

DESCOBERTA DE METABÓLITOS FÚNGICOS BIOATIVOS

Gabriel Cóscia Junqueira

Reneid E. S. Dudu

Roberto G. S. Berlinck

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

gabrielcoscia@usp.br; rgsberlinck@iqsc.usp.br

Objetivos

Este trabalho tem como o objetivo o isolamento de metabólitos hidrossolúveis a partir do meio de cultivo da linhagem fúngica M3 que apresentem atividade biológica contra os parasitas *P. falciparum*, *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, contra as bactérias do grupo super-resistente ESKAPE, contra os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Pratylenchus brachyurus* ou atividade citotóxica contra células tumorais. Isso será feito através das seguintes etapas:

- Crescimento em escala ampliada da linhagem fúngica M3 para a produção de quantidade suficiente de cultura para o isolamento de metabólitos bioativos de seu extrato;
- Realização do isolamento e purificação, monitorados por bioensaios, das substâncias ativas produzidas pela linhagem M3. Para tanto serão realizadas diferentes etapas de separação cromatográfica e purificação por HPLC;
- Realizar a completa identificação estrutural dos metabólitos bioativos isolados e purificados, utilizando-se técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- Avaliação da atividade biológica das substâncias puras e identificadas.

Métodos e Procedimentos

O fungo M3, espécie ainda não identificada, foi isolado a partir das vísceras do caranguejo *Pilumnus dasypodus* Kingslay e preservado em criovials contendo solução de glicerol/água 25% (v/v) em freezer a -80 °C. A linhagem foi

reativada em placas contendo o meio de cultura *marine agar* (figura 1).



Figura 1: Placas de *marine agar* contendo o fungo M3 em diferentes estágios de crescimento.

Placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Este inóculo serviu para preparar culturas do fungo M3 em 9,4 L de meio de cultura líquido composto por PDB (potato dextrose broth) e sais inorgânicos para simular água do mar. O crescimento do fungo foi acompanhado a partir do monitoramento da queda da concentração de glicose do meio. A incubação foi interrompida depois de 42 dias. Após este período, o meio de cultura foi filtrado para a remoção do micélio e o meio de crescimento foi submetido a uma série de etapas de fracionamentos cromatográficos (figura 2).

O extrato aquoso foi dessalinizado utilizando-se uma mistura de resinas XAD (Figura 2). A fração dessalinizada foi fracionada por cromatografia por exclusão de tamanho em uma coluna de Sephadex LH-20 (eluente: MeOH/H₂O 1:1). As frações obtidas foram analisadas por HPLC-ELSD-UV-MS e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica. As frações finais foram enviadas para serem testadas nos bioensaios mencionados.

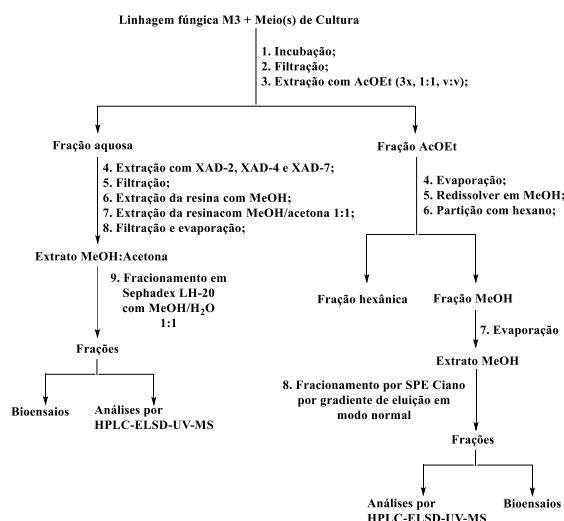


Figura 2: Procedimento adotado para o fracionamento dos extratos orgânico e aquoso do meio de crescimento do fungo M3.

Resultados

O extrato orgânico obtido a partir da partição com acetato de etila (AcOEt) foi codificado como M3O. O extrato aquoso obtido a partir da dessalinização com a mistura de resinas XAD foi identificado como M3R (figura 3).

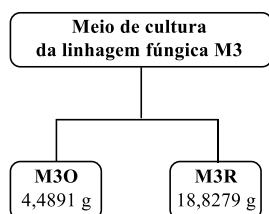


Figura 3: Massas dos extratos orgânico bruto (M3O) e aquoso bruto (M3R) obtidos a partir do crescimento em escala ampliada do fungo M3.

O fracionamento do extrato M3R foi realizado por cromatografia em Sephadex LH-20. As frações obtidas foram analisadas por HPLC-ELSD-UV-MS e reunidas em três frações finais, M3RA, M3RB e M3RC, de acordo com sua similaridade cromatográfica (figura 4). Estas três frações foram enviadas para testes nos bioensaios mencionados. Os resultados dos ensaios anti-malárico e anti-fúngico foram negativos para todas as frações.

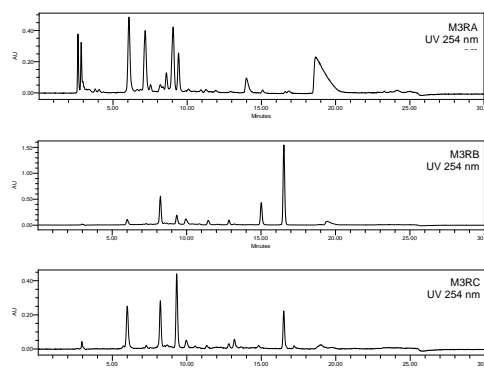


Figura 4: Cromatogramas detectados em 254 nm para as frações M3RA, M3RB e M3RC.

Conclusões

O crescimento em escala ampliada da linhagem de fungo M3 permitiu a obtenção de uma grande quantidade de fração hidrossolúvel a partir da adsorção da fração aquosa em resinas do tipo XAD-2, XAD-4 e XAD-7. A partir do fracionamento desta fração dessalinizada por cromatografia de exclusão por tamanho e análises por HPLC-ELSD-UV-MS foi possível observar que o extrato M3R apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos dos quais apresentam massa molecular acima de 300 Da. Muitos destes compostos são detectados apenas por um dos modos de ionização do espectrômetro de massas, principalmente em modo negativo, indicando que possivelmente devem apresentar grupo ionizável, como ácido carboxílico (-CO₂H). Os resultados dos demais bioensaios serão utilizados para selecionar as frações para serem separadas e os compostos purificados. Os compostos isolados deverão ser completamente identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, bem como avaliados nos ensaios de atividade biológica.

Apoio Financeiro

Gabriel C. Junqueira agradece à FAPESP (2021/12629-7) pela bolsa concedida. Roberto G. S. Berlinck agradece à FAPESP (2019/17721-9) pelo apoio financeiro.