

Metabólitos secundários bioativos produzidos por uma linhagem fúngica isolada das vísceras do caranguejo *Pilumnus dasypodus* Kingsley

Felipe Rampani de Oliveira

Roberto Gomes de Souza Berlinck

Universidade de São Paulo

feliperampani@usp.br

Objetivos

Este trabalho objetiva a identificação biológica da linhagem de fungo marinho, codificada como M3, isolada das vísceras do caranguejo *Pilumnus dasypodus* Kingsley. Também o isolamento de metabólitos secundários produzidos em cultura pelo mesmo fungo, que eventualmente apresentem atividade antiparasitária (*Plasmodium falciparum*; *Leishmania* sp.; *Trypanosoma cruzi*), antibacteriana (para bactérias resistentes do grupo ESKAPE) e citotóxica para células tumorais. Tal processo será realizado através das seguintes etapas:

- Reativação da linhagem, em meio de cultura adequado para identificação.
- Crescimento em larga escala para extração, fracionamento, isolamento e identificação de metabólitos secundários potencialmente inéditos.
- Realizar a identificação estrutural dos metabólitos isolados através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, também avaliação da atividade biológica dessas substâncias, por meio de bioensaios envolvendo os patógenos anteriormente citados.

Métodos e Procedimentos

A linhagem de fungo codificada como M3 foi isolada das vísceras de um indivíduo da

espécie de caranguejo *Pilumnus dasypodus* Kingsley tendo sido preservada em criovials em solução de glicerol/água 25% (v/v) em freezer -80 °C. A linhagem foi então inoculada em placas de Petri com meio de cultura ágar dextrose de batata (PDA), incubadas a 28 °C por sete dias (Figura 1), proporcionando, assim, o preparo das placas tanto para a sua identificação quanto para o crescimento em larga escala (Numata et al., 1992).



Figura1 : Placa de PDA contendo o fungo M3 após duas semanas de crescimento.

O fungo foi inoculado em 8,5 L de meio de crescimento líquido PDB (potato dextrose broth) em água marinha artificial (AMA: NaCl 13,6 g/L; CaCl₂·2H₂O 1,30 g/L; MgCl₂·6H₂O 4,53 g/L; KCl 0,64 g/L; MgSO₄·7H₂O 5,94 g/L; Na₂HPO₄ 10,0 mg/L; NH₄NO₃ 2,1 mg/L). O crescimento do fungo foi monitorado pela diminuição da concentração de glicose, durante 67 dias. Após este período, adicionou-se

acetato de etila aos frascos com a cultura do fungo. Após 24 h foi realizada a filtração da mistura AcOEt + meio de crescimento. A fração orgânica foi separada do meio de cultivo aquoso por partição líquido-líquido. A fração AcOEt foi evaporada, solubilizada em MeOH e desengordurada com hexano. A fração MeOH foi em seguida submetida a uma separação por extração em fase sólida, utilizando-se colunas pré-empacotadas com fase de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila e eluição gradiente. As frações obtidas foram evaporadas, secas alíquotadas e enviadas para bioensaios de atividade anti-plasmodial, anti-bacteriana e citotóxica em células tumorais humanas. As frações obtidas também foram submetidas a análises por HPLC-UV-MS para se avaliar seu perfil químico (Carroll et al., 2021).

Resultados

Foram obtidas as frações da SPE denominadas M3HD (eluente: hexano/diclorometano 1:1); M3D (eluente: diclorometano 100%); M3DA (eluente: diclorometano/acetato de etila 1:1); M3A (eluente: Acetato de etila 100%); M3AM (eluente: acetato de etila/metanol 1:1); M3M (eluente: metanol 100%), com massas de, respectivamente 7,7 mg; 29,1 mg; 499 mg; 37 mg; 376,8 mg; 10 mg. Alíquotas destas frações foram enviadas a bioensaios e analisadas por HPLC-UV-MS (Figura 2).

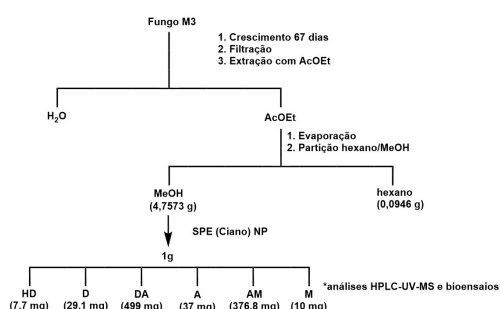


Figura 2: Fluxograma do fracionamento do meio de cultura do fungo codificado como M3.

Conclusões

A partir dos resultados dos bioensaios, serão direcionadas as etapas de purificação. Para realizar a identificação estrutural dos compostos a serem isolados serão realizadas análises espectroscópicas e espectrométricas.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro para o Professor Roberto G. S. Berlinck

Referências

- Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.*, **2021**, 38, 362.
- Numata, A.; Takahashi, C.; Matsushita, T.; Miyamoto, T.; Kawai, K.; Usami, Y.; Matsumura, E.; Inoue, M.; Ohishi, H.; Shingu, T. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 1621-1624.