

Investigação da Atividade Leishmanicida da Beauvericina Produzida pelo Fungo *Aspergillus terreus* P63

Lívia C. S. Epifanio

Virlânio A. de Oliveira Filho

Danilo C. Miguel

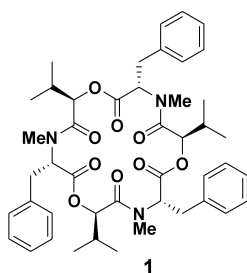
Roberto G. S. Berlinck

USP – IQSC, IB - UNICAMP

ciciliniivia@usp.br

Objetivos

Objetiva-se realizar o re-isolamento e purificação da beauvericina (**1**) a partir de meios de cultivo da linhagem fúngica *Aspergillus terreus* P63. A beauvericina é um hexadepsipeptídeo cíclico caracterizado pela presença alternada de três resíduos de ácido D-hidroxiisovalérico e três resíduos de N-metilfenilalanina^{1,3}. Este composto apresentou potente atividade anti-Leishmania in vivo em camundongos. No presente estudo, objetivamos dar continuidade à investigação do(s) mecanismo(s) de ação leishmanicida da beauvericina.

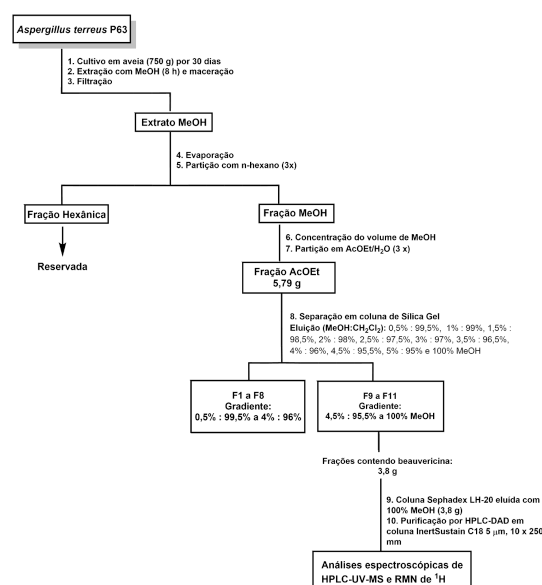


Métodos e Procedimentos

A preparação das placas de cultivo do fungo *A. terreus* P63 foi realizada em meio sólido de potato dextrose agar (PDA), com proporção de PDA 24 g/L e Ágar 2% m/v. O meio de cultivo sólido do fungo *A. terreus* P63 foi preparado

em frascos Shott® de 500 mL, contendo 25 g de aveia em flocos e 30 mL de água. Após o crescimento do fungo, o meio de cultivo foi extraído com AcOEt. Este extrato foi submetido ao processo sumarizado na Figura 1 para o isolamento da beauvericina.

Figura 1. Fluxograma representativo do procedimento experimental do processo de isolamento da beauvericina (**1**).



Ensaio de peroxidação lipídica nos estudos *in-vivo*

Promastigotas de *L. amazonensis* na fase de crescimento logarítmico foram incubadas com BVA na concentração de EC_{50} ou apenas com meio (grupo controle não tratado) por 24 horas. Em seguida, $38,5 \times 10^6$ células foram centrifugadas a $1.500 \times g$ por 6 minutos a $24^\circ C$, lavadas com PBS $1\times$ e lisadas usando tampão M-PER™. Após repetidas agitações em vortex e incubação no gelo, os extratos foram centrifugados a $14.462 \times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$, e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (595 nm).

Para avaliar a peroxidação lipídica, as amostras foram tratadas com citrato e $FeSO_4$, incubadas a $50^\circ C$ e, em seguida, reagidas com tampão TB1 e ácido ortofosfórico. Posteriormente, foram aquecidas a $95^\circ C$. A fase cromófora foi extraída com butanol, e a absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro.

Resultados

A beauvericina pôde ser detectada por análises por HPLC-UV-MS. O sinal cromatográfico apresentou espectro de massas com íon $[M+H]^+$ em 784 m/z, de acordo com dados da literatura⁴. Após a purificação cromatográfica da beauvericina, esta foi obtida em quantidade de 0,342 g.

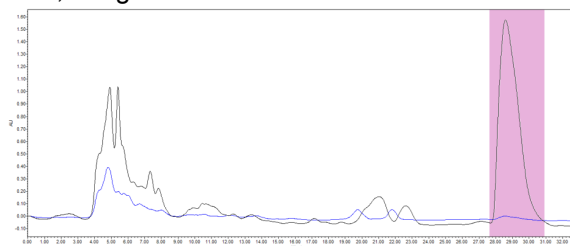


Figura 2: Cromatograma da purificação da beauvericina (sinal ressaltado).

A análise dos espectros de massas e de RMN 1H permitiram confirmar que o composto isolado é a beauvericina.

Os ensaios adicionais *in-vivo* realizados até o momento indicaram que a absorbância da amostra controle positivo (amostra com maior teor de proteína mais citrato e $FeSO_4$) foi definida como 100%, confirmando a formação de produtos de peroxidação lipídica. Amostras tratadas com beauvericina apresentaram um pequeno aumento de 20% na peroxidação em comparação aos respectivos controles negativos (células controle não tratadas). Esses dados sugerem um leve aumento no estresse oxidativo induzido por BVA em promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Conclusões

O isolamento da beauvericina a partir do meio de cultivo do fungo *A. terreus* P63 foi realizado de maneira satisfatória, obtendo-se mais de 300 mg do produto puro. Os resultados iniciais destes ensaios, indicam que a beauvericina induziu um aumento de 20% no estresse oxidativo nas promastigotas de *L. amazonensis*, o que sugere que seu mecanismo de ação pode envolver a geração de danos oxidativos às membranas. Dessa forma, pode ser sugerido que o uso da beauvericina causa perda de integridade da membrana e eventual morte do parasita. Todavia, testes adicionais deverão ser realizados para confirmar os dados obtidos.

Referências

1. Liu, L.; Wang, L.; Bao, L.; Ren, J.; Basnet, B.B.; Liu, R.; He, L.; Han, J.; Yin, W.-B.; Liu, H. **Org. Lett.** **2017**, *19*, 942-945.
2. De Oliveira Filho, V.A.; Goulart, T.R.; Moreira, M.A.; Silva, R.S.; Batista, W.F. **J. Nat. Prod.** **2024**, *87*, 2829-2838.
3. Logrieco, A.; Moretti, A.; Ritieni, A.; Caiaffa, M.F.; Macchia, L. **Adv. Microb. Tox. Res. Biotech. Exploit.** **2002**, *23*-30.
4. Sørensen, Jens Laurids et al. **J. Agric. Food Chem.** **2008**, *56*, 10439-10443.