

**RAFAEL CONRADO**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
PRODUZIDOS PELO FUNGO *Penicillium* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisa Tecnológica para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2022

**RAFAEL CONRADO**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
PRODUZIDOS PELO FUNGO *Penicillium* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisa Tecnológica para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Ana Olívia de Souza

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Conrado, Rafael  
AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Penicillium* sp. /  
Rafael Conrado; orientadora Ana Olívia De Souza. --  
São Paulo, 2022.  
61 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Penicillium maximae*. 2. Metabólitos  
Secundários. 3. Citotoxicidade. 4. Ação antifúngica.  
I. De Souza, Ana Olívia, orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rafael Conrado

Título da Dissertação: Avaliação da Ação Biológica de Metabólitos Secundários produzidos pelo fungo *Penicillium* sp.

Orientador: Ana Olívia de Souza

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **24/10/2022**, considerou o(a) candidato(a):

**(X) Aprovado(a)**                      (    ) Reprovado(a)

Examinador(a):      Assinatura:.....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:          Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

São Paulo, 29 de julho de 2021  
CEUax N [1934280619](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ana Olívia De Souza

Área: Biologia Molecular

Equipe envolvida: Rafael Conrado - [colaborador](#) (instituto Butantan); Ana Olívia De Souza (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da Ação Biológica de Metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Penicillium* sp".

**Parecer Consubstanciado da CEUA IB**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 07/08/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

- 1.** Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
- 2.** Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
- 3.** Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
- 4.** **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan


São Paulo, 2<sup>th</sup> August 2020**CERTIFIED**

We certify that the Research "EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTION OF SECONDARY METABOLITES PRODUCES BY THE FUNGUS *Penicillium* sp", protocol number CEUx 1934280619, under the responsibility Ana Olívia De Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute, and was approved in the meeting of day August 7, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado " Avaliação da Ação Biológica de Metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Penicillium* sp ", protocolado sob o CEUx nº 1934280619, sob a responsabilidade de Ana Olívia De Souza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, e foi aprovado na reunião de 7 de agosto de 2019.



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

*Aos meus pais, família e amigos  
por terem me apoiado em todos os momentos que precisei, e nos momentos  
que nem sabia que precisava, mas precisei. Amo vocês incondicionalmente.*

***Dedico com amor e carinho***

## AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a **Deus** por tudo, pelo dom da vida e por ser um guia em todos os momentos.

Aos meus pais, **Renato Conrado** e **Rosineia Sebastiana de Jesus Conrado**, por serem a minha base, pelo apoio incondicional, por todos os conselhos e por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a **Dra. Ana Olívia de Souza** pelas orientações durante a realização do mestrado, e por todas as oportunidades que me fizeram crescer como profissional.

Ao professor **Dr. Welington Luiz de Araújo** do Instituto de Ciências Biomédicas/USP pela doação dos fitopatógenos e das larvas de *Galleria Mallonella* utilizados neste estudo.

Agradeço a todos os **meus familiares** que durante toda a minha vida me deram o suporte e me incentivaram nas minhas conquistas profissionais e pessoais.

A minha amiga do laboratório de Desenvolvimento e inovação do **Instituto Butantan, Tainah Colombo Gomes**, por toda a ajuda, conselhos, risadas e suporte durante os experimentos, e em outras aventuras profissionais.

A todos **os meus amigos e colegas** do Laboratório de Desenvolvimento e inovação do Instituto Butantan.

Ao **Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan** pelo suporte nas análises de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Ao **Instituto de Ciências Biomédicas/USP** pelo suporte técnico.

Ao **Instituto Butantan** pelo acolhimento e suporte para desenvolvimento do projeto de mestrado.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**, da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisa Tecnológica por todo apoio durante esta caminhada.



## RESUMO

CONRADO, R. Avaliação da Ação Biológica de Metabólitos Secundários Produzidos pelo Fungo *Penicillium* sp. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Neste estudo, uma linhagem de fungo isolada do solo do bioma Caatinga foi identificada por análise da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) e da morfologia por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), como *Penicillium maximae*. Por ensaio de antagonismo em relação a diversos fitopatógenos, o *P. maximae* inibiu o crescimento de *Curvularia lunata*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium verticillioides*, e de *Fusarium vasinfectum*, *Fusarium subglutinans*, e de *Fusarium phaseoli*. Para a biossíntese de metabólitos secundários, o fungo *P. maximae* foi cultivado em meio líquido batata dextrose por 15 dias a 28 °C e 150 rpm, e do processamento do sobrenadante da cultura por extração em fase sólida com metanol obteve-se uma fração bruta (SPE100) que no fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) resultou em sete frações (F1-F7). No ensaio de ação antifúngica por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra os fitopatógenos acima descritos, as frações F1-F7 não foram efetivas até 500 µg/mL. No teste de citotoxicidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazol] em células tumorais de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231), de câncer de pâncreas (MIA-PaCa-2) e de melanoma humano (SKMELL-28), a fração F6 a 250 e 500 µg/mL inibiu o crescimento celular da linhagem MCF-7 em 66,6% e 72,2%, e a fração F7 a 125, 250 e 500 µg/mL em 64,1%; 81,4% e 70,5%, respectivamente. Nas células MIA-PaCa-2, a fração F6 inibiu 42,7% do crescimento celular, e a fração F7 64,3%, ambas as frações a 500 µg/mL. Até 500 µg/mL, essas frações não foram citotóxicas para fibroblastos normais HDFα, e a 1.000 µg/mL não foram tóxicas para larvas de *Galleria mellonella*, por até 120 horas. Os metabólitos secundários presentes nas frações F6 e F7 apresentam especificidade pelas células tumorais, e os dados são promissores para continuidade do estudo e purificação dos metabólitos secundários produzidos por esta espécie.

**Palavras chaves:** *Penicillium maximae*. Metabólitos secundários. Citotoxicidade. Ação antifúngica.

## ABSTRACT

CONRADO, R. Evaluation of the Biological Action of Secondary Metabolites Produced by the Fungus *Penicillium sp.* Masters thesis (Interunidades em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

In this study, a fungal strain isolated from the soil of the Caatinga biome was identified by the internal transcribed spacer (ITS) analysis of ribosomal DNA (rDNA) and morphology by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) as *Penicillium maximae*. Through antagonism assay against several phytopathogens the *P. maximae* inhibited the growth of *Curvularia lunata*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium verticillioides*, and *Fusarium vasinfectum*, *Fusarium subglutinans*, and *Fusarium phaseoli*. For the biosynthesis of secondary metabolites, the fungus *P. maximae* was cultivated in potato dextrose liquid medium for 15 days at 28 °C and 150 rpm. The processing of the culture supernatant by solid phase extraction with methanol, resulted in a crude fraction (SPE100) which through high performance liquid chromatography (HPLC/HPLC) fractionation resulted in seven fractions (F1-F7). By the minimum inhibitory concentration assay against the above-described phytopathogens, until 500 µg/mL the F1-F7 fractions did not showed antifungal activity. The cytotoxicity of the fractions F1-F7 was evaluated by using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazole bromide] test in human breast tumor cells (MCF-7 and MDA-MB -231), pancreatic cancer (MIA-PaCa-2) and human melanoma (SKMELL-28). The F6 fraction at 250 µg/mL inhibited the cell growth of MCF-7 by 66.6% and at 500 µg/mL 72.2%, and the F7 fraction at 125, 250 and 500 µg/mL in 64.1%; 81.4% and 70.5%, respectively. In MIA-PaCa-2 cell, the F6 fraction inhibited 42.7% of cell growth and the F7 fraction 64.3%, both fractions at 500 µg/mL. These fractions up to 500 µg/mL were not cytotoxic to normal HDFα fibroblasts, and at 1,000 µg/mL were not toxic to *Galleria mellonella* larvae until 120 hours. The secondary metabolites present in the F6 and F7 fractions present specificity for the tumor cells, and the results are promising for the continuity of the study and purification of the secondary metabolites produced by this species.

**Keywords:** *Penicillium maximae*. Secondary metabolites. Cytotoxicity. Antifungal action.