSO, E.; RATEB, M.E.; HOUSSEN, W.E.; EBEL, R.; JASPARS, M.; ALFONSO, A. & BOTANA, L.M., “Bromoalkaloids protect primary cortical neurons from induced oxidative stress”, ACS Chemical Neuroscience, 6(2): 331, 2015.

MASUMA,R., TANAKA, Y., TANAKA, H., OMURA, S., “Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents”. *Journal of Antibiotics*, **39**: 1557, 1986.

NENKEP, V.; YUN, T.; ZHANG, D.; CHOI, H.D.; KANG, J.S. & SON, B.W. “Induced production of bromomethylchlamydosporols A and B from the marine-derived fungus *Fusarium tricinctum*”. *Journal of Natural Products*, 73(12): 2061, 2010.

OMURA S., IWAI, Y., “OM-704 A, a new antibiotic active against gram-positive bacteria produced by *Streptomyces* sp.”. *Journal of Antibiotics*, **35**: 1425, 1982.

VULPETTI, A. "Protein interactions with fluorine and other halogens". Disponível em:
http://www.soci.org/~media/Files/Conference%20Downloads/2013/Molecular%20Interactions%202013/Anna_Vulpetti.ashx

SAUER, S.; KLIEM, M. “Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria”. *Nature Reviews*, **8**: 74, 2010.

SHAW, E. I.; MOURA, H.; WOOLFITT, A. R.; OSPINA, M.; THOMPSON, H. A.; BARR, J. R. Identification of biomarkers of whole *Coxiella burnetii* phase I by MALDITOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **76**: 4017, 2004.

SILVA, J. V., Estudo de alterações metabólicas nos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2011. Dissertação de Mestrado.

SILVA, J. V.; FILL, T. P.; LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. & RODRIGUES-FO, E., “Biosynthesis of bromoroquefortines in a high saline medium by *Penicillium chrysogenum*, a terrestrial endophyte collected from *Coffea arabica*”. *Helvetica Chimica Acta*, 97 (10): 1345, 2014.

TURNER, W. B. “Commercially Important Secondary Metabolites” IN: Smith, J. E. & Berry, D. K.; “The Filamentous Fungi, Industrial Mycology”. Wiley 1: 1975, p. 122-142.

VAN PÉE, K.H., “Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria”, *Annual Review of Microbiology*, 50: 375, 1996.

- VAN PEE, K. H. & PATALLO, E. P., “Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. Applied Microbiology & Biotechnology, 70(6): 631, 2006.
- VARGHA, M.; TAKÁTS, Z.; KONOPKA, A. & NAKATSU, C.H., “Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates”, Journal of Microbiological Methods, 66(3): 399, 2006.
- VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJEN, R.; HOOPEN, H. J. G. & MEMELINK, J., “Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals”, Biotechnology Letters, 21 (6): 467, 1999.
- VOURNAKIS, J.N & ELANDER, R.P. “Genetic manipulation of antibiotic-producing microorganisms”. Science, 219(4585): 703, 1983.
- WEITCHOLD, V.; MILBREDT, D. & VAN-PÉE, K. H., “Specific enzymatic halogenations – from the discovery of halogenated enzymes to their applications in vitro and in”. Angewandte Chemie International Edition, **55**: 6374, 2016.
- WIEMANN, P & KELLER, N.P., “Strategies for mining fungal natural products” Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, **41**: 301, 2014.
- WIESNER, W.; VAN PEE, K. H. & LINGENS, F., “ Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrocinia*.” Journal of Biological Chemistry, 263(27): 13725, 1988.
- YAEGASHI, J.; OAKLEY, B.R. & WANG, C.C.C., “Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*”. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, **41**:433, 2014.
- XU, W.; GAVIA, D.J.; TANG, Y.. “Biosynthesis of fungal indole alkaloids”, Natural Products Report, 31: 1474, 2014.
- ZENG, J. & ZHAN, J., “Characterization of a tryptophan 6-halogenase from *Streptomyces toxytricini*”, Biotechnololy Letters, **33**: 1607, 2011.
- ZHELIFONOVA, V.P.; MAIER, A. & KOZLOVSKII, A.G., “Effect of various factors on the biosynthesis of piscarinines, secondary metabolites of the fungus *Penicillium piscarium* Westling”, Applied Biochemistry and, 44(6): 608, 2008.

ZHENER, S.; KOTZSCH, A.; SUSSMUTH, R. D.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. & VAN-PÉE, K. H., “A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-45D005”, *Chemistry & Biology*, **12**: 445, 2005.

ZHU, X.; DE LAURENTIS, W.; LEANG, K.; HERRMANN, J.; IHLEFELD, K.; VAN PÉE, K. H. & NAISMITH, J. H., “Structural insights into regioselective in the enzymatic chlorination of tryptophan”, *Journal of Molecular Biology*, **391**: 74, 2009.