



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTO CITOTÓXICO DERIVADO DE EXTRATOS
FÚNGICOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS***

CAROLINA BALERA TROMBINI

Foz do Iguaçu
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTO CITOTÓXICO DERIVADO DE EXTRATOS
FÚNGICOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS***

CAROLINA BALERA TROMBINI

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Coorientador: Prof. Dr. Michel R. Z. Passarini

Foz do Iguaçu
2020

CAROLINA BALERA TROMBINI

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTO CITOTÓXICO DERIVADO DE EXTRATOS
FÚNGICOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

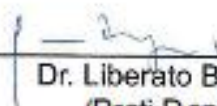
BANCA EXAMINADORA



Dr. Jorge Luis María Ruiz
Orientador
UNILA



Dr. Carlos Henrique Schneider
UNILA



Dr. Liberato Brum Junior
(Prati Donaduzzi)

Foz do Iguaçu, 22 de junho de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

T849b

Trombini, Carolina Balera.

Bioprospecção de composto citotóxico derivado de extratos fúngicos do gênero *aspergillus* / Carolina Balera Trombini. - Foz do Iguaçu, 2021.

64 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Dr. Jorge Luis María Ruiz.

Coorientador: Dr. Michel R. Z. Passarini.

1. Fungos. 2. *Aspergillus*. 3. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 4. Espectrometria de massa. I. Ruiz, Dr. Jorge Luis María. II. Passarini, Dr. Michel R. Z. III. Título.

CDU 582.28

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao orientador Jorge Ruiz, não somente pela orientação prestada, mas sobretudo pelos incentivos constantes, pela confiança no meu potencial como mestranda e pela disponibilidade que sempre demonstrou. Foram esses os impulsionadores que motivaram a conclusão deste projeto.

Ao coorientador, Doutor Michel Passarini, pelo tempo dedicado, auxiliando-me nas etapas laboratoriais e pela disponibilidade dos materiais microbiológicos para a pesquisa.

Ao grupo Prati-Donaduzzi que, além de ceder suas instalações e recursos para a realização de testes específicos em equipamentos de última geração, também apoiou ativamente a minha entrada e permanência no programa de mestrado.

Aos colegas do grupo Prati-Donaduzzi (Thiago Gutierrez, Wagner Favreto e Marcos) que me treinaram e auxiliaram no que era necessário para condução dos testes analíticos.

Agradeço também à minha família, ao meu namorado e aos meus amigos que, nos momentos mais difíceis, estavam presentes, incentivando-me a continuar e finalizar esta etapa.

TROMBINI, Carolina Balera. **BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTO CITOTÓXICO DERIVADO DE EXTRATOS FÚNGICOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS***. 64 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

A corrida para descoberta de fontes alternativas e mais sustentáveis para obtenção de antitumorais, como o ativo paclitaxel, é uma necessidade da indústria farmacêutica. Embora muitos esforços estejam sendo feitos nesse sentido, ainda não houve a disponibilização de fontes alternativas que não estejam relacionadas às plantas, as quais correspondem às atuais produtoras do composto paclitaxel. Estudos demonstram que fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* são capazes de sintetizar o composto citotóxico paclitaxel *in vitro*. Considerando que as descobertas recentes sugerem que o paclitaxel é um produto da existência e expressão de genes microbianos e que sua biossíntese não depende da planta hospedeira, podendo assim ser realizada por microrganismos não endofíticos, novos horizontes podem ser explorados. Desse modo, o presente projeto teve como objetivo principal realizar a bioprospecção deste composto citotóxico/antitumoral em fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, não endofíticos, isolados de efluentes industriais têxteis. Três fungos do gênero *Aspergillus* spp. (ITF-021; ITF-027; ITF-030) foram estudados. Todos os isolados apresentaram significativa atividade citotóxica na proliferação celular *in vitro* de células tumorais de pulmão H460. Extratos fúngicos dos isolados foram submetidos à análise por HPLC, bem como por HPLC-MS/MS. Foi possível demonstrar que os isolados fúngicos não sintetizaram o composto paclitaxel, entretanto foram capazes de sintetizar outra substância desconhecida com atividade citotóxica. Os resultados do presente estudo demonstram a necessidade de mais pesquisas para se compreender as vias da biossíntese do paclitaxel em fungos não endofíticos, para que assim seja possível afirmar que princípio ativo é um composto de origem microbiana e não de origem vegetal ou fruto da simbiose existente entre microrganismos e vegetais. Novos estudos podem ser realizados para caracterizar o composto ativo com propriedades citotóxicas contra células tumorais H460, o qual foi sintetizado pelos isolados, abrindo portas para a descoberta de um possível novo fármaco potencialmente aplicável na área médica ou de uma nova via de obtenção de outro composto antitumoral conhecido.

Palavras-chave: Bioprospecção. Antitumoral. Fungos. Citotoxicidade. Paclitaxel. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS).

TROMBINI, Carolina Balera. **BIOPROSPECCIÓN DE UN COMPUESTO CITOTÓXICO DERIVADO DE EXTRACTOS FÚNGICOS DEL GÉNERO ASPERGILLUS**. 64 páginas. Disertación de maestría del Programa de Postgrado en Biociencias - Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMEN

La carrera por descubrir fuentes alternativas y más sostenibles para obtener medicamentos antitumorales, como el paclitaxel activo, es una necesidad para la industria farmacéutica. Aunque se están haciendo muchos esfuerzos en esta dirección, todavía no se han puesto a disposición fuentes alternativas que no estén relacionadas con las plantas, que corresponden a los productores actuales del compuesto de paclitaxel. Los estudios demuestran que los hongos endofíticos del género *Aspergillus* son capaces de sintetizar el compuesto citotóxico paclitaxel *in vitro*. Teniendo en cuenta que los descubrimientos recientes sugieren que el paclitaxel es un producto de la existencia y expresión de genes microbianos y que su biosíntesis no depende de la planta huésped, por lo que puede ser llevado a cabo por microorganismos no endofíticos, se pueden explorar nuevos horizontes. De esta forma, el objetivo principal de este proyecto fue evaluar si los hongos filamentosos no endófitos del género *Aspergillus*, recolectados de ambientes impactados, son capaces de sintetizar el principio activo paclitaxel. Tres hongos de *Aspergillus* spp. (ITF-021; ITF-027; ITF-030) fueron estudiados. Todos los aislamientos mostraron actividad citotóxica significativa en la proliferación celular *in vitro* de células tumorales H460. Los extractos fúngicos de los aislados se sometieron a análisis por HPLC, así como por HPLC-MS/MS. Fue posible demostrar que los aislados fúngicos no sintetizaron el compuesto paclitaxel, sin embargo, fueron capaces de sintetizar otra sustancia desconocida con actividad citotóxica. Los resultados de este estudio demuestran la necesidad de más investigación para comprender las vías de la biosíntesis de paclitaxel en hongos no endofíticos, de modo que sea posible afirmar que el paclitaxel es un compuesto de origen microbiano y no de origen vegetal o el resultado de la simbiosis existente entre microorganismos y vegetales. Se pueden realizar nuevos estudios para caracterizar el compuesto activo con propiedades citotóxicas contra las células tumorales H460, que fue sintetizado por los aislamientos, abriendo puertas para el descubrimiento de un posible nuevo fármaco potencialmente aplicable en el campo médico o una nueva forma de obtener otro compuesto antitumoral conocido.

Palabras clave: Bioprospección. Antitumoral. Hongos. Citotoxicidad. Paclitaxel. Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC). Espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).

TROMBINI, Carolina Balera. **BIOPROSPECTION OF A CYTOTOTIC COMPOUND DERIVED FROM FUNGAL EXTRACTS OF THE ASPERGILLUS GENUS**. 64 pages. Master's thesis of the Graduate Program in Biosciences - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

The race to discover alternative and more sustainable sources for obtaining antitumor drugs, such as the active paclitaxel, is a necessity for the pharmaceutical industry. Although many efforts are being made in this regard, alternative sources that are not related to plants have not yet been made available, which correspond to the current producers of the paclitaxel compound. Studies show that endophytic fungi of the Aspergillus genus are able to synthesize the cytotoxic compound paclitaxel invitro. Considering that recent discoveries suggest that paclitaxel is a product of the existence and expression of microbial genes and that its biosynthesis does not depend on the host plant, thus being able to be carried out by non-endophytic microorganisms, new horizons can be explored. In this way, the main objective of this project was to evaluate whether non-endophytic filamentous fungi of the Aspergillus genus, collected from impacted environments, are capable of synthesizing the active principle paclitaxel. Three fungi of the Aspergillus spp. (ITF-021; ITF-027; ITF-030) were studied. All isolates showed significant cytotoxic activity in the in vitro cell proliferation of H460 tumor cells. Fungal extracts of the isolates were subjected to analysis by HPLC, as well as by HPLC-MS/MS. It was possible to demonstrate that the fungal isolates did not synthesize the compound paclitaxel, however they were able to synthesize another unknown substance with cytotoxic activity. The results of the present study demonstrate the need for further research to understand the pathways of paclitaxel biosynthesis in non-endophytic fungi, so that it is possible to state that paclitaxel is a compound of microbial origin and not of plant origin or the result of the symbiosis existing between microorganisms and vegetables. New studies can be carried out to characterize the active compound with cytotoxic properties against H460 tumor cells, which was synthesized by the isolates, opening doors for the discovery of a possible new drug potentially applicable in the medical field or a new way of obtaining another compound known anti-tumor.

Key words: *Bioprospecting. Antitumor. Fungi. Cytotoxicity. Paclitaxel. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS).*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química do paclitaxel.	23
Figura 2: Estrutura química dos precursores do paclitaxel.....	25
Figura 3: Semissíntese de paclitaxel a partir do precursor 10-desacetilbacatina III.	26
Figura 4: Via biossintética do paclitaxel.....	30
Figura 5: Esquema da obtenção do extrato fúngico.	36
Figura 6: Crescimento fúngico após 7 dias: meio Ágar Sabouraud-Dextrose 4%. ...	41
Figura 7: Morfologia padrão dos fungos <i>Aspergillus</i> spp.	42
Figura 8: Identificação morfológica do crescimento fúngico.	42
Figura 9: Crescimento fúngico após 21 dias: meio líquido de Batata-Dextrose.....	43
Figura 10: Extração do paclitaxel a partir do extrato microbiano líquido filtrado.....	43
Figura 11: Teste de viabilidade celular ITF-021: <i>Aspergillus</i> sp.	44
Figura 12: Teste de viabilidade celular ITF-027: <i>Aspergillus sydowii</i>	45
Figura 13: Teste de viabilidade celular ITF-030: <i>Aspergillus sydowii</i>	45
Figura 14: Cromatograma do Branco	46
Figura 15: Cromatograma da amostra padrão (paclitaxel).	46
Figura 16: Cromatograma da amostra teste ITF-021: <i>Aspergillus</i> sp.	46
Figura 17: Cromatograma da amostra teste ITF-027: <i>Aspergillus sydowii</i>	47
Figura 18: Cromatograma da amostra teste ITF-030: <i>Aspergillus sydowii</i>	47
Figura 19: Cromatograma das duplicatas das amostras teste.	48
Figura 20: Cromatograma comparativo das amostras: branco, padrão e testes.	48
Figura 21: Cromatogramas com os espectros de absorção dos principais picos.....	50
Figura 22: Cromatograma e espectro MS do padrão e da amostra teste ITF-030 em modo ESI positivo.	52
Figura 23: Cromatograma e espectro MS do padrão e da amostra teste ITF-030 em modo ESI negativo.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais biomoléculas produzidas por microrganismos	13
Tabela 2: Principais biomoléculas produzidas pelo gênero <i>Aspergillus</i>	22
Tabela 3: Enzimas relacionadas à biossíntese de paclitaxel.	29
Tabela 4: Descritivo dos fungos utilizados no projeto.	34
Tabela 5: Lista de parâmetros cromatográficos (HPLC).	39
Tabela 6: Lista de parâmetros cromatográficos (HPLC-MS/MS).	40
Tabela 7: Concentração do extrato fúngico para IC50.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Referencial teórico	12
1.1.1 Diversidade microbiana como fonte de biomoléculas	12
1.1.2 O papel dos fungos na produção de compostos ativos	15
1.1.3 Gênero <i>aspergillus</i> e seu potencial para produção de biomoléculas.....	19
1.1.4 Paclitaxel e a importância de descobertas de fontes alternativas	22
1.1.5 Paclitaxel e a biossíntese a partir de fungos	26
1.2 Justificativa.....	31
1.3 Pergunta norteadora e Hipótese	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 Geral.....	33
2.2 Específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Microrganismos	34
3.2 Identificação macro e microscópica dos isolados.....	34
3.3 Obtenção dos extratos fúngicos	35
3.4 Extração do composto ativo paclitaxel	35
3.5 Teste de citotoxicidade dos extratos fúngicos	37
3.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	38
3.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial.....	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Microrganismos, obtenção dos extratos fúngicos e extração do composto ativo	41
4.2 Teste de citotoxicidade dos extratos fúngicos	43
4.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	46
4.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial.....	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Diversidade microbiana como fontes de biomoléculas

As moléculas encontradas na natureza há tempos apresentam papel relevante para o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos, perfumes e outros bioprodutos, devido à diversidade estrutural e de funções orgânicas encontradas nas milhares de substâncias da biodiversidade terrestre. Esse reservatório químico conta com um imenso portfólio de estruturas complexas de moléculas que desempenham um papel fundamental na manutenção da vida de sua fonte de origem, seja ela uma planta ou um microrganismo, pois essas substâncias estão vinculadas aos processos biológicos de regulação celular, comunicação química e defesa (BOLZANI, 2016).

Cerca de 500.000 metabólitos secundários (também chamados de produtos naturais) foram descritos até o momento. Aproximadamente 100.000 deles são derivados de animais, 350.000 são de plantas e 70.000 são de microrganismos. Aproximadamente 33.500 metabólitos microbianos bioativos foram descritos. Destes, cerca de 12% (4.200) são metabólitos oriundos de bactérias incluindo as cianobactérias, 41% (13.700) são produtos de fermentações por actinomicetos e cerca de 47% (15.600) são de origem fúngica (BILLS; GLOER, 2016).

Os produtos naturais microbianos, seus derivados semissintéticos e seus análogos sintéticos são amplamente utilizados na medicina para o tratamento de uma variedade de distúrbios clínicos, como câncer, doenças cardíacas, diabetes, distúrbios neurológicos, inflamações, infecções, entre outros (BOLZANI, 2016).

Além do interesse da área farmacêutica, esses compostos também são utilizados no setor agrícola como herbicidas, inseticidas e fungicidas. Em vista disso, resulta em grande importante a busca por novas moléculas de origem microbiana que apresentem características aplicáveis. Estima-se que sem os pesticidas eficazes que existem hoje em dia aproximadamente um terço dos produtos agrícolas que atualmente são colhidos seriam perdidos. Além disso, com o aumento da resistência aos antibióticos, sem a descoberta desses novos fármacos, muitos

procedimentos cirúrgicos de rotina tornariam-se difíceis, se não impossíveis (RUTLEDGE; CHALLIS, 2015).

Dado o notável sucesso dos metabólitos microbianos como ponto de partida para o desenvolvimento de novas moléculas, ocorreu um significativo aumento do interesse na investigação dos metabólitos de diversos microrganismos nos últimos tempos (RUTLEDGE; CHALLIS, 2015).

De 1827 a 2013, 1.453 novas entidades moleculares foram aprovadas nos Estados Unidos da América pela *Food and Drug Administration* (FDA). Destas, cerca de 40% foram produtos naturais ou moléculas inspirados em produtos naturais com pequenas modificações estruturais (KATZ; BALTZ, 2016). Entre 2014 e 2018, o FDA aprovou 214 novas entidades moleculares (GRIESENAUER; KINCH, 2017; KINCH, 2015, 2016; KINCH; GRIESENAUER, 2018, 2019). Aproximadamente 60% dessas novas entidades moleculares aprovadas nos últimos anos são da classe de produtos naturais, e destes, 69% foram obtidos de microrganismos (PHAM *et al.*, 2019). Na Tabela 1, encontram-se descritas importantes biomoléculas que foram obtidas por meio de microrganismos.

Tabela 1: Principais biomoléculas produzidas por microrganismos

Aplicação	Tipo de organismo: composto em inglês (<i>nome do organismo produtor</i>)
Antibacteriano	<p>Actinomicetos: Actinorhodin (<i>Streptomyces coelicolor</i>); Albomycin (<i>Streptomyces</i> sp.); Amphomycin (<i>Streptomyces canus</i>); Apramycin (<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>); Dalbavancin (<i>Nonomuraea</i> sp.); Erythromycin (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>); Gentamicin (<i>Micromonospora purpurea</i>); Hygromycin (<i>Streptomyces hygrosopicus</i>); Josamycin (<i>Streptomyces narbonensis</i>); Kanamycin (or amikacin) (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>); Kirromycin (<i>Streptomyces collinus</i>); Lincomycin (or clindamycin) (<i>Streptomyces lincolnensis</i>); Fidaxomicin (<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>); Moenomycin (<i>Streptomyces ghanaensis</i>); Neomycin (<i>Streptomyces fradiae</i>); Oxytetracycline (<i>Streptomyces rimosus</i>); Phosphomycin (<i>Streptomyces wedmorensis</i>); Pristinamycin IA (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>); Pristinamycin IIA (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>); Ramoplanin (<i>Actinoplanes</i> sp.); Rifamycin (or rifampicin) (<i>Amycolatopsis mediterranei</i>); Ristocetin (<i>Amycolatopsis lurida</i>); Spectinomycin (<i>Streptomyces spectabilis</i>); Spiramycin (<i>Streptomyces ambofaciens</i>); Streptothricin (<i>Streptomyces</i> sp.); Teicoplanin (<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>); Tetracycline (<i>Streptomyces rimosus</i>); Thienamycin (<i>Streptomyces cattleya</i>); Thiostrepton (<i>Streptomyces azureus</i>); Tobramycin (<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>); Viomycin (<i>Streptomyces</i> sp.); Virginiamycin (<i>Streptomyces virginiae</i>); Carbomycin (<i>Streptomyces halstedii</i>); Cephamycin (<i>Streptomyces clavuligerus</i>); Chloramphenicol (<i>Streptomyces venezuelae</i>); Clorobiocin (<i>Streptomyces roseochromogenes</i>); Chloroeremomycin (<i>Amycolatopsis orientalis</i>); Clavulanic acid (<i>Streptomyces clavuligerus</i>); Coumermycin (<i>Streptomyces rishiriensis</i>); Daptomycin (<i>Streptomyces roseosporus</i>); Tunicamycin (<i>Streptomyces chartreusis</i>); Tylosin (<i>Streptomyces fradiae</i>); Undecylprodigiosin (<i>Streptomyces coelicolor</i>).</p> <p>Fungos: Cephalosporin (<i>Cephalosporium acremonium</i>); Fusidic acid (<i>Fusidium coccineum</i>); Penicillin (<i>Penicillium chrysogenum</i>); Pleuromutalin (<i>Clitopilus scyphoides</i>).</p> <p>Bacillus: Polymyxin (or colistin) (<i>Paenibacillus polymyxa</i>); Gramicidin S (<i>Bacillus subtilis</i>).</p>
Antitumoral	<p>Actinomicetos: Actinomycin (<i>Streptomyces anulatus</i>); Adriamycin (<i>Streptomyces peucetius</i>); Bleomycin (<i>Streptomyces verticillus</i>); Geldanamycin (<i>Streptomyces hygrosopicus</i>); Mithramycin (<i>Streptomyces plicatus</i>); Mitomycin C (<i>Streptomyces lavendulae</i>); Netropsin (<i>Streptomyces ambofaciens</i>); Rebeccamycin (<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>); Staurosporine (<i>Streptomyces staurosporeus</i>); Streptozotocin (<i>Streptomyces achromogenes</i>); Tetracenomycin (<i>Streptomyces glaucescens</i>); Daunorubicin (<i>Streptomyces peucetius</i>).</p> <p>Micobactéria: Epothilone (<i>Sorangium cellulosum</i>).</p>

Aplicação	Tipo de organismo: composto em inglês (<i>nome do organismo produtor</i>)
	Fungos: Paclitaxel (Vários fungos Endofíticos).
Antifúngico	Actinomicetos: Amphotericin B (<i>Streptomyces nodosus</i>); Candicidin (<i>Streptomyces</i> sp.); Filipin (<i>Streptomyces filipinensis</i>); Natamycin (<i>Streptomyces</i> sp.); Nikkomycin (<i>Streptomyces tendae</i>); Nystatin (<i>Streptomyces noursei</i>); Polyoxin (D) (<i>Streptomyces cacaoi</i>); Sinefungin (<i>Streptomyces griseolus</i>); Validamycin (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>). Fungos: Echinocandin (<i>Aspergillus nidulans</i>); Pneumocandin (<i>Glarea lozoyensis</i>).
Anticoccidianos	Actinomicetos: Lasalocid (<i>Streptomyces lasaliensis</i>); Monensin (<i>Streptomyces cinnamomensis</i>); Narasin (<i>Streptomyces aureofaciens</i>); Salinomycin (<i>Streptomyces albus</i>).
Imunomodulador	Actinomicetos: Ascomycin (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>); Rapamycin (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>); Tacrolimus (<i>Streptomyces tsukubaensis</i>). Fungos: Cyclosporin A (<i>Tolypocladium inflatum</i>); Mycophenolic acid (<i>Penicillium brevicompactum</i>).
Antituberculose	Actinomicetos: Capreomycin (<i>Saccharothrix mutabilis</i>); d-Cycloserine (<i>Streptomyces lavendulae</i>); Streptomycin (<i>Streptomyces griseus</i>).
Conservante	Lactobacilos: Nisin (<i>Lactococcus lactis</i>).
Ionóforo de cálcio	Actinomicetos: Calcimycin (<i>Streptomyces chartruensis</i>).
Antidiabético	Actinomicetos: Acarbose (<i>Actinoplanes</i> sp.).
Anti-helmíntico	Actinomicetos: Ivermectin (<i>Streptomyces avermitilis</i>).
Antiobesidade	Actinomicetos: Lipstatin (<i>Streptomyces toxytricini</i>).
Antiparasitário	Actinomicetos: Milbemycin (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>).
Cardiovascular	Fungos: Compactin (<i>Penicillium brevicompactum</i>); Ergometrine (<i>Claviceps purpurea</i>).
Herbicida	Actinomicetos: Bialphos (<i>Streptomyces viridochromogenes</i>).
Hipolipemiante	Fungos: Lovastatin (<i>Aspergillus terreus</i>);
Inseticida	Actinomicetos: Spinosyn (<i>Saccharopolyspora spinosa</i>).
Piscicida	Actinomicetos: Antimycin (<i>Streptomyces</i> sp.).
Surfactante	Bacilos: Surfactin (<i>Bacillus subtilis</i>).
Toxina	Actinomicetos: Oligomycin (<i>Streptomyces avermitilis</i>).
	83 % Actinomicetos
100 compostos	12 % Fungos
	3 % Bacilos
	1 % Micobactéria

Fonte: KATZ; BALTZ, 2016.

Como pode ser visualizado, as espécies do gênero *Streptomyces* spp. (família *Actinomycetaceae*) foram responsáveis pela síntese de muitos dos novos compostos aprovados pelo FDA, e seus metabólitos secundários constituem o princípio ativo de diversas classes de medicamentos. Porém, ao falar do universo de obtenção de metabólitos secundários de bactérias e fungos como fonte de novas moléculas ou fontes alternativas sustentáveis de moléculas já existentes, ainda há muito a ser explorado (KATZ; BALTZ, 2016).

No passado, a maioria dos compostos foram isolados de microrganismos terrestres, levando às aplicações que atualmente são conhecidas e que foram consideradas bem-sucedidas para as indústrias farmacêuticas e para a sociedade. Contudo, houve a expansão da pesquisa de novas fontes, que incluem ambientes marinhos (praias, águas costeiras e sedimentos do fundo dos oceanos), habitats incomuns ou extremos (alta ou baixa temperatura, pressão, nível de acidez ou alcalinidade e a presença de compostos considerados tóxicos, tais como metais

pesados, corantes e hidrocarbonetos aromáticos). Essas novas fontes, até o momento, não foram completamente exploradas e abrigam um abundante universo de microrganismos que podem dar origem a novos bioativos naturais (HUANG; LIN, 2017).

Portanto, acredita-se que amostragens amplamente expandidas do solo podem fornecer uma fonte inesgotável de novos microrganismos, somados aos avanços contínuos nas áreas da engenharia biológica/genômica e ao entendimento das bases moleculares da doença humana. Esse conjunto será a chave para a descoberta de novas moléculas com atividade biológica desejada para tratamento das doenças atuais. Com isso, é esperado que o papel que os microrganismos apresentam hoje na descoberta de novas moléculas seja muito mais representativo dentro de um futuro não muito distante (KATZ; BALTZ, 2016).

1.1.2 O papel dos fungos na produção de compostos ativos

Os fungos representam o maior grupo de organismos eucarióticos e sua diversidade varia de 500 mil a 9,9 milhões de espécies, abrangendo mais de 1 bilhão de anos de história evolutiva. Eles são abundantes em escala mundial devido ao seu pequeno tamanho e seus diversos habitats, tais como solo, matéria em decomposição e em simbiose com diversos tipos de algas, plantas e animais superiores. Esses organismos dominam a Terra em todos os ecossistemas, desde os polares aos temperados e tropicais (MOHANTA; BAE, 2015).

A utilização dos fungos na obtenção dos efeitos benéficos e maléficos que seus metabólitos podem originar vem sendo explorada pela humanidade desde o início da civilização humana. Existem registros da utilização de cogumelos comestíveis, venenosos e medicinais desde a pré-história. Os sumérios e egípcios dominavam as técnicas de utilização de leveduras selvagens, como a *Saccharomyces cerevisiae* e espécies relacionadas, para fabricar cerveja há centenas de anos. Os mesmos organismos também foram utilizados por milênios para preparar pão (KARWEHL; STADLER, 2016).

Há registros que demonstram a utilização de fungos para fins medicinais na China, por volta de 800 anos d.C. Nessa época, o arroz era cultivado juntamente com a levedura *Monascus purpurea*, a qual produz um composto farmacêutico ativo e que na época era considerado útil em várias atividades biológica,

inclusive no tratamento de doenças cardiovasculares. A análise química dos compostos ativos excretados por essa levedura foi feita no século XX e demonstrou que continha uma variedade de compostos orgânicos relacionados às estatinas, além da Compactin, também conhecida como Mevastatin®, a primeira estatina aprovada pelo FDA para uso clínico na redução de níveis de colesterol no sangue em pacientes (LANGDON; PEARCE, 2017).

Cumprе ressaltar que muitos fungos são fontes prolíficas de metabólitos secundários. Uma grande contribuição dos fungos para a saúde e o bem-estar das pessoas começou em 1928, quando Alexander Fleming descobriu em uma placa de Petri semeada com *Staphylococcus aureus* que um composto produzido por um microrganismo contaminante havia matado a bactéria. O microrganismo contaminante, *Penicillium notatum*, produziu um agente ativo chamado penicilina. A descoberta de Alexander Fleming criou um marco na indústria farmacêutica (DEMAIN, 2014).

A cefalosporina, um segundo membro da família de antibióticos beta-lactâmicos, foi descoberta a partir de um fungo, o *Cephalosporium* sp., o qual foi isolado na costa da Sardenha em 1948, encontrado em uma saída de esgoto pelo cientista italiano Giuseppe Brotzu. A cefalosporina natural nunca foi aplicada clinicamente, mas análogos foram sintetizados garantindo maior segurança e uma melhor atividade antibacteriana. Houve, assim, várias gerações de cefalosporinas, cada uma com atividades e aplicações aprimoradas (LANGDON; PEARCE, 2017).

As penicilinas e cefalosporinas representam os antimicrobianos mais utilizados no mundo: as cefalosporinas são responsáveis por 28% (US \$ 11,9 bilhões) e as penicilinas por 19% (US \$ 7,9 bilhões) do mercado global de antibióticos (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017).

Um terceiro antibiótico clinicamente importante produzido pelos fungos é o esteróide ácido fusídico. Esse composto é derivado do fungo *Fusidium coccineum* e foi desenvolvido no início da década de 1960. Foi introduzido clinicamente para o tratamento de infecções bacterianas Gram-positivas (LANGDON; PEARCE, 2017).

Além de compostos antibacterianos, existem vários antifúngicos derivados de metabólitos secundários de fungos, como a griseofulvina e a equinocandina, que são utilizadas para fins medicinais no tratamento de infecções fúngicas. Metabólitos secundários fúngicos também são receitados para o tratamento

do colesterol alto, pois atuam de forma semelhante às estatinas, impedindo a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese do colesterol. Essa classe de compostos inclui a lovastatina, que é principalmente produzido por *Aspergillus terreus* e a mevastatina encontrado em culturas de *Penicillium citrinum* (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017).

A ergotamina é um alcaloide vasoconstritor isolado a partir fungos da espécie de *Claviceps purpurea*. A ergotamina foi isolada pela primeira vez em 1918 por Arthur Stoll, na indústria farmacêutica Sandoz (atualmente pertencente ao grupo Novartis). O uso desse fungo para fins farmacológicos iniciou-se há muito tempo, no século XVI, quando era administrado com o intuito de acelerar o parto de gestantes. Atualmente, a ergotamina é associada à cafeína e comercializada para o tratamento de enxaquecas (LANGDON; PEARCE, 2017).

Alguns outros metabólitos secundários produzidos por fungos têm atividade imunossupressora, como a ciclosporina, produzida por *Tolypocladium niveum* e amplamente utilizada para evitar rejeição de órgãos nos transplantes (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017). Outros compostos fúngicos exibem atividades contra a esclerose múltipla, como é o caso do medicamento Fingolimode, aprovado pelo FDA em 2010. Este foi descoberto em uma pesquisa sobre os metabólitos secundários de fungos do filo *Ascomycota* (HYDE *et al.*, 2019).

Além de atividade com outros microrganismos, os metabólitos fúngicos também estão sendo investigados na atualidade visando à descoberta de novos princípios ativos antitumorais. O composto ativo Irofulven é um derivado semissintético de uma toxina natural isolada do fungo *Omphalotus illudens* (cogumelo Jack O'Lantern). O Irofulven interfere na replicação do DNA e induz a apoptose em doses nano molares, no entanto, sua citotoxicidade é mais especificamente direcionada contra células malignas, protegendo células normais. Seu mecanismo de ação ainda não foi determinado, mas a capacidade antitumoral do Irofulven foi avaliada em ensaios clínicos de fase I e II, demonstrando resultados promissores contra uma variedade de cânceres, incluindo cérebro, sistema nervoso, mama, sangue, cólon, sarcoma, próstata, pulmões, ovários e pâncreas (DASGUPTA; ACHARYA, 2019)

A afidicolina é um composto que foi originalmente isolado de "*Cephalosporium aphidicola*" (nome válido atualmente: *Akanthomyces muscarius*) e mais tarde também relatado com a *Nigrospora sphaerica*. A afidicolina compete com o local de ligação específico da DNA polimerase, interferindo na replicação. Seu

mecanismo de ação e eficácia tem sido intensivamente testado em ensaios, mas até o momento não foi divulgada aprovação para inserção na molécula no mercado (HYDE *et al.*, 2019).

Outros compostos antitumorais derivados de fungos incluem leptosinas, isoladas de *Leptoshaeria* sp.; β -glucanos e polissacarídeos naturalmente encontrados nas paredes celulares de fungos; bem como a palmarumycin, obtida de *Berkleasmium* sp e a spiropreussione A, isolada de *Preussia* sp. Os últimos compostos, no entanto, demonstraram apenas atividades *in vitro*, e não está claro se chegarão ao estágio de desenvolvimento posterior a estudos pré-clínicos (HYDE *et al.*, 2019).

Os fungos também fornecem outras moléculas com aplicações medicinais, como os agentes antioxidantes, medicamentos antivirais, antidiabético, medicamentos para tratar doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares (HYDE *et al.*, 2019; SCHUEFFLER; ANKE, 2014).

Essa variedade de metabólitos secundários obtidos por meio dos fungos, utilizados no desenvolvimento de novos compostos e capazes de tratar diversas doenças advém não somente da diversidade de espécies existente na classe fúngica, mas também devido ao fato de que os fungos modificam os genes que são expressos por meio de mecanismos de silenciamento ou ativação gênica, quando são desafiados, principalmente em ambientes complexos e/ou tóxicos. Assim, espécies encontradas em diferentes ambientes podem apresentar metabólitos secundários diferentes (MACHELEIDT *et al.*, 2016).

Vários são os estressores que alteram a expressão de genes que participam da síntese dos metabólitos secundários, sendo eles: outros microrganismos, privação\exposição a certos nutrientes, pH e temperatura, bem como compostos xenobióticos recalcitrantes. Nessas condições consideradas desafiadoras, como uma resposta fisiológica, eles produzem uma diversidade de metabólitos secundários, que podem não ser encontrados na mesma espécie em outros ambientes, ou mesmo em concentrações muito maiores (MACHELEIDT *et al.*, 2016).

Portanto, é provável que a produção desses metabólitos secundários tenha surgido e sido aprimorada ao longo dos anos, devido a adaptações evolutivas desses microrganismos nesses ecossistemas. Outro possível fator pode ter sido a necessidade de emitir sinais químicos para mediar a comunicação dentro de uma espécie ou entre comunidades microbianas distintas, com a finalidade de defender

seu habitat contra microrganismos competidores ou no intuito de inibir o crescimento de concorrentes que disputam por fontes nutricionais (BRAKHAGE, 2013).

Sendo assim, a busca por novos metabólitos secundários ativos advindos de fungos vem crescendo de forma rápida, pois há uma diversidade gigantesca de oportunidades e muitas estratégias diferentes para induzir a produção de novos compostos. Essas estratégias se baseiam em estudos, na tentativa de imitar o ambiente natural do fungo, alterando características abióticas, como pH, temperatura ou condições nutricionais, além da exposição a outros microrganismos que concorrem com o mesmo habitat. Outras abordagens mais elaboradas visam atingir diretamente os mecanismos reguladores, por meio de abordagens via técnicas moleculares (MACHELEIDT *et al.*, 2016).

Por isso, a taxa de descoberta de novos metabólitos fúngicos acelerou significativamente nas últimas duas décadas e aumentou substancialmente em relação à taxa de descoberta de compostos ativos dos actinomicetos, os quais tradicionalmente têm sido a fonte mais rica de produtos naturais microbianos e líder de aprovação de registros de novas moléculas pelo FDA (BILLS; GLOER, 2016).

1.1.3 Gênero *Aspergillus* e seu potencial para produção de biomoléculas

A descrição e a nomenclatura inicial do gênero *Aspergillus* foram creditadas a Micheli (1729), Haller (1768) e Fries (1832), que propuseram um nome genérico para um grupo de fungos com características morfológicas semelhantes. O exame microscópico revelava uma estrutura de suporte formada por hifas simples ou ramificadas de onde são originados os conídios, com morfologia semelhante a um aspersório (no inglês: *aspergillum*), objeto utilizado pelos sacerdotes em igrejas católicas para aspergir água benta (VADLAPUDI *et al.*, 2017).

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 350 espécies catalogadas de fungos filamentosos, exibindo uma grande variação no estilo de vida (habitat) e nas propriedades metabólicas (BRANDL; ANDERSEN, 2017; KOCSUBÉ *et al.*, 2016). Representa um dos gêneros de fungos mais comuns no ambiente, sendo fungos filamentosos onipresentes e cosmopolitas com impactos profundos em diferentes ecossistemas, bem como na saúde humana, animal e vegetal, e de alto interesse econômico (SOLTANI, 2016). As espécies de *Aspergillus* spp. prosperam como

endófitos, saprófitos, parasitas e também como patógenos humanos (VADLAPUDI *et al.*, 2017).

Entre os fungos com maior produção de metabólitos secundários estão as espécies de *Aspergillus* spp., capazes de causar efeitos prejudiciais como doenças em eucariontes superiores (*i.e.* seres humanos, animais e plantas), mas, muito além disso, são capazes de produzir um vasto número de compostos bioativos e benéficos para a saúde humana (SOLTANI, 2016).

Desde a divulgação dos três primeiros sequenciamentos completos de DNA, entre eles *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus fumigatus* (BRANDL; ANDERSEN, 2017) diversos outros genomas de diferentes espécies deste gênero foram sequenciados, como exemplo: *Aspergillus aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. sclerotialis*, *A. olivimuriae*, *A. sojae*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *A. welwitschiae* e *A. zonatus* (CROGNALE *et al.*, 2019; DE VRIES *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2019; QUINTANILHA-PEIXOTO *et al.*, 2019).

Esse grande conjunto de dados sequenciados facilitou a descoberta de genes relacionados à produção de produtos naturais, tornando-se, assim, uma ferramenta poderosa para prever e aumentar a produção de metabólitos específicos. Apesar do profundo conhecimento prévio sobre a diversidade metabólica dos *Aspergillus* spp., somente após esse estudo genômico constatou-se que havia muito mais genes ou vias biossintéticas relacionadas à produção de metabólitos secundários. Portanto, existe uma infinidade de produtos bioativos que ainda podem ser descobertos (SOLTANI, 2016).

Atualmente as espécies de *Aspergillus* spp. são conhecidas pela produção de vários compostos que são de interesse da indústria, dentre eles micotoxinas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários (VADLAPUDI *et al.*, 2017)

As principais micotoxinas conhecidas são: aflatoxina, ocratoxina, gliotoxina, fumagilina, ácido helvólico, fumitremorgin A e asp-hemolisina (AL-FAKIH; ALMAQTRI, 2019). A aflatoxina é a principal delas, encontrada pela primeira vez em 1961 em amostras de amendoim, conhecida pelo seu efeito hematotóxico é classificada como carcinogênica pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (SIDDIQUEE, 2018).

Assim como a aflatoxina, as demais micotoxinas podem causar efeitos tóxicos e graves em animais e seres humanos.(AL-FAKIH; ALMAQTRI, 2019).

Ácidos Orgânicos: o ácido cítrico é um ácido orgânico amplamente utilizado principalmente na indústria alimentícia. Diversas espécies de *Aspergillus* spp. são capazes de produzir ácido cítrico, dentre elas: *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. wentii* e *A. foetidus*. O ácido cítrico é amplamente utilizado para ajuste de pH, mas também como anticoagulante e antioxidante. Além do cítrico ácido, o ácido glucônico, ácido itacônico e ácido kójico são produzidos comercialmente das espécies de *Aspergillus* spp. O ácido glucônico é usado para terapia por deficiência de ferro e cálcio, sendo também um aditivo em algumas limpezas de metais, são produzidas por *A. niger*. Ácido itacônico (também conhecido como ácido metilenossuccínico) é produzido por *A. terreus* e *A. itaconicus*. O ácido itacônico é usado como comonômero na produção de acrilonitrila-butadieno-estireno (resina sintética termoplástica) e látex de acrilato (PARK *et al.*, 2017).

O ácido kójico é um ácido orgânico que inibe a formação de pigmentos nos tecidos de plantas e animais. Esse composto é aplicado no ramo alimentício para preservar as cores dos produtos e em cosméticos como um agente clareador da pele. O ácido kójico é produzido principalmente pelas espécies de *Aspergillus arachidicola*, *A. bombycis*, *A. caelatus*, *A. flavus*, *A. lanosus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. sojae* e *A. tamarii* (SIDDIQUEE, 2018).

Existe uma diversidade de compostos do metabolismo secundário desse gênero de fungos que estão sendo explorados pela indústria farmacêutica, devido às suas propriedades farmacológicas (PHAM *et al.*, 2019). Na Tabela 2 estão descritos alguns exemplos:

Tabela 2: Principais biomoléculas produzidas pelo gênero *Aspergillus*.

Composto (inglês)	Uso	Organismo produtor
Echinocandin	Antifúngico	<i>Aspergillus nidulans</i>
Lovastatin	Hipolipemiante	<i>Aspergillus terreus</i>
Terrein	Inibidor da Melanogenesis	<i>Aspergillus terreus</i>
Cyclosporine A	Imunossupressor	<i>Aspergillus terreus</i>
Asperfuranone	Antitumoral	<i>Aspergillus terreus</i> ; <i>Aspergillus nidulans</i>
Pyripyropene	Hipolipemiante	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Penicillin	Antibacteriano	<i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Aspergillus nidulans</i>
Fumagillin	Antimicrobiano	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Fumitremorgin C	Antitumoral	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Spirotryprostatins	Antitumoral	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Plinabulin	Antitumoral e Antimicrobiano	<i>Aspergillus ustus</i>
Phenylahistin	Antitumoral	<i>Aspergillus ustus</i>
Stephacidin A & B	Antitumoral	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Asperphenamate	Antitumoral	<i>Aspergillus flavus</i>
Asperlicin	Antagonista da colestistoquinina	<i>Aspergillus alliaceus</i>

Fonte: PARK *et al.*, 2017.

Além dos compostos acima citados, existem muitos outros sendo pesquisados e que já demonstraram resultados promissores, podendo ser assim considerados uma alternativa terapêutica e, conseqüentemente, um novo produto para indústria farmacêutica. Seguem alguns exemplos: (i) antifúngicos: 3'(3-metilbutil)-butirolactona II; (ii) antivirais: aspergillipeptídeos e asteltoxinas; (iii) antiprotozoários: (22E,24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3- β -ol e estigmast4-eno-3-ona; (iv) antioxidantes: 2-hidroxycircumdatina C; (v) antidiabéticos: isoaspulvinona E e aspulvinona E; (vi) antitumorais: [4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] (1-metil-1H-indol-3-il)-metanona. Todos são metabólitos secundários do gênero *Aspergillus* (AL-FAKIH; ALMAQTRI, 2019).

Como pode ser constatado, as espécies de *Aspergillus* são excelentes produtores de um grande número de metabólitos secundários (SIDDIQUEE, 2018). De acordo com Zhang, Li and Gao (2018), desde 2015 cerca de 315 novos metabólitos secundários originados de isolados fúngicos do gênero *Aspergillus* foram relatados, introduzindo, assim, estruturas químicas exclusivas para o mercado, as quais exibem excelente bioatividade e demonstram o potencial terapêutico desse gênero (ZHANG; LI; GAO, 2018).

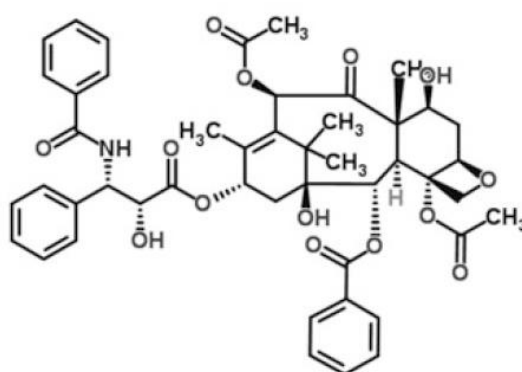
Atualmente, espera-se que vários novos metabólitos secundários sejam descobertos a partir do gênero *Aspergillus*. Os objetivos mais desafiadores em relação aos metabólitos secundários estão relacionados à elucidação de quais são as condições fisiológicas e ecológicas que levam à ativação de genes específicos associados à transcrição e tradução dos diversos metabolismos secundários que uma espécie é capaz de produzir (SIDDIQUEE, 2018).

1.1.4 Paclitaxel e a importância de descobertas de fontes alternativas

O medicamento paclitaxel ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) é o menos tóxico e mais eficiente quimioterápico antitumoral de amplo espectro da atualidade (EL-SAYED *et al.*, 2020). Seu mecanismo de ação baseia-se na promoção de estabilidade dos microtúbulos, estruturas que consistem em subunidades repetidas de heterodímeros de α / β -tubulina. Durante a prófase, os microtúbulos formam um eixo para puxar os cromossomos em direção aos pólos. Nos estágios posteriores, despolimerizam, ocorrendo à dissolução da estrutura do eixo. A exposição a temperaturas frias e a exposição a íons cálcio desencadeiam a despolimerização dos microtúbulos. O paclitaxel se liga e estabiliza os microtúbulos, e os microtúbulos ligados ao paclitaxel resistem à despolimerização, mesmo após tratamento a baixas temperaturas ou com íons cálcio. Portanto, o tratamento com paclitaxel promove a polimerização da tubulina o que bloqueia a progressão da mitose (ZHU; CHEN, 2019).

Descoberto em 1967 por Monrie Wall e Mansukh Wani, o composto ativo paclitaxel foi isolado da parte interna das cascas de árvores da espécie *Taxus brevifolia*. O grupo de pesquisadores do departamento de Agricultura dos EUA estava, desde 1962, testando extratos de cascas de árvores do Pacífico para encontrar um novo medicamento antitumoral. Ao testar o extrato das cascas de árvores do gênero *T. brevifolia*, verificou-se importante atividade citotóxica (AGLAWÉ *et al.*, 2019). Após quase uma década de pesquisas, em 1971 sua estrutura química foi publicada (Figura 1) e em 1979 o mecanismo de ação deste composto ativo foi elucidado (AGLAWÉ *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017).

Figura 1: Estrutura química do paclitaxel.



Fonte: KUNDU; JHA; GHOSH, 2016.

Um dos maiores obstáculos enfrentados durante a fase de pesquisa e durante os ensaios clínicos foi a produção da matéria-prima de paclitaxel puro (UZMA *et al.*, 2018). A extração de paclitaxel diretamente das árvores de *T. brevifolia* é considerada a forma menos eficiente de obtenção do ativo e limitou o desenvolvimento do produto em sua fase inicial em mais de 20 anos (AGLAWE *et al.*, 2019). Isso ocorre, pois para produzir a quantidade do produto para o tratamento de um paciente eram necessárias seis árvores de *T. brevifolia* com idade média de 100 anos. Em outras palavras, a concentração encontrada de paclitaxel no peso seco de árvores adultas de *T. brevifolia* é de 0,01 a 0,03% (UZMA *et al.*, 2018).

Dessa forma, para os ensaios clínicos do paclitaxel foram necessários cerca de 27.000 kg de casca de árvores adultas, o que significa que essa etapa de desenvolvimento exigiu 9.000 árvores. Nesta época, as árvores de *T. brevifolia* tornaram-se ameaçadas de extinção, no entanto, isso não foi impeditivo para finalizar os ensaios clínicos, devido aos excelentes resultados que o medicamento apresentava experimentalmente (ISAH, 2015). Devido a essa dificuldade, o tempo entre a pesquisa/desenvolvimento e a aprovação do produto para comercialização era consideravelmente elevado (UZMA *et al.*, 2018).

Em 1992, após aproximadamente 30 anos desde o início das pesquisas para descoberta do paclitaxel, o Taxol[®] (marca registrada do medicamento referência de paclitaxel), produzido pela Bristol-Myers-Squibb, foi aprovado para o tratamento para o câncer de ovário pelo FDA e, desde então, o seu uso terapêutico foi expandido para o tratamento de diversos tipos de câncer, como bexiga, pulmão, próstata, mama, cabeça, pescoço e sarcoma de Kaposi. Além do uso para tratamento do câncer, o medicamento também demonstrou resultados promissores contra outras enfermidades, como no tratamento de doenças renais policísticas, doenças neurodegenerativas (Alzheimer ou Parkinson) e na prevenção da reestenose (estreitamento de um vaso sanguíneo) (EL-SAYED *et al.*, 2019; GARYALI *et al.*, 2019).

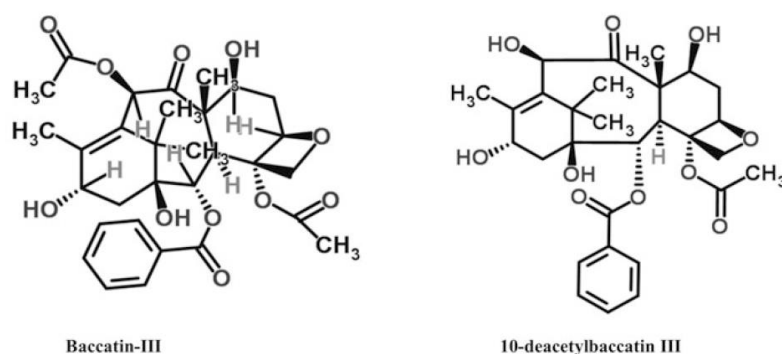
No entanto, devido a essa restrição de disponibilidade do composto ativo, os pesquisadores interessados no projeto continuaram a buscar fontes alternativas e mais rentáveis de obtenção do composto ativo paclitaxel. Os esforços resultaram no isolamento da 10-desacetilbacatina III (precursor da síntese do paclitaxel) a partir de *Taxus baccata* (árvore europeia). Essa espécie de árvore era mais abundante e apresentava maior concentração de 10-desacetil-bacatina III (0,1%

do peso seco) do que as encontradas de paclitaxel na *T. brevifolia* (de 0,01 a 0,03% do peso seco) (LIU; GONG; ZHU, 2016; UZMA *et al.*, 2018).

O paclitaxel pode ser extraído de mais de 500 diferentes espécies e variedades de *Taxus* spp. e de diversas outras árvores que não são desse gênero, como por exemplo de árvores *Podocarpus gracilor* e *Corylus avellana*. No entanto, as concentrações de paclitaxel nessas árvores são muito baixas (NAIK, 2018).

Atualmente, o paclitaxel que é comercializado e utilizado pela indústria farmacêutica advém desta rota semissintética similar a que foi descoberta em 1994 pela Bristol-Myers-Squibb. Como material de partida há os precursores 10-desacetilbacatina III e bacatina III (Figura 2), extraídos das árvores de *Taxus baccata*, que após algumas etapas para modificações estruturais podem ser convertidos em paclitaxel puro (LIU; GONG; ZHU, 2016).

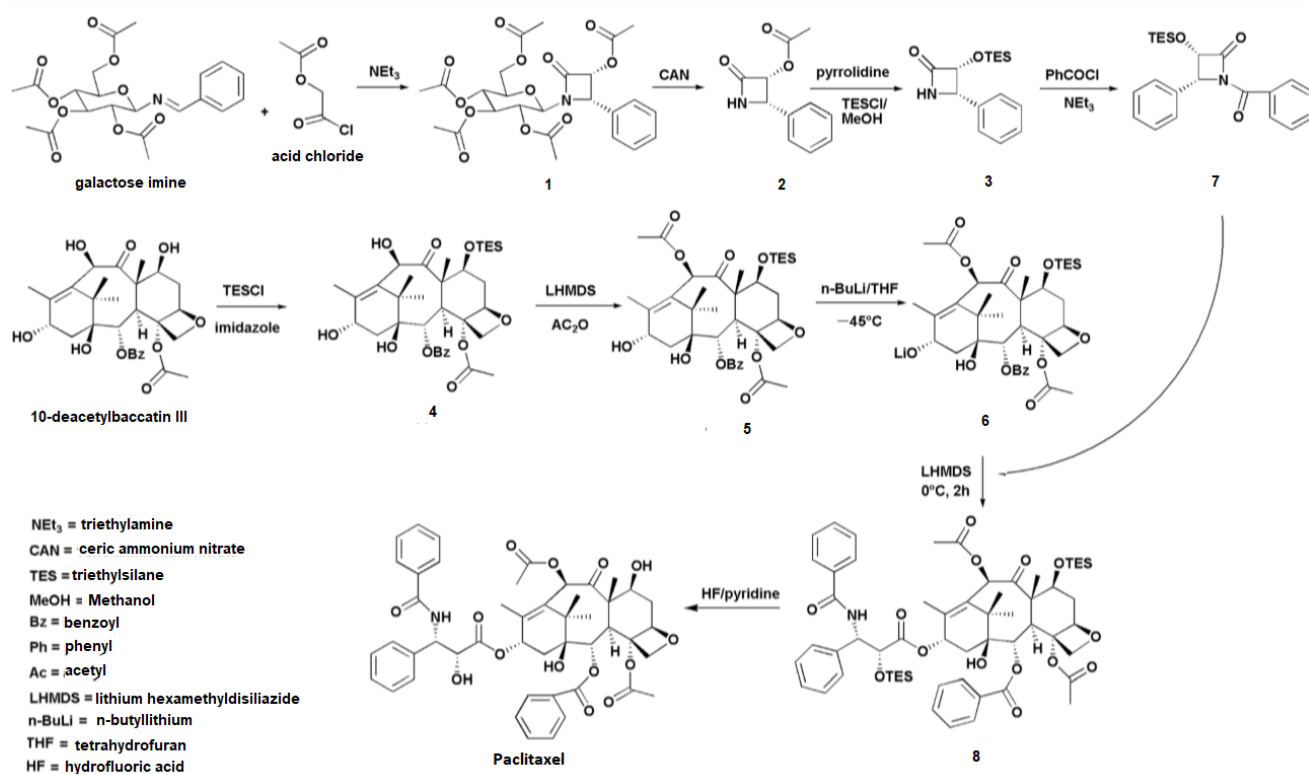
Figura 2: Estrutura química dos precursores do paclitaxel: bacatina III e 10-desacetilbacatina III.



Fonte: KUNDU; JHA; GHOSH, 2016.

Na Figura 3, encontra-se uma exemplificação das etapas para semissíntese de paclitaxel a partir do precursor 10-desacetilbacatina III. Como pode ser visualizado, são muitas enzimas e compostos auxiliares envolvidos e, após 8 principais etapas de transformação, o precursor 10-desacetilbacatina III é convertido em paclitaxel (LIU; GONG; ZHU, 2016).

Figura 3: Semissíntese de paclitaxel a partir do precursor 10-desacetilbacatina III.



Fonte: LIU; GONG; ZHU, 2016.

A heterogeneidade do rendimento do precursor 10-desacetilbacatina III extraído das árvores é o atual limitante do processo de obtenção do paclitaxel, devido às condições ecológicas intrínsecas da *T. baccata*, necessidade de ampla área de cultivo e alto tempo de espera para derrubada das árvores, (EL-SAYED *et al.*, 2019). Porém, mesmo com todos os limitantes do processo semissintético, esse ainda é o mais viável para a obtenção do paclitaxel destinado à indústria farmacêutica. Por apresentar estrutura química complexa, a síntese química completa deste composto ativo é dispendiosa. O processo de obtenção é lento (40 etapas), com condições de reações extremamente difíceis de controlar e grandes quantidades de produtos tóxicos. O rendimento final é muito baixo e, conseqüentemente, esse processo apresenta alto custo de produção. Por isso, a síntese química completa do paclitaxel é considerada inviável tanto técnica quanto financeiramente (ZHU; CHEN, 2019).

Alega-se que o paclitaxel foi o medicamento contra câncer mais vendido no mundo até o momento. Se considerarmos o mercado do medicamento referência Taxol[®] no período final da proteção patentária, em 2005, o faturamento anual da Bristol- Myers-Squibb com esse único produto foi de mais de 1,6 bilhões de

dólares (UZMA *et al.*, 2018). Embora exista uma diminuição nos números de mercado do Taxol® nos últimos anos, isso não pode ser considerado para afirmar que houve uma queda na venda do paclitaxel, pois, com o vencimento da patente do Taxol®, aconteceu um aumento na venda de genéricos e outras marcas concorrentes que utilizam o princípio ativo paclitaxel e seus compostos derivados na formulação, que por si só geraram receita superior a 6 bilhões de dólares em 2016 (MCELROY; JENNEWEIN, 2018). Estima-se que, desde então, esse mercado global tenha um aumento aproximado de 10% ao ano (EL-SAYED *et al.*, 2019).

A segurança, eficácia e, conseqüentemente, o aumento da demanda do paclitaxel reforçam a necessidade de desenvolvimento e viabilização de abordagens mais eficientes e sustentáveis para obtenção do princípio ativo em questão (UZMA *et al.*, 2018). Na abordagem atual, para tratamento de 500 pacientes, é necessário 1 kg do medicamento que requer aproximadamente 10 toneladas de casca ou 300 árvores. Portanto, a demanda do medicamento excede sua oferta através das fontes naturais (EL-SAYED *et al.*, 2020).

Nesse sentido, a indústria biotecnológica pode fornecer uma alternativa prática e sustentável para a obtenção do composto ativo paclitaxel (MCELROY; JENNEWEIN, 2018).

1.1.5 Paclitaxel e a biossíntese a partir de fungos

Endófitos são organismos que passam seu ciclo de vida colonizando inter e/ou intracelularmente tecidos internos de plantas hospedeiras sem causar danos aparentes ao hospedeiro, sendo assim considerados organismos simbiotes (NAIK, 2018).

Esses endófitos são considerados componentes importantes dos microecossistemas vegetais, pois influenciam na distribuição, ecologia, fisiologia e bioquímica das plantas hospedeiras e produzem vários compostos bioativos para beneficiar o crescimento da planta. Alguns fungos endofíticos desenvolveram o potencial de produzir compostos bioativos iguais ou semelhantes aos gerados a partir das plantas hospedeiras e desenvolveram uma abordagem substituível para sintetizar eficientemente esses compostos bioativos escassos e valiosos (GARYALI *et al.*, 2019).

A produção desses compostos bioativos por fungos endolíticos acontece pela colonização simbiótica, ou seja, esses fungos passam a sintetizar certos compostos para os vegetais que os hospedam, visando auxiliar nas atividades de crescimento e defesa dessas plantas (NAIK, 2018).

A investigação de fúngicos endofíticos que habitam plantas produtoras de paclitaxel, considerando que poderia haver uma produção do princípio ativo paclitaxel independentemente de sua fonte vegetal, aumentou as esperanças para a descoberta de uma via mais sustentável para obtenção comercial de paclitaxel (EL-SAYED *et al.*, 2019).

Em 1993, Stierle e Strobel foram um dos primeiros a isolar a *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico obtido a partir da árvore *Taxus chinensis*, e confirmaram por espectrometria de massa, cromatografia e imunoquímica que este fungo produzia paclitaxel. Eles extraíram o princípio ativo sob condições de cultivo *in vitro*, mas o rendimento era muito baixo (24–50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em 2003, Chen também isolou várias cepas de fungos endofíticos que colonizavam a casca interna e ramos de *Taxus yunnanensis*. Das 52 cepas de fungos endofíticos que foram isoladas, confirmou-se por análise de cromatografia líquida que 19 linhagens foram capazes de produzir paclitaxel, entretanto com um rendimento baixo (ZHU; CHEN, 2019).

Desde então, vários estudos confirmam que os fungos endofíticos encontrados em *Taxus* spp. podem ser considerados uma potencial fonte para a produção de paclitaxel (EL-SAYED *et al.*, 2019). Atualmente, cerca de 200 fungos endofíticos pertencentes a mais de 40 gêneros de fungos de várias ordens diferentes foram relatados como produtores de paclitaxel (NAIK, 2018).

O gênero *Aspergillus* está entre esses 40 gêneros de fungos endofíticos que produzem o paclitaxel. Como exemplo estão as linhagens de *Aspergillus fumigatus*, extraídos de árvores da espécie *Podocarpus* sp. que demonstraram produção *in vitro* de paclitaxel na concentração de 557,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MOHINUDEEN; DEVAN; SRIVASTAVA, 2019).

De acordo com a literatura, outras espécies do mesmo gênero também já demonstraram produção de paclitaxel. Uma linhagem de *Aspergillus terreus*, extraído de árvores *Podocarpus gracillior*, demonstrou produção de paclitaxel na concentração de 432 $\mu\text{g L}^{-1}$ (EL-SAYED *et al.*, 2018). De acordo com Uzma *et al.* (2018), um isolado da espécie *Aspergillus aculeatinus*, extraído de árvores de *Taxus chinensis*, foi capaz de produzir o composto paclitaxel na concentração de 334,9 μg

L⁻¹. Da mesma forma, a espécie *Aspergillus niger*, extraído de árvores da espécie *Taxus cuspidata*, produziu o composto paclitaxel na concentração de 273,4 µg L⁻¹ (GARYALI *et al.*, 2019). Bem como, *Aspergillus candidus*, extraído de árvores *Taxus media*, e *Aspergillus oryzae*, extraído da planta *Tarennia asiática*, foram capazes de produzir paclitaxel nas concentrações de 112,0 µg L⁻¹ (NAIK, 2018) e 95,04 µg L⁻¹ (SURESH *et al.*, 2020), respectivamente.

Embora a tecnologia endofítica de biossíntese de paclitaxel já esteja demonstrando ser mais eficiente, com rendimento de até 846 µg/L⁻¹ de paclitaxel obtido (ZHU; CHEN, 2019), nenhuma dessas descobertas foi traduzida com sucesso em bioprocessos industriais até o momento. A perda de produção após ciclos repetidos de cultivo abre um questionamento sobre a capacidade de produção de paclitaxel ou das enzimas que estão envolvidas no ciclo de produção do composto ativo por fungos endofíticos, quando não estão colonizando suas plantas hospedeiras (NAIK, 2018).

Por outro lado, estudos recentes sugerem que o paclitaxel é um composto de origem microbiana (AGEITOS; GARCIA-FLUENTES, 2019; EL-SAYED; AHMED; AL-HAGAR, 2020; ISMAIEL *et al.*, 2017). A literatura afirma a existência de genes microbianos que codificam enzimas envolvidas no ciclo de biossíntese de paclitaxel, como exemplo as enzimas taxadieno sintase (TS), 10-deacetylbaaccatin-III-10-O-acetyltransferase (DBAT) e baaccatin-III-aminophenylpropanoyl-13-O-transferase (BAPT) (VASUNDHARA; KUMAR; REDDY, 2016). Assim, sugere-se que a existência e expressão desses genes em diversos fungos sejam os responsáveis pela capacidade de produção de paclitaxel (GARYALI *et al.*, 2019).

A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de fungos endofíticos que produzem as enzimas envolvidas na completa biossíntese de paclitaxel.

Tabela 3: Enzimas presentes em espécies fúngicas endofíticas e relacionadas à biossíntese de paclitaxel.

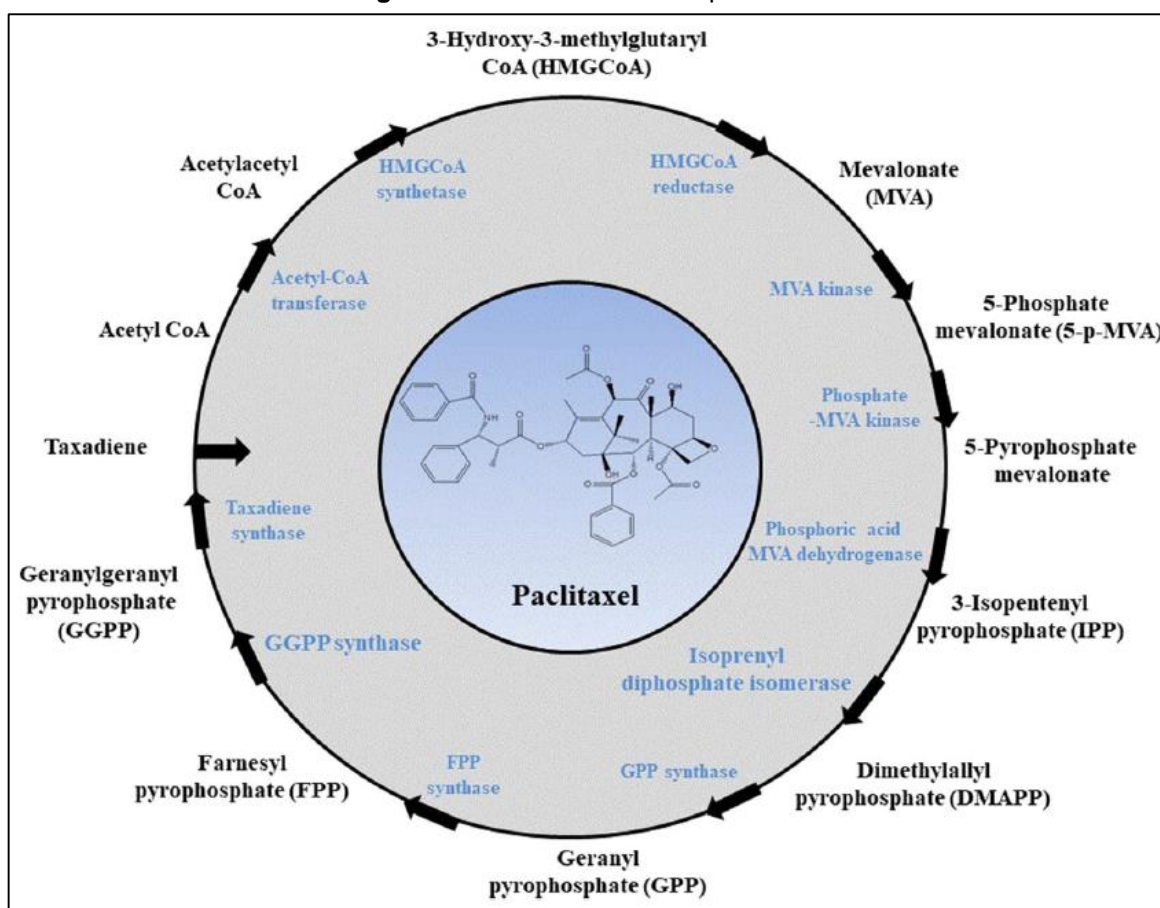
Fungo endofítico	Vegetal de origem
ENZIMA: TAXADIENE SYNTHASE	
<i>Mucor rouxianus</i>	<i>Taxus chinensis</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>
<i>Gibberella intermedia</i>	<i>Taxus x media</i>
ENZIMA: 10-DEACETYLBACCATINIII-10-O-ACETYLTRANSFERASE	
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	<i>Taxus x media</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>

Fungo endofítico	Vegetal de origem
<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Taxus x media</i>
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Sara caasoca</i>
BACCATIN III AMINOPHENYLPROPANOYL-13-O-TRANSFERASE	
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Taxus x media</i>
<i>Guignardia mangifera</i>	<i>Taxus x media</i>
<i>Fusarium redolens</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Microdiploidia sp.</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Taxus cuspidate</i>

Fonte: VASUNDHARA; KUMAR; REDDY, 2016.

De acordo com a literatura, acredita-se que uma das vias de produção de paclitaxel por fungos filamentosos seja realizada conforme o exposto na Figura 4:

Figura 4: Via biossintética do paclitaxel.



Fonte: ZHU; CHEN, 2019.

Mesmo havendo a sugestão de via para a biossíntese de paclitaxel em fungos, há uma complexidade para entender o motivo pelo qual certos fungos

sintetizam o paclitaxel e outros não. Isso se deve ao fato de que o caminho de síntese do paclitaxel, embora muito estudado, ainda não é bem compreendido e são necessárias mais pesquisas para caracterizá-lo e descrevê-lo completamente (ZHU; CHEN, 2019).

1.2 Justificativa

Conforme demonstrado, a corrida para descoberta de fontes alternativas e mais sustentáveis para obtenção do composto antitumoral paclitaxel é uma necessidade da indústria farmacêutica desde a descoberta deste insumo ativo.

Embora muitos esforços estejam sendo feitos neste sentido, ainda não houve a disponibilização de fontes alternativas que não estejam relacionadas às plantas produtoras de paclitaxel.

As atuais fontes biológicas de obtenção do composto ativo também estão correlacionadas com as plantas que produzem o paclitaxel, uma vez que na literatura atual há a comprovação de síntese do composto ativo em questão por microrganismos do tipo endofíticos.

Porém, considerando que as descobertas recentes sugerem que o paclitaxel é um produto da expressão de genes microbiano relacionados à biossíntese do princípio ativo, e que sua síntese não depende da planta hospedeira, novos horizontes podem ser explorados.

Com o objetivo principal de realizar a bioprospecção deste composto citotóxico/antitumoral em fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, não endofíticos, isolados de efluentes industriais têxteis e que foram adaptados às condições desfavoráveis de seu ambiente, o presente projeto foi idealizado e conduzido.

1.3 Pergunta norteadora e Hipótese

Fungos do gênero *Aspergillus*, não endofíticos, obtidos de ambientes impactados podem produzir metabólitos secundários citotóxicos e o composto ativo responsável pela citotoxicidade é o quimioterápico paclitaxel?

Hipóteses:

1. Os ambientes impactados, por meio de disponibilização de agentes estressores (moléculas complexas como hidrocarbonetos e corantes), podem adaptar diferentes espécies de *Aspergillus* spp. para produção de compostos citotóxicos/antitumorais.
 - a. O composto ativo responsável pela citotoxicidade *in vitro* dos extratos fúngicos é o paclitaxel.
 - b. O composto ativo responsável pela citotoxicidade *in vitro* dos extratos fúngicos não é o paclitaxel.
2. Espécies *Aspergillus* spp. isoladas de ambientes impactados podem não apresentar atividade citotóxica, demonstrando assim que os agentes estressores de seu ambiente de origem não foram capazes de adaptar esses fungos para síntese de metabólitos secundários citotóxicos/antitumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, não endofíticos e que foram isolados de ambientes impactados, para a biossíntese de metabólitos secundários citotóxicos. Verificar se metabólito ativo responsável pela citotoxicidade é a substância paclitaxel.

2.2 Objetivos específicos

1) Produzir extratos fúngicos a partir de *Aspergillus* spp. obtidos de ambientes impactados;

2) Avaliar a citotoxicidade dos extratos fúngicos do gênero *Aspergillus* em células cancerígenas H460;

3) Utilizar técnicas de extração e identificação do composto antitumoral paclitaxel para análise dos extratos fúngicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);

4) Submeter à análise de Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS) as amostras que tiverem confirmação de presença de paclitaxel no teste cromatográfico de HPLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os três fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* utilizados no presente trabalho foram isolados a partir de uma amostra de estação de tratamento de efluente têxtil no âmbito do projeto: “Bioprospecção de resíduos da Indústria Têxtil: avaliação do potencial biotecnológico para área ambiental e da saúde”, coordenado pelo Prof. Dr. Michel R. Z. Passarini, em desenvolvimento na Unila. Os isolados estão preservados em glicerol (20%) a -80 °C, estando disponíveis no banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Unila.

Os fungos selecionados, ITF-027 e ITF-030, foram identificados por técnicas moleculares na Divisão de Recursos Microbianos (DRM), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) de acordo com o projeto de Mestrado realizado na Unila “Avaliação do Potencial Biotecnológico de Bactérias e Fungos Isolados de uma Estação de Tratamento de Indústria Têxtil”. O fungo ITF-021 foi identificado por microscopia convencional pelo atual projeto. Na Tabela 4 encontra-se o descritivo dos fungos utilizados neste projeto.

Tabela 4: Descritivo dos fungos utilizados no projeto.

Código	Fungo	Descritivo
ITF-021	<i>Aspergillus</i> sp.	Identificação por microscopia convencional
ITF-027	<i>Aspergillus sydowii</i>	Identificação por sequenciamento de DNA
ITF-030	<i>Aspergillus sydowii</i>	Identificação por sequenciamento de DNA

Fonte: elaboração própria, 2020.

A reativação dos isolados foi realizada em meio de cultivo Ágar Sabouraud-dextrose 4% (ASD) que, em sua composição, contém: dextrose 40,0 g, peptonas 10,0 g, ágar 15,0 g e água purificada 1.000 mL. em pH 5,6 ± 0,2). As placas foram incubadas por 7 dias à temperatura de 22,5 °C ± 2,5 °C, conforme o Volume I da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (BRASIL, 2019).

3.2 Identificação macro e microscópica dos isolados

A identificação morfológica dos isolados foi realizada de acordo com

técnicas laboratoriais convencionais, através de análises macro e microscópicas. As cores das colônias e as taxas de crescimento foram avaliadas com o auxílio de um estereoscópio. As estruturas microscópicas (conídeos e conidióforos) foram avaliadas pelo método de coloração nas lâminas utilizando o corante azul de metileno, com o auxílio de um microscópio óptico (MADIGAN *et al.*, 2018). As identificações morfológicas foram comparadas com dados da literatura.

3.3 Obtenção dos extratos fúngicos

Para a obtenção dos extratos fúngicos, os isolados foram cultivados novamente em meio de cultivo ASD durante 7 dias a 28 °C (BRASIL, 2019). Após esse período, blocos do meio de cultivo com crescimento microbiano recente, com diâmetro de aproximadamente 5 mm, foram retirados das culturas e transferidos para Erlenmeyers com capacidade de 125 mL, contendo 75 mL do meio de cultivo Caldo de Batata-Dextrose (CBD) que contém em sua composição: infusão de batata 200,0 g, Dextrose 20,0 g e água purificada 1.000 mL (BRASIL, 2019).

Os frascos foram incubados a 25 °C sob agitação constante de 140 rpm, por 21 dias (ISMAIEL *et al.*, 2017)

Após 21 dias de crescimento, o meio de cultivo líquido (extrato microbiano) foi submetido a uma filtração, utilizando um sistema de filtração à vácuo, ou seja, bomba à vácuo, frasco Kitazato, funil de büchner em porcelana, e filtros de papel (0,22 µm). Após a filtração, a massa celular fúngica foi descartada e a fase líquida foi coletada e reservada para a etapa de extração do paclitaxel e para os estudos de citotoxicidade.

3.4 Extração do composto ativo paclitaxel

O paclitaxel apresenta fórmula molecular de $C_{47}H_{51}NO_{14}$, correspondente a um peso molecular de 853 g/mol. É um pó branco cristalino, altamente lipofílico, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Apresenta ponto de fusão de 216-217 °C e λ_{max} espectral em luz ultravioleta de 273 nm (LI *et al.*, 2017).

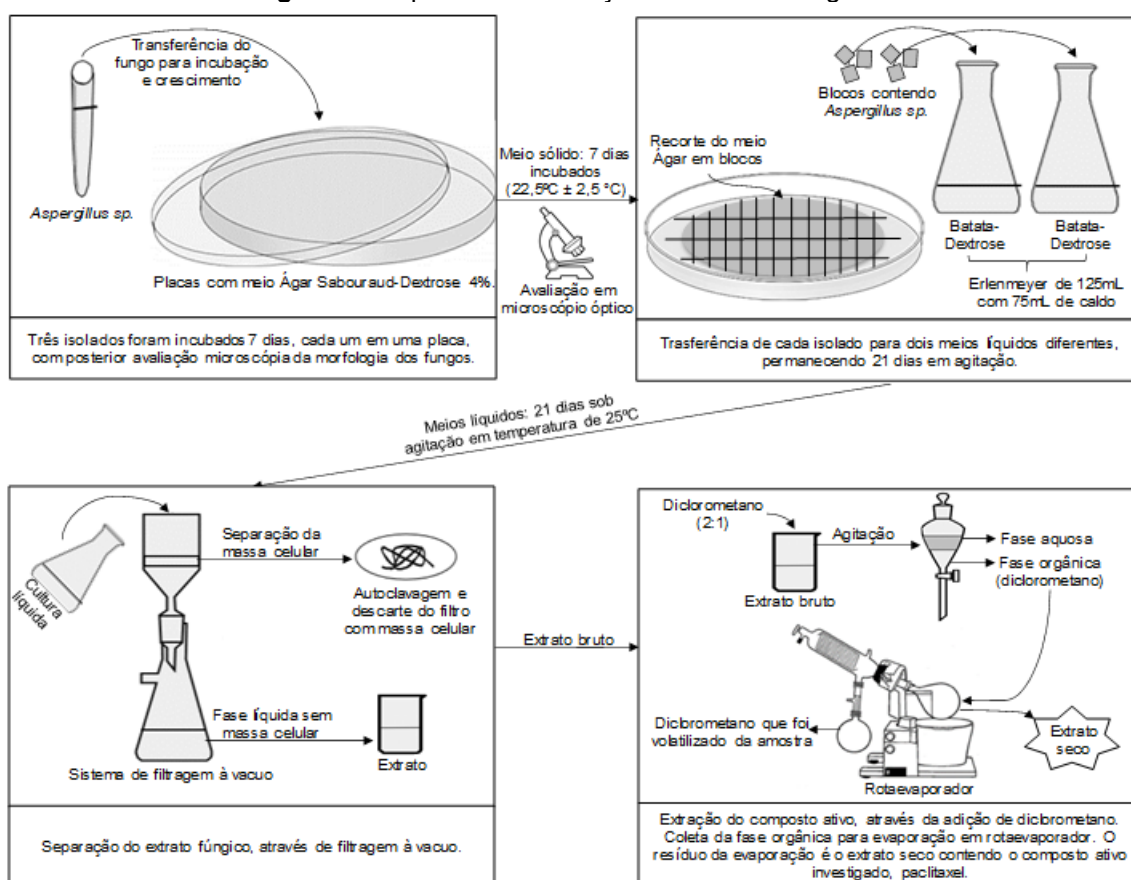
A extração do paclitaxel a partir da fermentação dos extratos fúngicos

e a análise via cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Gangadev; Muthumary (2009) e Suresh *et al.* (2020). Para cada amostra de extrato microbiano, foi adicionado 7 mL do solvente diclorometano, permanecendo na proporção de 2:1 (extrato:diclorometano).

As amostras foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e, em um funil de separação, foi realizada a coleta da fase orgânica (de baixo). Esse processo de extração foi repetido e, ao término da extração, aproximadamente 15 mL de fase orgânica foi coletada e submetida à evaporação, por meio de rotaevaporador (rotação de 100 rpm e temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Após evaporação completa do solvente, restou apenas o extrato seco no balão do rotaevaporador.

Como o paclitaxel tem ponto de fusão de $216\text{-}217^{\circ}\text{C}$ (LI *et al.*, 2017), mesmo após a etapa de evaporação do diclorometano utilizado para extração, o ativo permanece junto ao extrato seco, na sua forma sólida/cristalina. A Figura 5 ilustra todas as etapas acima citadas de forma esquemática.

Figura 5: Esquema da Obtenção do Extrato Fúngico.



Fonte: adaptado de Gangadev; Muthumary (2009) e Suresh *et al.* (2020).

3.5 Teste de citotoxicidade dos extratos fúngicos

O teste de citotoxicidade celular *in vitro* foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila). Utilizaram-se células tumorais H460 (NCI-H460) adquiridas do banco de células ATCC®. Essas células tiveram como origem um carcinoma de pulmão de células grandes (BANKS-SCHLEGEL *et al.*, 1985) e estão disponíveis no catálogo, com o código ATCC® HTB-177™.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1460 adquirido da Sigma-Aldrich, enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (fornecedor Gibco, EUA), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 26,4 mM de bicarbonato de sódio. Essas células cresceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (BROWER *et al.*, 1986). Para determinar o grau de toxicidade que os extratos fúngicos poderiam apresentar em cultivos celulares, foi realizado um ensaio de viabilidade celular.

Células NCI-H460 foram semeadas em placas de 96 poços (fornecedor Corning, EUA) com 1x10⁴ células por poço, em triplicata. Essas células foram incubadas por 24 horas com uma diluição seriada (de 50% até 0,39%) de cada extrato em meio completo. Poços para controle da viabilidade também foram incubados, sendo que nesses poços havia apenas meio completo. Após 24 horas, foram adicionados 10 µL de uma solução de brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT), em uma concentração final de 5 mg/mL em todos os poços e mantidos em incubadora a 37°C. Após 4 horas, o MTT foi metabolizado pelas células viáveis formando cristais de formazam. O meio foi descartado e os cristais de formazam foram solubilizados em 100 µL de DMSO (fornecedor Sigma Aldrich). Foi realizada a quantificação da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, para avaliar somente o formazam solubilizado, e com referência a 630 nm, para avaliar os possíveis interferentes (CARMICHAEL *et al.*, 1987)

Os dados de absorbância foram normalizados utilizando a fórmula Ab_{570}/Ab_{630} para retirar possíveis interferentes, sendo convertidos a valores de percentagem de viabilidade celular. Para isso, utilizaram-se como referência os poços de controle de viabilidade (incubados somente com meio completo) (CARMICHAEL *et al.*, 1987). Esses dados foram analisados mediante regressão linear para determinar a concentração inibitória de 50% utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

3.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Os testes de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizados nas instalações do departamento de analítico de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação do grupo Prati-Donaduzzi (fabricante de medicamentos localizada em Toledo-PR).

Foi utilizado equipamento de HPLC (*High performance liquid chromatography*) marca Shimadzu, modelo LC-2030C3D, com detector U.V. DAD (*Diode array detectors*).

Para fase estacionária, utilizou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa da marca Agilent, modelo Eclipse XBD-C18 de 4.6 x 150 mm, que contém micropartículas de 5 µm. Como fase móvel, foi utilizada mistura de água/acetoneitrila/metanol (40:35:25 v/v/v) e no HPLC programada vazão de 1 mL/min, temperatura do forno de 35°C. Volume de injeção de 20 µL e leitura no comprimento de onda UV de 232 nm (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2009; KATHIRAVAN *et al.*, 2013; SURESH *et al.*, 2020).

As amostras teste foram preparadas em duplicata por meio da diluição do extrato seco em 5 mL de metanol, filtragem em filtros de 0,22 µm e transferência para os vials de HPLC (Gangadevi and Muthumary, 2009).

As amostras padrão foram preparadas da mesma forma que as amostras teste, porém, em vez de extrato seco, essas amostras continham 5 mg de paclitaxel puro. O paclitaxel puro das amostras padrões foi adquirido do fabricante indiano Hetero Labs e, conforme laudo analítico do fabricante, continha 99,5% de teor ativo (lote PA17070001, validade 12/2019). Desse modo, as amostras padrões continham a concentração conhecida de 0,995 mg mL⁻¹.

Por fim, uma amostra denominada “branco” também foi preparada, a fim de eliminar qualquer hipótese de contaminação. Essa continha apenas o metanol para injeção em HPLC.

A Tabela 5 resume todos os parâmetros cromatográficos e de detecção utilizados para análise.

Tabela 5: Lista de parâmetros cromatográficos (HPLC).

Item	Descrição
Equipamento (marca / modelo)	Shimadzu / LC-2030C3D
Tipo de detector	U.V. com DAD (<i>Diode array detectors</i>)
Tipo de fase	Reversa
Fase estacionária (marca / modelo)	Coluna Agilent / Eclipse XBD-C18 - 5 µm de 4.6 x 150mm
Fase móvel	Água/acetoneitrila/metanol (40:35:25 v/v/v)
Vazão da Bomba	1 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	35 °C
Comprimento de onda	232 nm
Volume de injeção	20 µL
Solvente do preparo da amostra	5 mL de metanol (tanto no padrão quanto na amostra)
Especificação do filtro (vial)	20 µL
Capacidade do vial	2 mL

Fonte: elaboração própria, 2020.

Os cromatogramas de HPLC de todas as amostras foram comparados, a fim de demonstrar, via comparação de tempo de retenção, se houve ou não a síntese de paclitaxel pelos fungos que foram estudados.

3.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial

Após o término das análises por HPLC isolado, utilizou-se a técnica analítica de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas Sequencial (HPLC-MS/MS). Direcionou-se para análise de HPLC-MS/MS apenas a amostra teste que apresentou a presença de alguma substância relevante no método de identificação do paclitaxel via HPLC isolado.

A análise por HPLC-MS/MS foi realizada nas instalações do departamento de analítico de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Prati-Donaduzzi, e utilizou-se um equipamento HPLC Waters modelo Alliance 2695 acoplado ao espectrômetro de massas Waters modelo Quatro Micro API equipado com fonte de ionização electrospray.

Como fase estacionária, foi utilizada a mesma coluna cromatográfica do teste de HPLC (coluna cromatográfica de fase reversa da marca Agilent, modelo Eclipse XBD-C18 de 4.6 x 150 mm, micropartículas de 5 µm).

A Tabela 6 resume todos os parâmetros cromatográficos e de detecção utilizados para análise.

Tabela 6: Lista de parâmetros cromatográficos (HPLC-MS/MS).

Item	Descrição
Equipamento (marca / modelo)	1) HPLC - Marca: Waters / Modelo: Alliance 2695 2) Espectrometro de massas – Marca: Micromass / Modelo: Quattro Micro API
Tipo de detector	Espectrômetro de massas
Fonte de Ionização	Electrospray positivo e negativo
Fase estacionária (marca / modelo)	Coluna Agilent / Eclipse XBD-C18 - 5 µm de 4.6 x 150mm
Fase móvel	Água/acetoneitrila/metanol (40:35:25 v/v/v)
Vazão da Bomba	1 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	35 °C
Modo de Operação	MS Scan (equivalente <i>Full scan</i>)
Volume de injeção	20 µL

Fonte: elaboração própria, 2020.

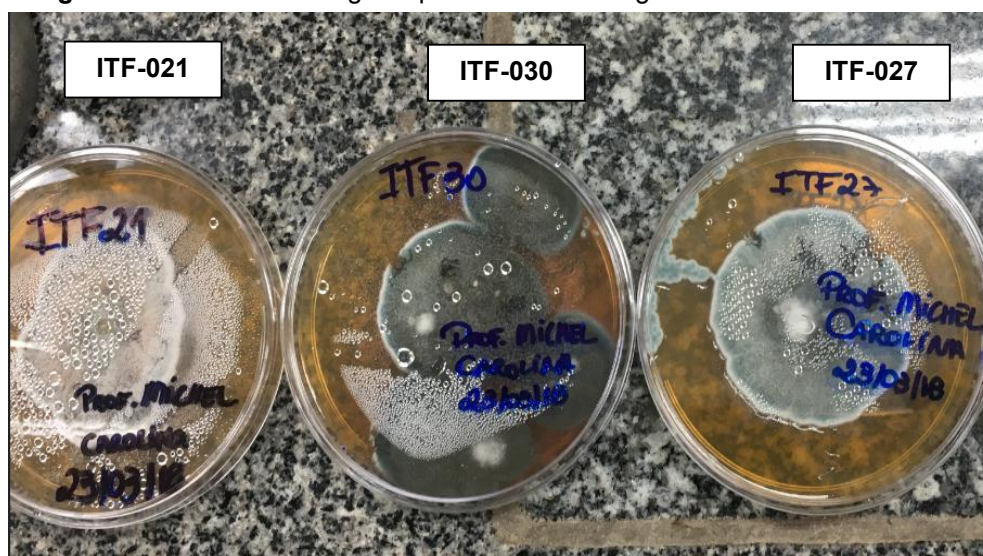
Os resultados obtidos por meio de HPLC-MS/MS entre as amostras teste e a amostra padrão foram comparados, a fim de demonstrar, via comparação da massa molecular, se houve ou não a síntese de paclitaxel pelos fungos estudados.

4. RESULTADOS

4.1 Microrganismos, obtenção dos extratos fúngicos e extração do composto ativo

Para a realização do estudo, três linhagens microbianas de fungos filamentosos, pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo os isolados ITF-021 (*Aspergillus* sp.), ITF-030 e ITF-027 ambos *Aspergillus sydowii*, foram reativados em meio de cultivo rico em fontes de carbono (Sabourud Dextrose 4%), conforme exposto na figura 6.

Figura 6: Crescimento fúngico após 7 dias: meio ágar sabouraud-dextrose 4%.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Análises microscópicas foram realizadas para confirmar a viabilidade dos isolados utilizados, bem como para verificar a possibilidade de uma eventual contaminação na preservação dos isolados (Figuras 7 e 8). A Figura 7 representa a morfologia padrão dos fungos *Aspergillus* spp.

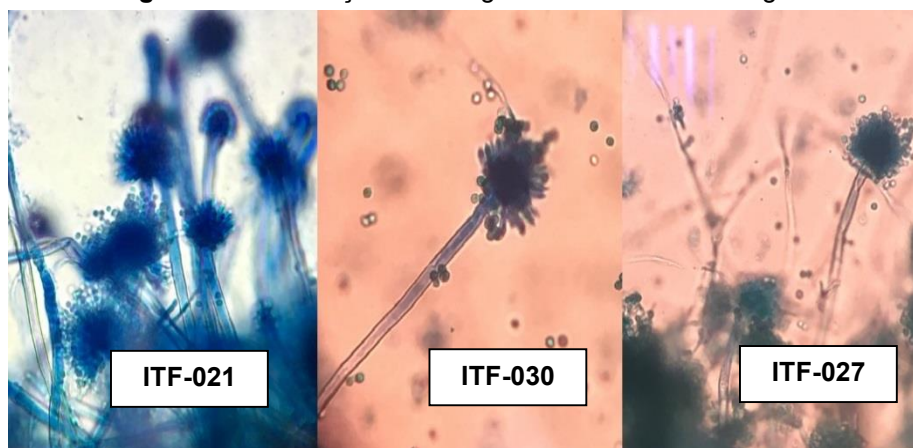
Figura 7: Morfologia padrão dos fungos *Aspergillus* spp.



Fonte: MADIGAN *et al.*, 2018.

Na Figura 8, estão apresentadas as imagens das lâminas de cada uma das linhagens incubadas, confirmando a presença de conídios e conidióforos característicos de *Aspergillus* spp.

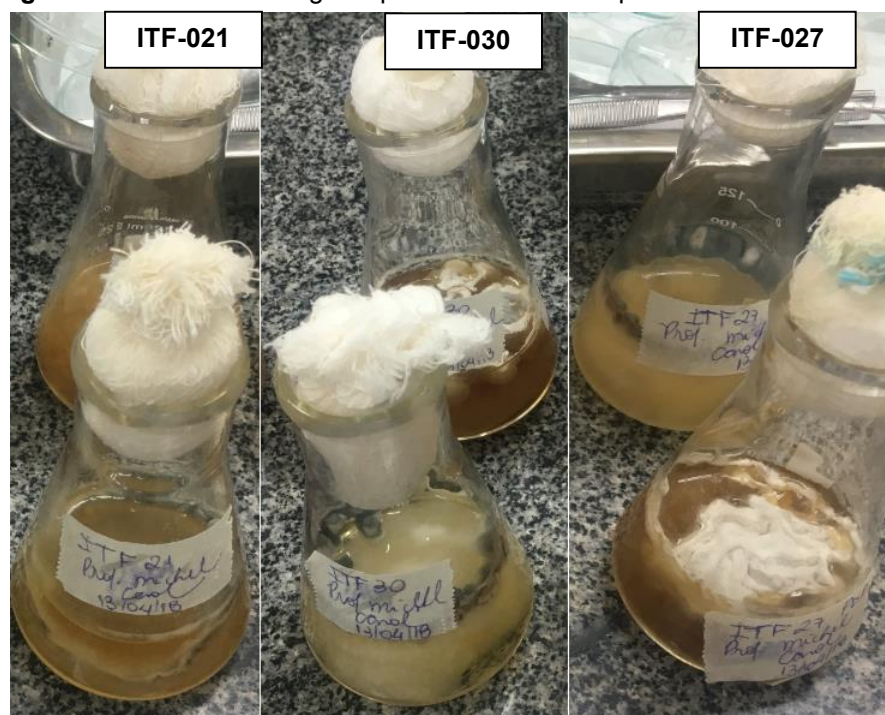
Figura 8: Identificação morfológica do crescimento fúngico.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Após a confirmação morfológica dos isolados, as amostras foram submetidas à produção dos extratos microbianos (Figura 9) e ao protocolo de extração para o metabólito secundário Paclitaxel (Figura 10).

Figura 9: Crescimento fúngico após 21 dias: meio líquido de batata-dextrose.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 10: Extração do paclitaxel a partir do extrato microbiano líquido filtrado.



Fonte: elaboração própria, 2020.

4.2 Teste de citotoxicidade dos extratos fúngicos

O ensaio MTT para avaliação de citotoxicidade foi realizado tanto para as amostras de extrato líquido filtrado quanto para as amostras teste que foram preparadas para injeção em HPLC e MS/MS.

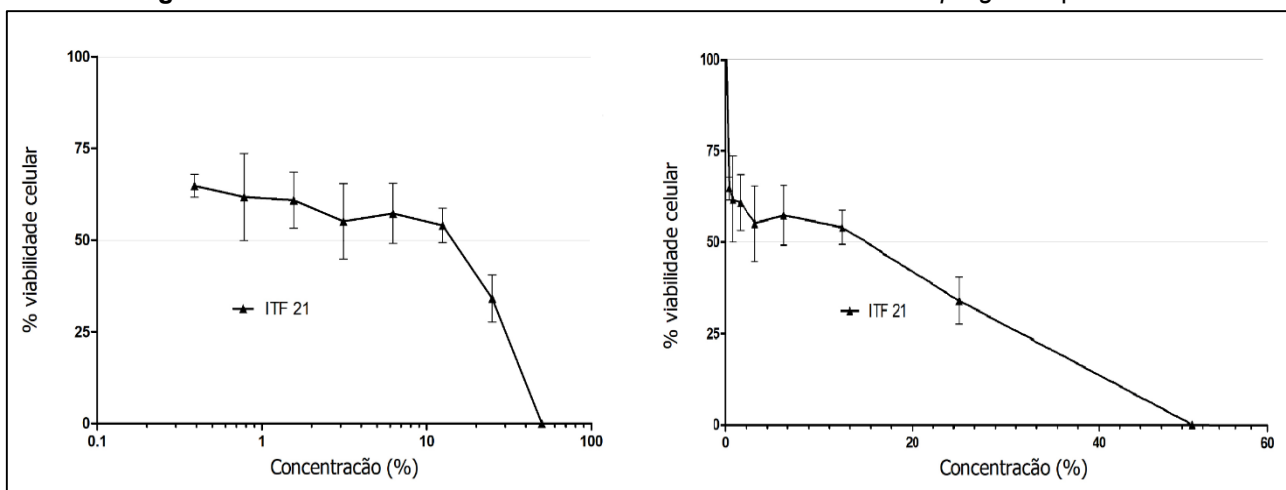
As amostras teste que foram utilizadas para injeção em HPLC e

MS/MS não puderam ser consideradas para a avaliação de viabilidade celular, pois o metanol, solvente utilizado para o preparo dessas amostras, apresentou isoladamente alta citotoxicidade. Já as amostras do extrato líquido filtrado puderam ser utilizadas, pois o meio de cultivo que foi utilizado nessas amostras (batata-dextrose) não interferiu na viabilidade celular.

Portanto, os resultados dispostos a seguir foram relacionados às amostras dos extratos líquidos filtrados, e o índice de viabilidade celular apresentado refere-se exclusivamente aos resultados dos compostos extracelulares que foram sintetizados pelos fungos durante o período de incubação e que não passaram pelas etapas de extração com diclorometano e solubilização com metanol.

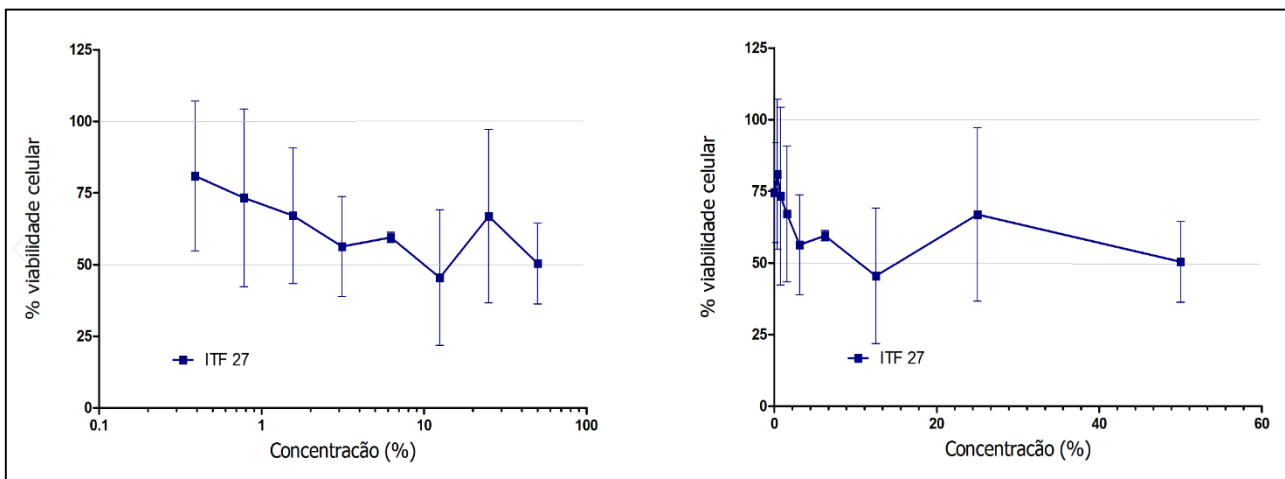
Nas Figuras 11, 12 e 13 estão expostos os resultados do ensaio de MTT, sendo que o primeiro quadro de cada figura representa os dados em escala logarítmica e o segundo representa os mesmos dados em escala linear.

Figura 11: Teste de viabilidade celular da amostra teste ITF-021: *Aspergillus* sp.



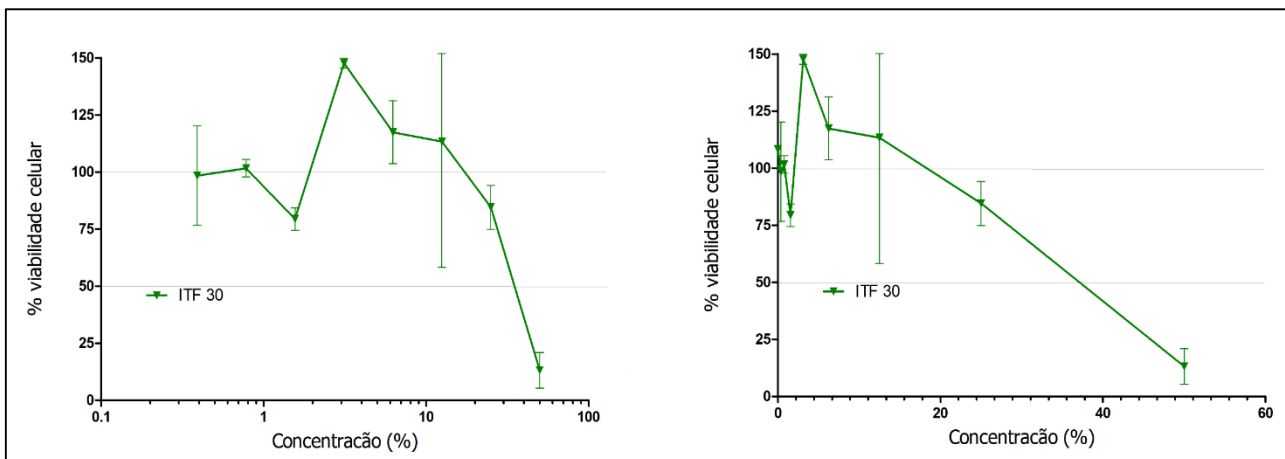
Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 12: Teste de viabilidade celular da amostra teste ITF-027: *Aspergillus sydowii*.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 13: Teste de viabilidade celular da amostra teste ITF-030: *Aspergillus sydowii*.



Fonte: elaboração própria, 2020.

No ensaio MTT, foi possível observar citotoxicidade, o que indicou que os fungos estão sintetizando compostos que são tóxicos para as células NCI-H460. Os valores de inibição celular de 50% (IC50) dos extratos fúngicos foram calculados e se encontram expostos na Tabela 7:

Tabela 7: Concentração do Extrato Fúngico para IC50.

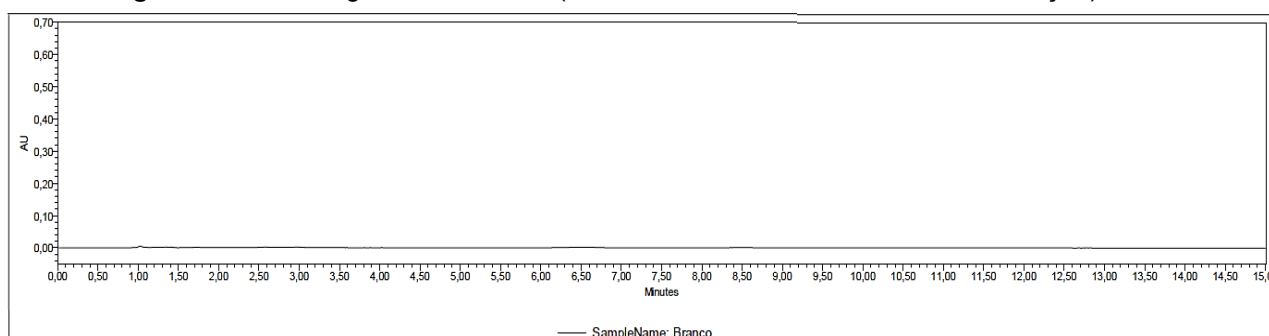
Código	Fungo	IC50	Intervalo de confiança de 95%	R ²
ITF-021	<i>Aspergillus</i> sp.	4,03 %	2,14 a 7,61%	0,585
ITF-027	<i>Aspergillus sydowii</i>	45,53%	2,49 a 832,10%	0,203
ITF-030	<i>Aspergillus sydowii</i>	34,89%	23,35% a 52,14%	0,613

Fonte: elaboração própria, 2020.

4.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

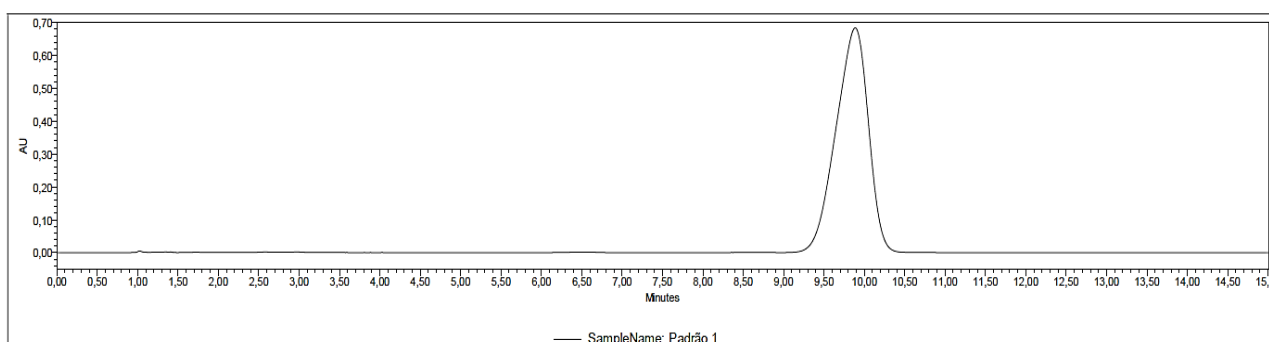
A seguir encontram-se os cromatogramas obtidos na análise de HPLC de cada amostra analisada.

Figura 14: Cromatograma do Branco (somente os solventes utilizados na extração).



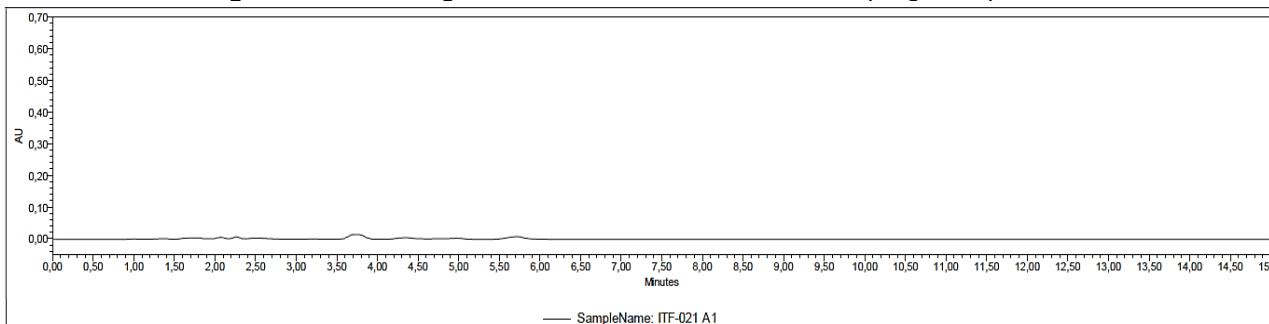
Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 15: Cromatograma da amostra padrão (paclitaxel).



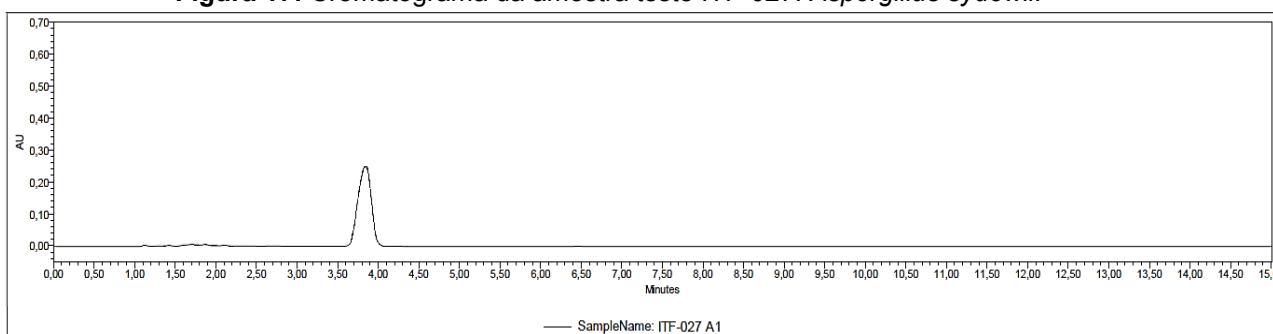
Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 16: Cromatograma da amostra teste ITF-021: *Aspergillus sp.*



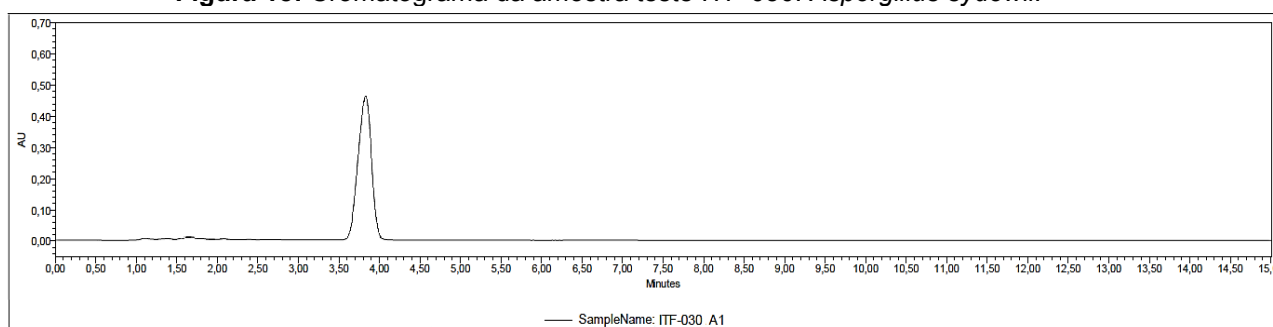
Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 17: Cromatograma da amostra teste ITF-027: *Aspergillus sydowii*.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 18: Cromatograma da amostra teste ITF-030: *Aspergillus sydowii*.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Após realização dos experimentos cromatográficos, foi possível verificar que o branco (Figura 14) apresentou a ausência de picos, demonstrando que os dados podem ser avaliados sem a interferência dos solventes utilizados para a análise.

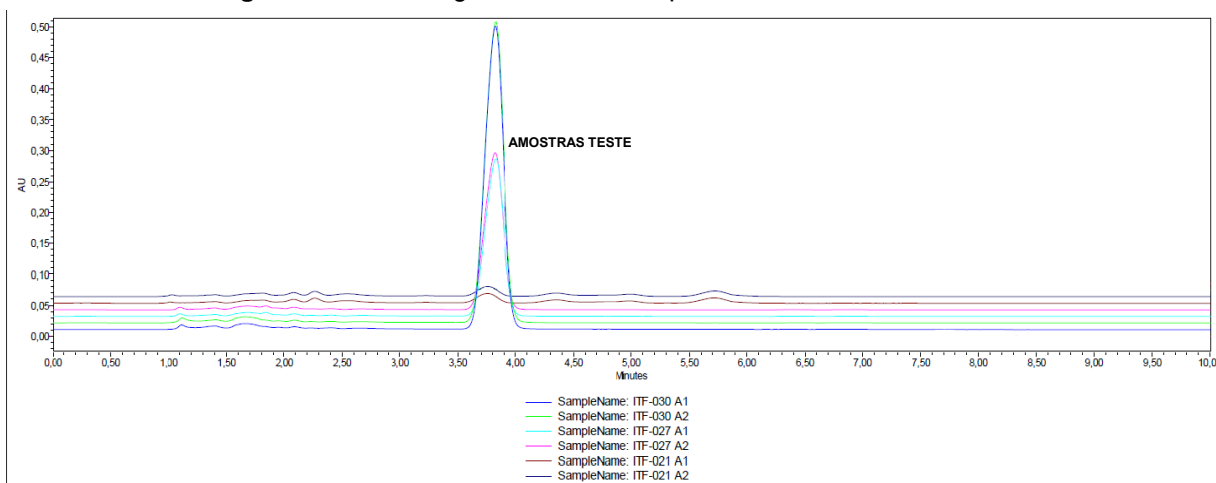
O cromatograma do padrão (paclitaxel na concentração de $0,995 \text{ mg mL}^{-1}$) (Figura 15) apresentou um pico no tempo de retenção em 9,8 minutos. Dessa forma, o aparecimento de picos no mesmo tempo de retenção nas corridas das amostras testadas poderia confirmar a presença do composto paclitaxel, ou seja, confirmaria a produção do paclitaxel pelos fungos filamentosos estudados.

Entretanto, a amostra obtida a partir de ITF-021 (*Aspergillus* sp) (Figura 16) não demonstrou a presença do pico de paclitaxel no cromatograma. Observam-se picos de pequena intensidade/área em diversos tempos de retenção, sendo visualizados como um pequeno tremor na linha de base do cromatograma. Isso significa que a amostra contém várias substâncias em baixas concentrações que são detectadas nos tempos iniciais de análise. Esses compostos que estão em concentrações muito pequenas apresentam afinidade com diclorometano (solvente

orgânico utilizado para extração), porém nenhum deles é o paclitaxel, visto que não foi detectado nenhum pico no tempo de retenção 9,8 minutos. Desse modo, pode-se afirmar que o isolado ITF-021 (*Aspergillus* sp.) não sintetizou o composto paclitaxel.

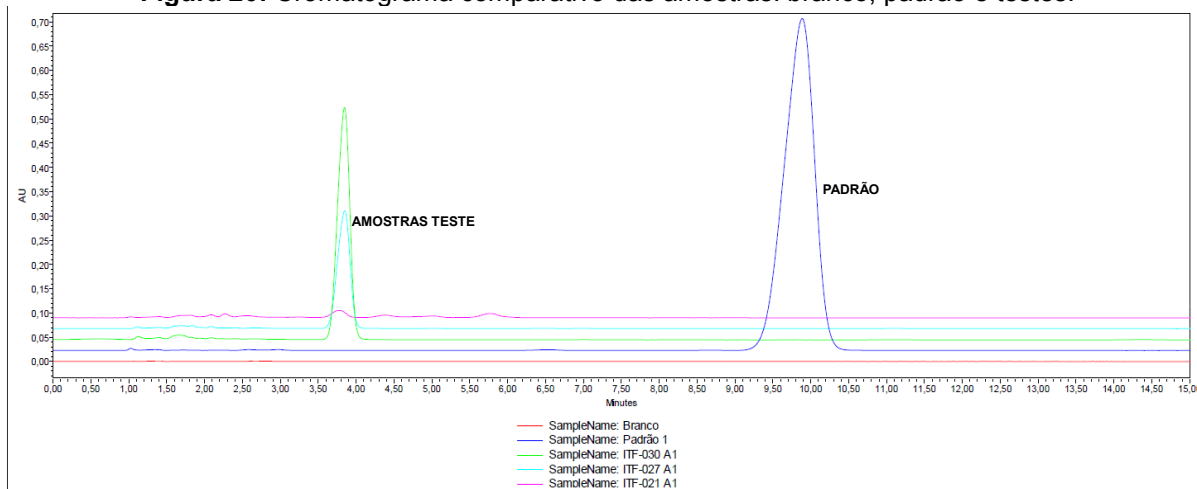
Observando os cromatogramas das amostras obtidas a partir dos isolados ITF-27 (Figura 17) e ITF-030 (Figura 19), podemos observar vários picos em baixíssima concentração nos tempos iniciais, porém um pico mais evidente detectado na região de 3,8 minutos. Como o padrão de paclitaxel apresentou tempo de retenção de 9,8 minutos, o composto principal produzido pelas duas amostras no tempo de retenção 3,8 minutos não é o paclitaxel, mas, sim, outro composto que tem afinidade com diclorometano. Dessa forma, podemos dizer que os fungos *Aspergillus sydowii* (amostras ITF-27 e ITF-30) não demonstraram síntese de paclitaxel.

Figura 19: Cromatograma entre as duplicatas das amostras teste.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Figura 20: Cromatograma comparativo das amostras: branco, padrão e testes.

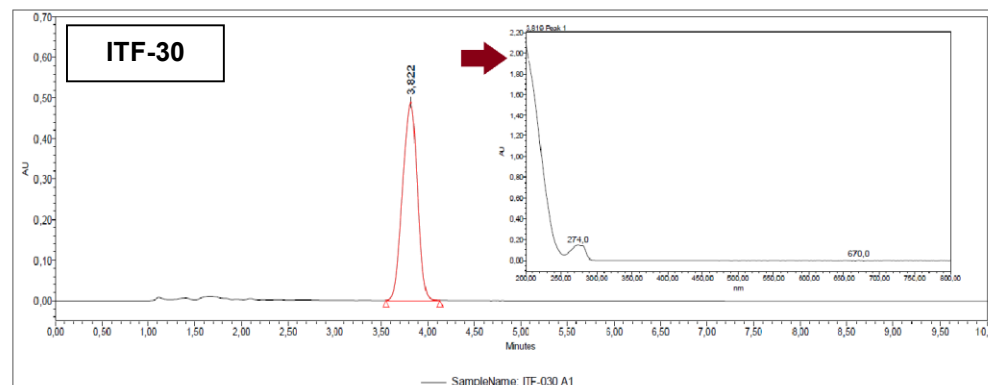
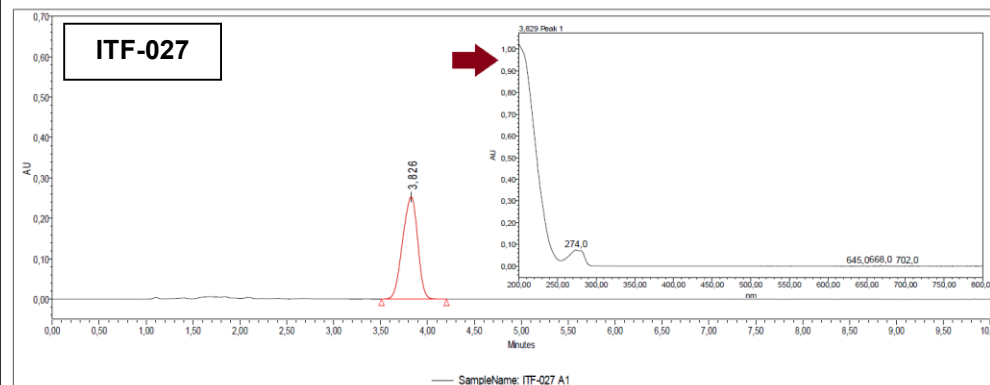
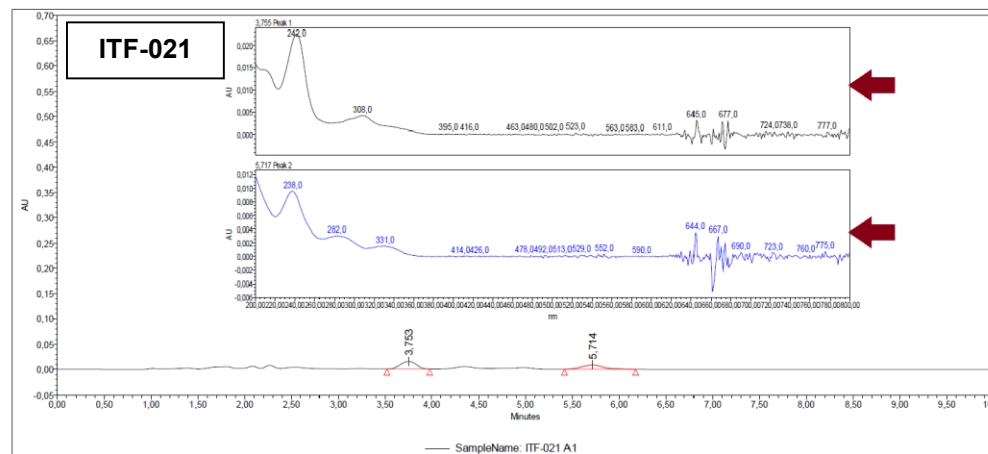
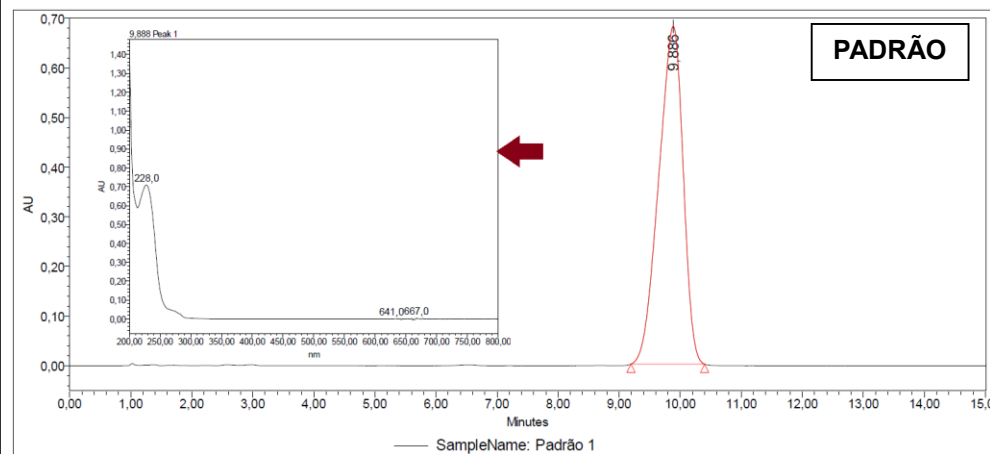


Fonte: elaboração própria, 2020.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 19 e 20 mostram as corridas cromatográficas agrupadas. A figura 19 demonstra os resultados das duplicatas das amostras testes, sendo considerados reproduzíveis, com cromatogramas muito parecidos entre as duplicadas. Por outro lado, a Figura 20 ilustra, de forma mais visual, que nenhuma das amostras teste apresentou o pico do paclitaxel mediante comparação com a amostra padrão.

Analisando os espectros de absorção dos principais picos identificados na análise por HPLC (Figura 21), podemos verificar que não há semelhança entre os espectros que foram registrados pelo detector de DAD das amostras teste (extratos microbianos), quando comparados com a amostra padrão, corroborando com os demais dados que confirmam que não houve produção do paclitaxel nos extratos fúngicos analisados. Além disso, nota-se que os compostos identificados na amostra ITF-027 (Figura 21) e na ITF-030 (Figura 21) apresentaram mesmo tempo de retenção e mesmo espectro de absorção, sugerindo que seja o mesmo composto.

Figura 21: Cromatogramas com os espectros de absorção dos principais picos identificados.



Fonte: elaboração própria, 2020.

4.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial

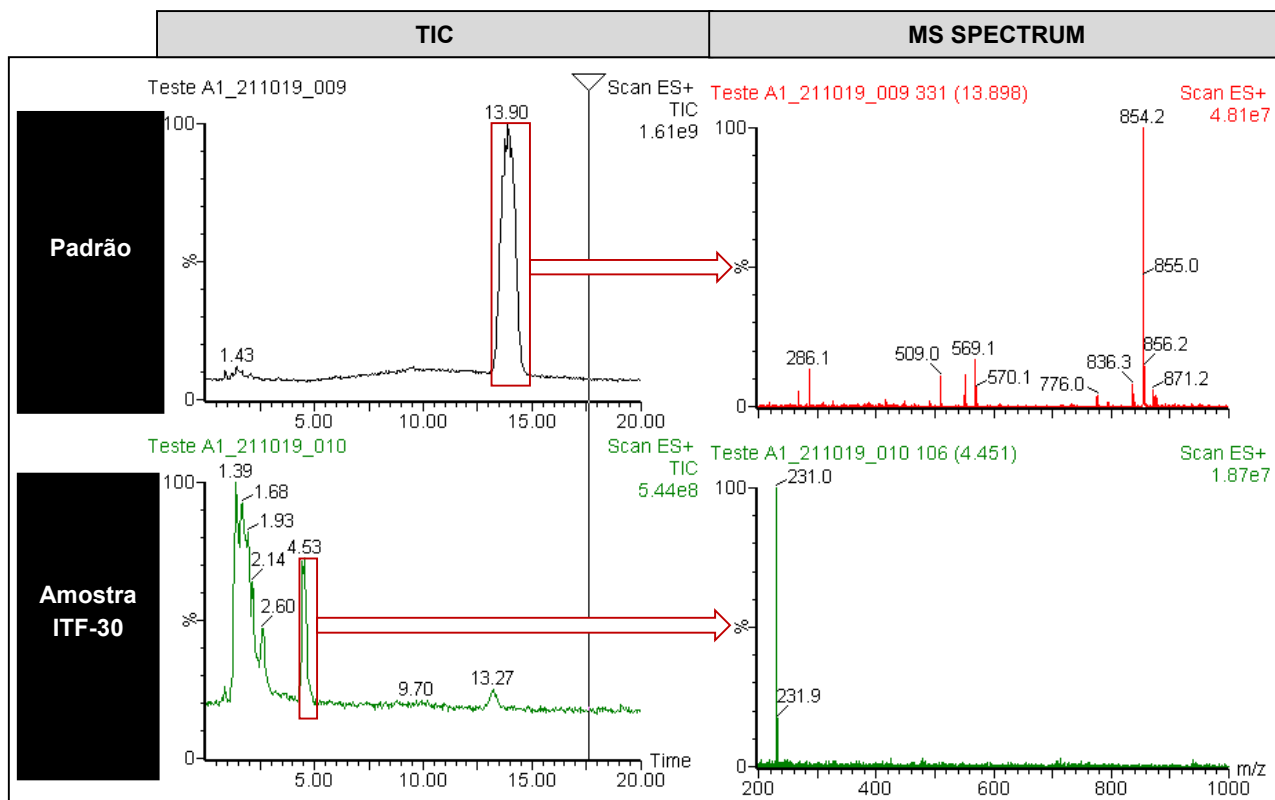
Embora o paclitaxel não tenha sido identificado nos extratos fúngicos analisados por HPLC, uma amostra teste foi selecionada e direcionada para análise por HPLC-MS/MS.

A amostra teste utilizada foi a ITF-030 (*Aspergillus sydowii*), pois demonstrou a síntese de um composto desconhecido em concentrações consideráveis. O pico da amostra ITF-030 demonstra o mesmo tempo de retenção e características de detecção da amostra ITF-027, sugerindo ser o mesmo composto, por isso, apenas a amostra com maior concentração foi direcionada para análise por HPLC-MS/MS.

Desse modo, visando confirmar os resultados obtidos pelo HPLC e conhecer a massa molar desse composto desconhecido, foi realizada a injeção do padrão e da amostra teste ITF-030 em modo de operação *Full scan*, com varredura entre 100 – 1000 m/z em modo de ionização por ESI positivo utilizando a fase móvel original, e em ESI negativo substituindo a fase aquosa por uma solução de hidróxido de amônio 0,1%.

Na Figura 22, são apresentados os resultados em ESI positivo. Observa-se que no cromatograma de íons totais (TIC) o padrão de paclitaxel elui em tempo de retenção (TR) de 13.90 minutos e apresenta íon precursor 854.2 m/z, confirmando a identidade do composto. Na amostra teste ITF-030, não foi possível observar o aparecimento do pico eluindo em TR 13.90 minutos, demonstrando ausência do analito investigado. No entanto, em TR 4.53 minutos, foi observado um pico secundário eluindo, o qual apresentou íon precursor de 231.0 m/z em seu espectro MS.

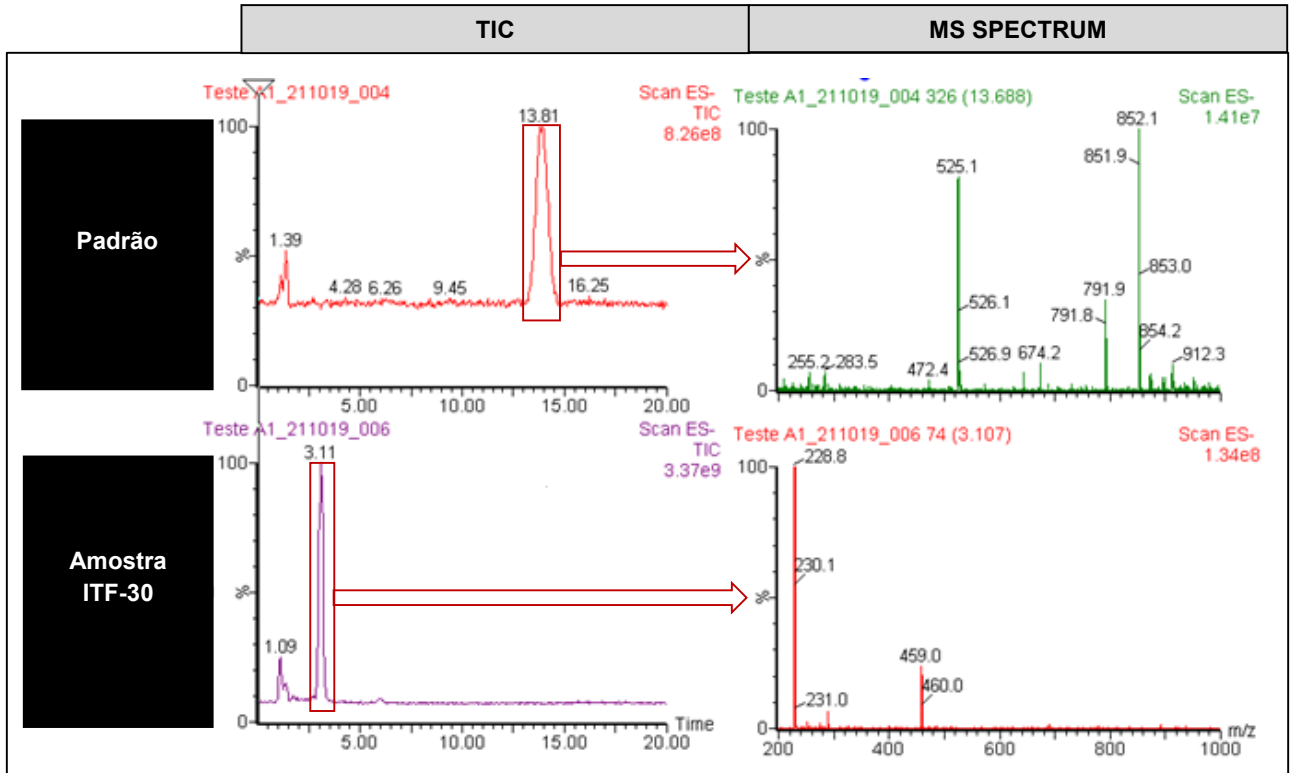
Figura 22: Cromatograma TIC e espectro MS do padrão e da amostra teste ITF-030 em modo ESI positivo.



Fonte: elaboração própria, 2020.

Na Figura 23 foram apresentados os resultados em ESI negativo. Observa-se que, no TIC, o padrão o paclitaxel elui em TR 13.81 minutos e apresenta íon precursor 852.1 m/z, confirmando a identidade do composto. Na amostra teste ITF-030 não foi constatado pico eluindo em TR 13.81, demonstrando ausência do analito paclitaxel. No entanto, em TR 3.11 minutos foi observado um pico secundário eluindo, o qual apresentou íon precursor de 228.8 m/z em seu espectro MS. O íon molecular 459.0 m/z possivelmente deve-se à formação de uma dimerização do próprio composto, devido à troca de fase e modo de ionização feitos para esse teste.

Figura 23: Cromatograma TIC e espectro MS do padrão e da amostra teste ITF-030 em modo ESI negativo.



Fonte: elaboração própria, 2020.

5. DISCUSSÃO

Autores sugerem que o paclitaxel seja um composto de origem microbiana (AGEITOS; GARCIA-FLUENTES, 2019; EL-SAYED; AHMED; AL-HAGAR, 2020; ISMAIEL *et al.*, 2017). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de extratos fúngicos do gênero *Aspergillus*, os quais colonizavam ambientes considerados estressantes devido à presença de compostos tóxicos recalcitrantes e verificar se houve síntese do composto ativo paclitaxel nesses extratos.

Na literatura, encontramos que o paclitaxel obtido a partir de fungos endofíticos possui atividade citotóxica em células NCI-H460. O paclitaxel foi obtido de fungos endofíticos da espécie *Aspergillus oryzae*, isolados das folhas de árvores *Taxus asiática*, na concentração de 95,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ e apresentou inibição celular de 50% no teste de MTT, após 24 horas de incubação, a partir da concentração de 40 μg de paclitaxel (quantidade isolada através de aproximadamente 420,9 mL de cultivo líquido com crescimento fúngico de 12 dias) (SURESH *et al.*, 2020).

Todas amostras testadas no presente estudo apresentaram significativa atividade citotóxica no teste de MTT. Conforme segue:

O extrato fúngico filtrado obtido a partir do isolado ITF-021 demonstrou inibição celular de 50%, na concentração de 4,03% (Intervalo de Confiança de 95%: 2,14 a 7,61%). Porém, quando analisado em HPLC, não houve detecção de paclitaxel e de nenhum outro pico com alta absorvância. Foram detectados diversos picos menores que demonstravam substâncias as quais estavam em baixas concentrações. Cabe ressaltar que foi analisada por HPLC a porção orgânica do extrato, enquanto que nos testes *in vitro* foi utilizado o extrato fúngico completo, após filtração, visto que os solventes orgânicos utilizados para extração e preparo das amostras para injeção em HPLC interferiram no teste de viabilidade celular.

Esses dados confirmam que o composto ativo citotóxico o qual o isolado ITF-021 está sintetizando não pode ser identificado pela mesma técnica cromatográfica utilizada para a detecção do composto paclitaxel. Esse pode ser o motivo pelo qual não houve detecção de picos via HPLC.

Por outro lado, a amostra obtida do extrato fúngico ITF-027 (*Aspergillus sydowii*) apresentou inibição celular de 50% (IC50) na concentração de

45,53%, porém o Intervalo de Confiança de 95% calculado demonstrou que a inibição celular de 50% (IC50) pode acontecer entre as concentrações de 2,49 a 832,10%. Desse modo, o range de citotoxicidade dos extratos fúngicos avaliados neste trabalho, o extrato de ITF-027, mesmo na concentração de 50%, não demonstrou inibição celular tão acentuada, permanecendo próximo ao IC50. Os dados obtidos por análise em HPLC demonstraram que não houve síntese de paclitaxel pelos fungos em questão, porém foi evidenciado um pico com absorvância aproximada de 0,28 AU na região de 3,8 minutos do cromatograma. Esse pico é uma substância desconhecida que foi detectada no mesmo método de extração do paclitaxel. O mesmo pico foi observado, porém de forma mais intensa (absorvância de 0,5 AU no mesmo tempo de retenção) na amostra ITF-030.

Por fim, o extrato fúngico filtrado obtido a partir do isolado ITF-030 (*Aspergillus sydowii*) apresentou inibição celular de 50% (IC50) na concentração de 34,89% (Intervalo de Confiança de 95%: 23,35% a 52,14%). Os dados de viabilidade celular apresentados na Figura 13 demonstram que houve um aumento no índice de viabilidade celular, chegando a próximo de 150% quando testado o extrato fúngico filtrado na concentração de 3,125%. Esse fato leva a duas principais hipóteses: i) que o extrato fúngico, em pequenas concentrações, pode estimular a proliferação celular e em maiores concentrações promove citotoxicidade; ii) a via citolítica do composto ativo sintetizado pelos fungos pode distorcer os resultados do teste de MTT por um breve período de tempo, ou seja, mesmo após a incubação de 24 horas, as células poderiam demonstrar os efeitos primários da citotoxicidade, em outras palavras, o estresse mitocondrial. Pode ser que se a leitura fosse feita alguns minutos depois, os resultados demonstrariam a morte celular (JASZCZYSZYN; GASIOROWSKI, 2008).

O ensaio de MTT mede a taxa metabólica mitocondrial e reflete de forma indireta o número de células viáveis na cultura celular. Os sais de MTT são reduzidos a cristais formazan, que são roxos insolúveis em água, apenas em células vivas com membrana celular e mitocôndrias intactas. Nesse teste, a quantidade total de formazan produzido após a redução do MTT pelas células vivas é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura (RAI *et al.*, 2018).

Em alguns mecanismos apoptóticos, antes da morte celular propriamente dita, há um estresse mitocondrial. Estudos comprovam que o aumento de radicais livres proporcionado, principalmente por medicamentos citostáticos antes da morte celular, potencializa a redução do MTT pela mitocôndria. Como

consequência há uma superestimação da viabilidade celular nesse período de tempo em que os radicais livres estão aumentados. Portanto, não há proliferação celular nesse período de tempo, ocorrendo uma maior redução de MTT pelas células que estão sob o efeito citostático, antes da morte celular, o que pode ser interpretado de forma como proliferação celular pelo teste de MTT (JASZCZYSZYN; GASIOROWSKI, 2008). Por isso, essa 2ª hipótese de interpretação dos dados de viabilidade celular também é uma hipótese viável e se enquadra melhor no estudo que foi conduzido, uma vez que o projeto em questão investiga a obtenção de um medicamento citostático produzido pelos isolados do gênero *Aspergillus* (ALQAHTANI *et al.*, 2019).

Os dados obtidos por análise em HPLC na amostra ITF-030 demonstraram que não houve síntese de paclitaxel pelos fungos *Aspergillus sydowii*, porém foi detectado um pico com absorvância aproximada de 0,5 AU na região de 3,8 minutos do cromatograma. Esse pico é uma substância desconhecida que foi detectada no mesmo método de extração do paclitaxel.

Ao analisar a amostra por HPLC-MS/MS identificou-se a massa molar de tal substância, que é de aproximadamente 230 g mol⁻¹, enquanto que a massa molar do paclitaxel foi de 853 g mol⁻¹ (LI *et al.*, 2017). Ou seja, não houve a produção de paclitaxel pelos fungos ITF-030, porém há outra substância promissora que pode ser investigada como fonte para um medicamento com atividade citotóxica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção dos extratos a partir de fungos do gênero *Aspergillus* foi realizada com sucesso e, ao avaliar a citotoxicidade dos extratos em células cancerígenas de pulmão H460, houve a confirmação de presença de metabólitos secundários com atividade citotóxica, mediante redução significativa de células viáveis após aplicação dos extratos fúngicos.

Desse modo, pode-se afirmar que microrganismos recuperados de ambientes contaminados com compostos tóxicos, como células microbianas isoladas de amostras de efluentes industriais têxteis, podem ser considerados potenciais fontes promissoras na obtenção de metabólitos secundários com atividades antimorais.

Embora os três extratos fúngicos estudados tenham demonstrado considerável atividade citotóxica, o composto ativo responsável por tal ação não foi o paclitaxel. Dessa forma, os resultados do presente trabalho encorajam estudos futuros na tentativa de identificar, caracterizar e otimizar a produção deste composto citotóxico, para que o mesmo possa ser utilizado como alternativa na área farmacêutica.

Além disso, os dados apresentados reforçam a necessidade de mais pesquisas para compreender as vias da biossíntese do paclitaxel produzido por fungos filamentosos não endofíticos, para que, assim, possa ser confirmado que o composto paclitaxel é de origem microbiana e não de origem vegetal, ou fruto da simbiose existente entre microrganismos e seus hospedeiros vegetais.

7. REFERÊNCIAS

- AGEITOS, J. M.; GARCIA-FLUENTES, M. **Pharmaceuticals from Microbes: The Bioengineering Perspective**. Switzerland: Springer Nature, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-01881-8>.
- AGLAW, S.; GAYKE, A.; KADAM, P.; KANAWADE, S.; GARUD, Y. Taxol As an Anticancer Agent: a Review. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, vol. 10, no. 6, p. 15–17, 2019. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.1006116>.
- AL-FAKIH, A. A.; ALMAQTRI, W. Q. A. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. **Mycology**, vol. 10, no. 4, p. 191–209, 2019. DOI 10.1080/21501203.2019.1604576. Available at: <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604576>.
- ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 101, no. 2, p. 493–500, 2017. DOI 10.1007/s00253-016-8034-2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8034-2>.
- ALQAHTANI, F. Y.; ALEANIZY, F. S.; EL TAHIR, E.; ALKAHTANI, H. M.; ALQUADEIB, B. T. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, vol. 44, p. 205–238, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.001>.
- BANKS-SCHLEGEL, S. P.; GAZDAR, A. F.; HARRIS, C. C.; BANKS-SCHLEGEL, S. P. Intermediate Filament and Cross-Linked Envelope Expression in Human Lung Tumor Cell Lines. **Cancer Research**, vol. 45, no. 3, p. 1187–1197, 1985. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(85\)80032-5](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(85)80032-5).
- BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. **Microbiology Spectrum**, vol. 4, no. 6, p. 1–32, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>.
- BOLZANI, V. da S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, vol. 68, no. 1, p. 04–05, 2016. <https://doi.org/10.21800/2317-66602016000100002>.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 11, no. 1, p. 21–32, 2013. DOI 10.1038/nrmicro2916. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2916>.
- BRANDL, J.; ANDERSEN, M. R. *Aspergilli*: Models for systems biology in filamentous fungi. **Current Opinion in Systems Biology**, vol. 6, p. 67–73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.09.005>.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira 6ª edição. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, vol. 1, p. 1–852, 2019. .

BROWER, M.; CARNEY, D. N.; OIE, H. K.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. **Cancer research**, vol. 46, no. 11, p. 798–806, 1986. .

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, vol. 47, no. 4, p. 936–942, 1987. .

CROGNALE, S.; PESCIAROLI, L.; FELLI, M.; PETRUCCIOLI, M.; D'ANNIBALE, A.; BRESCIANI, A.; PETERSON, S. W. *Aspergillus olivimuriae* sp. nov., a halotolerant species isolated from olive brine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 69, no. 1, p. 2899–2906, 2019. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.00357>.

DASGUPTA, A.; ACHARYA, K. Mushrooms: an emerging resource for therapeutic terpenoids. **3 Biotech**, vol. 9, no. 10, p. 1–14, 2019. DOI 10.1007/s13205-019-1906-2. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1906-2>.

DE VRIES, R. P.; RILEY, R.; WIEBENGA, A.; AGUILAR-OSORIO, G.; AMILLIS, S.; UCHIMA, C. A.; ANDERLUH, G.; ASADOLLAHI, M.; ASKIN, M.; BARRY, K.; BATTAGLIA, E.; BAYRAM, Ö.; BENOCCI, T.; BRAUS-STROMEYER, S. A.; CALDANA, C.; CÁNOVAS, D.; CERQUEIRA, G. C.; CHEN, F.; CHEN, W.; ... GRIGORIEV, I. V. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. **Genome Biology**, vol. 18, no. 1, p. 1–45, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>.

DEMAIN, A. L. Valuable Secondary Metabolites from Fungi. *In*: ZEILINGER, S.; MARTÍN, J.-F.; GARCÍA-ESTRADA, C. (eds.). **Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites**. New York: Springer-Verlag New York, 2014. p. 1–25. DOI 10.1007/978-1-4939-1191-2. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1191-2>.

EL-SAYED, A. S.A.; EL SAYED, M. T.; NADA, H. S.; HASSAN, A. E.; YOUSEF, E. K. Production and Characterization of Taxol as Anticancer Agent from *Aspergillus terreus*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, vol. 13, no. 4, p. 2055–2063, 2019. <https://doi.org/10.22207/jpam.13.4.17>.

EL-SAYED, Ashraf S.A.; SAFAN, S.; MOHAMED, N. Z.; SHABAN, L.; ALI, G. S.; SITOHY, M. Z. Induction of Taxol biosynthesis by *Aspergillus terreus*, endophyte of *Podocarpus gracilior* Pilger, upon intimate interaction with the plant endogenous microbes. **Process Biochemistry**, vol. 71, no. April, p. 31–40, 2018. DOI 10.1016/j.procbio.2018.04.020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.020>.

EL-SAYED, E. R.; AHMED, A. S.; AL-HAGAR, O. E. A. Agro-industrial wastes for production of paclitaxel by irradiated *Aspergillus fumigatus* under solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, , p. 0–1, 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14574>.

EL-SAYED, E. R.; AHMED, A. S.; HASSAN, I. A.; ISMAIEL, A. A.; KARAM EL-DIN, A. Z. A. Strain improvement and immobilization technique for enhanced production of the anticancer drug paclitaxel by *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 103, no. 21–22, p. 8923–8935, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10129-1>.

EL-SAYED, E. R.; AHMED, A. S.; HASSAN, I. A.; ISMAIEL, A. A.; ZAHRAA, A.; EL, A. K. Semi-continuous production of the anticancer drug taxol by *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima* immobilized in calcium alginate beads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, , p. 1–12, 2020. DOI 10.1007/s00449-020-02295-8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02295-8>.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 158, no. 3, p. 675–684, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8532-0>.

GARYALI, S.; TANDON, P.; REDDY, M. S.; WANG, Y. Exploitation of Fungal Endophytes as Bio-Factories for Production of Functional Metabolites through Metabolic Engineering; Emphasizing on Taxol Production. **High Value Fermentation Products**, vol. 1, p. 401–429, 2019. <https://doi.org/10.1002/9781119460053.ch18>.

GRIESENAUER, R. H.; KINCH, M. S. 2016 in review: FDA approvals of new molecular entities. **Drug Discovery Today**, vol. 22, no. 11, p. 1593–1597, 2017. DOI 10.1016/j.drudis.2017.06.011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.011>.

HUANG, T.; LIN, S. Microbial Natural Products: A Promising Source for Drug Discovery. **Journal of Applied Microbiology and Biochemistry**, vol. 01, no. 02, p. 3–5, 2017. <https://doi.org/10.21767/2576-1412.100005>.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; NIEGO, A. G. T.; ABEYWICKRAMA, P. D.; ALUTHMUHANDIRAM, J. V. S.; BRAHAMANAGE, R. S.; BROOKS, S.; CHAIYASEN, A.; CHETHANA, K. W. T.; CHOMNUNTI, P.; CHEPKIRUI, C.; CHUANKID, B.; DE SILVA, N. I.; DOILOM, M.; FAULDS, C.; GENTEKAKI, E.; ... STADLER, M. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, vol. 97, no. 1, 2019. DOI 10.1007/s13225-019-00430-9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>.

ISAH, T. Natural Sources of Taxol. **British Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 6, no. 4, p. 214–227, 2015. <https://doi.org/10.9734/bjpr/2015/16293>.

ISMAIEL, A. A.; AHMED, A. S.; HASSAN, I. A.; EL-SAYED, E. S. R.; KARAM EL-DIN, A. Z. A. Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 101, no. 14, p. 5831–5846, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8354-x>.

JASZCZYSZYN, A.; GASIOROWSKI, K. Limitations of the MTT assay in cell viability

testing. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, vol. 17, no. 5, p. 525–529, 2008. .

KARWEHL, S.; STADLER, M. Exploitation of Fungal Biodiversity for Discovery of Novel Antibiotics. *In*: STANDLER, M.; DERSCH, P. (eds.). **How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. [S. l.]: Springer, Cham, 2016. vol. 398, p. 303–338. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/82_2016_496.

KATHIRAVAN, G.; BHUVANESHWARI, V.; KRAMONY, E.; SUREBAN, S.; SREE, H. Isolation of anticancer drug TAXOL from *Pestalotiopsis breviseta* with apoptosis and B-Cell lymphoma protein docking studies. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, vol. 4, no. 1, p. 14, 2013. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.109402>.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 43, no. 2–3, p. 155–176, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.

KIM, K. U.; KIM, K. M.; CHOI, Y. H.; HURH, B. S.; LEE, I. Whole genome analysis of *Aspergillus sojae* SMF 134 supports its merits as a starter for soybean fermentation. **Journal of Microbiology**, vol. 57, no. 10, p. 874–883, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9152-1>.

KINCH, M. S. 2014 in review: FDA approval of new drugs. **Drug Discovery Today**, vol. 22, no. 4, p. 620–624, 2015. DOI 10.1016/j.drudis.2015.06.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.06.004>.

KINCH, M. S. 2015 in review: FDA approval of new drugs. **Drug Discovery Today**, vol. 21, no. 7, p. 1046–1050, 2016. DOI 10.1016/j.drudis.2016.04.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.008>.

KINCH, M. S.; GRIESENAUER, R. H. 2017 in review: FDA approvals of new molecular entities. **Drug Discovery Today**, vol. 23, no. 8, p. 1469–1473, 2018. DOI 10.1016/j.drudis.2018.05.011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.011>.

KINCH, M. S.; GRIESENAUER, R. H. 2018 in review: FDA approvals of new molecular entities. **Drug Discovery Today**, vol. 24, no. 9, p. 1710–1714, 2019. DOI 10.1016/j.drudis.2019.05.022. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.022>.

KOCSUBÉ, S.; PERRONE, G.; MAGISTÀ, D.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; SZIGETI, G.; HUBKA, V.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in Mycology**, vol. 85, p. 199–213, 2016. DOI 10.1016/j.simyco.2016.11.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>.

KUNDU, S.; JHA, S.; GHOSH, B. Transgenesis and Secondary Metabolism. **Transgenesis and Secondary Metabolism**, , p. 1–22, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4>.

LANGDON, S.; PEARCE, C. J. The Microbial Pharmacy: FDA Approved Medicines From Fungi. **Mycosynthetix**, no. 18, p. 1–4, 2017. .

LI, D.; FU, D.; ZHANG, Y.; MA, X.; GAO, L.; WANG, X.; ZHOU, D.; ZHAO, K. Isolation, purification, and identification of taxol and related taxanes from taxol-producing fungus *Aspergillus niger* subsp. *Taxi*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 27, no. 8, p. 1379–1385, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01018>.

LIU, W. C.; GONG, T.; ZHU, P. Advances in exploring alternative Taxol sources. **RSC Advances**, vol. 6, no. 54, p. 48800–48809, 2016. DOI 10.1039/c6ra06640b. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA06640B>.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. **Annual Review of Genetics**, vol. 50, no. 1, p. 371–392, 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>.

MADIGAN, A. M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 15th ed. London: Pearson, 2018.

MCELROY, C.; JENNEWEIN, S. **Taxol® biosynthesis and production: From forests to fermenters**. 1st ed. [S. l.]: Springer International Publishing, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_7.

MOHANTA, T. K.; BAE, H. The diversity of fungal genome. **Biological Procedures Online**, vol. 17, no. 1, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0020-z>.

MOHINUDEEN, K.; DEVAN, K.; SRIVASTAVA, S. **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**. Singapore: Springer Nature, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3>.

NAIK, B. S. Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, vol. 19, no. 1, 2018. DOI 10.1007/s13596-018-0352-8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0352-8>.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 100, p. 161–202, 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>.

PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T.; MAFFETONE, N.; WALKER, J. R.; KIM, E.; CHO, H. J.; REYNOLDS, J. M.; SONG, M. C.; PARK, S. R.; YOON, Y. J. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, no. 6, p. 1–27, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>.

QUINTANILHA-PEIXOTO, G.; TORRES, R. O.; REIS, I. M. A.; OLIVEIRA, T. A. S. de; BORTOLINI, D. E.; DUARTE, E. A. A.; ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, V.;

BRENIG, B.; AGUIAR, E. R. G. R.; SOARES, A. C. F.; GÓES-NETO, A.; BRANCO, A. Calm Before the Storm: A Glimpse into the Secondary Metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the Etiologic Agent of the Sisal Bole Rot. **Toxins**, vol. 11, no. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/toxins11110631>.

RAI, Y.; PATHAK, R.; KUMARI, N.; SAH, D. K.; PANDEY, S.; KALRA, N.; SONI, R.; DWARAKANATH, B. S.; BHATT, A. N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 1–15, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-19930-w. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.

RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 13, no. 8, p. 509–523, 2015. DOI 10.1038/nrmicro3496. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3496>.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, vol. 31, no. 10, p. 1425–1448, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4np00060a>.

SIDDIQUEE, S. **Recent Advancements on the Role of Biologically Active Secondary Metabolites from Aspergillus**. [S. I.]: Elsevier, 2018. DOI 10.1016/b978-0-444-63501-3.00004-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00004-1>.

SOLTANI, J. **Secondary Metabolite Diversity of the Genus Aspergillus: Recent Advances**. [S. I.]: Elsevier, 2016. DOI 10.1016/B978-0-444-63505-1.00035-X. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00035-X>.

SURESH, G.; KOKILA, D.; SURESH, T. C.; KUMARAN, S.; VELMURUGAN, P.; VEDHANAYAKISRI, K. A.; SIVAKUMAR, S.; RAVI, A. V. Mycosynthesis of anticancer drug taxol by *Aspergillus oryzae*, an endophyte of *Tarenna asiatica*, characterization, and its activity against a human lung cancer cell line. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 24, p. 1–32, 2020. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101525. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101525>.

UZMA, F.; MOHAN, C. D.; HASHEM, A.; KONAPPA, N. M.; RANGAPPA, S.; KAMATH, P. V.; SINGH, B. P.; MUDILI, V.; GUPTA, V. K.; SIDDAIAH, C. N.; CHOWDAPPA, S.; ALQARAWI, A. A.; ABD-ALLAH, E. F. Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 9, no. 4, p. 1–37, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00309>.

VADLAPUDI, V.; BORAH, N.; YELLUSANI, K. R.; GADE, S.; REDDY, P.; RAJAMANIKYAM, M.; VEMPATI, L. N. S.; GUBBALA, S. P.; CHOPRA, P.; UPADHYAYULA, S. M.; AMANCHY, R. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 1–10, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-07436-w. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07436-w>.

VASUNDHARA, M.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, no. 11, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01774>.

ZHANG, X.; LI, Z.; GAO, J. Chemistry and Biology of Secondary Metabolites from *Aspergillus* Genus. **The Natural Products Journal**, vol. 8, no. 4, p. 275–304, 2018. <https://doi.org/10.2174/2210315508666180501154759>.

ZHU, L.; CHEN, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular and Molecular Biology Letters**, vol. 24, no. 1, p. 1–11, 2019. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y>.