



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LaβB - Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios

**Título do projeto:** Metabólitos de fungos filamentosos com atividade anti-Alzheimer e antimicrobiana.

**Orientadora:** Jacqueline Aparecida Takahashi, UFMG

*J. Takahashi*

**Co-orientadora:** Geane Pereira de Oliveira

**Aluno de iniciação científica voluntária:** Bárbara Oliveira Lopes

## I. INTRODUÇÃO

O Brasil é privilegiado por dispor de uma extraordinária biodiversidade, mas ainda carente da utilização biotecnológica de produtos microbianos e vegetais de forma sustentável. A relativa facilidade de isolamento e cultivo de fungos e o fato de estes produzirem, quase que obrigatoriamente, substâncias (com atividade antibacteriana e citotóxica) capazes de garantir sua sobrevivência em relação a bactérias que habitam um mesmo território, são importantes aliados na busca de novas drogas de origem fúngica.

A química de produtos naturais é uma área de pesquisa muito prolífera e de interesse estratégico para o Brasil. O uso dos recursos naturais de forma sustentável pode ser uma ferramenta importante para a emergência de novas indústrias no país. As pesquisas na área polarizam-se principalmente, mas não exclusivamente, em produtos naturais de plantas e de fungos. Dentre os fungos, várias fontes destes organismos têm sido estudadas: fungos de solo, marinhos, endófitos de plantas, entre outras.

O solo é deficiente em vários componentes minerais, tornando-se um micro-habitat rico em fungos e outros microrganismos, vivendo em intensas relações de antagonismo e simbioses. Fungos que sobrevivem em habitats inóspitos aprimoram um sistema de defesa eficiente (produção de metabólitos secundários) para garantir a continuidade da espécie. A triagem química e biológica de extratos de fungos provenientes de amostras de solo de cerrado pode conduzir ao isolamento de espécies, novas ou conhecidas que, adaptadas a estes tipos de solo possam ter desenvolvido uma biossíntese modificada ou aumentada de substâncias antibióticas, como ocorre com fungos isolados de áreas em processo de biorremediação. Fármacos de origem microbiana com valor de vendas superior a um bilhão de dólares como Zocor ou Pravachol (redutoras de colesterol), Neoral (imunossupressora), cefalosporinas e penicilinas (antibióticos) podem dar a dimensão da importância da bioprospecção da biodiversidade microbiana.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado há mais de 15 anos em estudos associados ao metaboloma de fungos de solo, adquirindo grande experiência na detecção das espécies mais ativas, além de isolar, identificar e determinar a atividade biológica de metabólitos secundários produzidos por estes fungos, que também têm sido utilizados, com muito sucesso, em reações de biotransformação.

O Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LABB), da UFMG, de um acervo de fungos que foram isolados de solo usando meios de cultura seletivos. Objetiva-se estudar seu perfil de atividade biológica, dentre o qual, contra micro-organismos patogênicos de relevância emergente

como *Malassezia furfur*, fungo oportunista de grande importância clínica quando associado a pacientes imunocomprometidos e atividade anti-Alzheimer.

Nesta proposta, propõe-se a realização de experimentos visando determinar condições de cultivo capazes de modular o metaboloma fúngico, pela manipulação das condições de cultivo de forma racional, seguindo planejamento multivariado. Os fungos serão cultivados em fermentação em substrato líquido sob condições de cultivo tradicionais e submetidos a modulação externa por meio de aeração, visando despertar rotas biossintéticas silenciadas (Takahashi et al., 2013). Para a definição das condições será utilizado um planejamento multivariado e, nesta etapa, os experimentos serão realizados em pequena escala. Depois de cultivados sob diferentes condições, serão preparados extratos que serão submetidos a bioensaios para investigação do potencial biológico das substâncias presentes (Schurmann et al., 2010). Os extratos serão analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para se traçar o perfil metabólico. Serão determinadas as condições de cultivo e os moduladores que geraram maior diversidade estrutural ou a formação de metabólitos majoritários bioativos. Espécies de fungos promissoras serão cultivadas em escala ampliada, seguindo as condições previamente otimizadas e serão isoladas as substâncias presentes, utilizando-se de métodos cromatográficos. A identificação estrutural será realizada por métodos espectroscópicos. Serão realizados bioensaios e teste de toxicidade para avaliar o potencial terapêutico e toxicológico das substâncias obtidas nos cultivos em escala ampliada.

## II. JUSTIFICATIVA

A produção de metabólitos bioativos por fungos pode ser primeiramente modulada utilizando condições de cultivo específicas (El-Aasar, 2006). Esta técnica é conhecida como OSMAC (“*one strain, many compounds*” ou “um micro-organismo, muitos compostos ativos”), sendo uma estratégia para diversificar e maximizar a produção metabólica de uma determinada espécie microbiana (Elias et al., 2006). Esta estratégia foi endossada por pesquisadores da Merck (Bills et al., 2008) como uma forma eficiente de se pré-selecionar condições de cultivo nas quais metabólitos bioativos, incomuns na biossíntese natural da espécie, podem ser sintetizados. Usando esta técnica, Bode et al. (2002) conseguiram uma excelente diversificação metabólica, isolando mais de 20 metabólitos diferentes, com rendimentos superiores a 2,6 g/L a partir de um único micro-organismo.

As estratégias descritas tem resultado no isolamento de milhares de metabólitos secundários em processos dinâmicos que incluem o monitoramento da atividade biológica. A necessidade deste dinamismo, aliada aos novos conceitos éticos, que impõem severas restrições ao uso de animais em testes biológicos, tem levado ao desenvolvimento de bioensaios que permitam testar um grande

número de extratos, frações e produtos naturais de forma mais rápida e com bom custo-benefício (Borris, 1996). Esta mudança de paradigma foi altamente benéfica, já que estes avanços levaram à diminuição das massas de amostras necessárias para a realização dos bioensaios, aumentando-se, por outro lado, o número de amostras testadas, um fator muitas vezes restritivo para a realização de ensaios com animais.

### III. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto podem ser resumidos como:

1. Produzir em escala ampliada e fracionar um extrato fúngico para isolamento de substâncias puras e caracterizar as mesmas por técnicas espectroscópicas.
2. Estudar o efeito da aeração no metabolismo de um fungo selecionado
3. Avaliar extratos e metabólitos em testes de atividade antimicrobiana incluindo-se o estabelecimento de protocolos para a realização de testes sobre *Malassezia fufur* (bactéria lipodependente).
4. Disponibilizar dos bioensaios atuais e aqueles em desenvolvimento para pesquisadores interessados da instituição e de fora dela, de modo a promover um uso compartilhado da infraestrutura e dos conhecimentos gerados.
5. Divulgar amplamente os resultados alcançados em congressos nacionais e internacionais, publicar artigos científicos (estima-se a publicação de seis artigos como resultado do projeto) e verificar a possibilidade de patenteamento dos resultados alcançados.

### IV METODOLOGIA

**Cultivos do fungo:** Para cultivo, o fungo será transferido para meio líquido. Os cultivos serão realizados em escala de 200 mL, em meio líquido e/ou sólido, em triplicata, variando-se as condições pH do meio; neste caso, por meio da introdução da aeração. Os microextratos preparados em ambas etapas serão avaliados nos protocolos de bioensaios propostos. O cultivo em uma das condições será refeito em escala ampliada (20 L). Os extratos terão seus perfis avaliados por CLAE.

**Preparo e análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):** Após o período de incubação dos fungos, as culturas serão filtradas para separar o micélio do meio líquido. Após extração líquido/líquido com acetato de etila, a fase orgânica será transferida para um balão de fundo redondo, o solvente será retirado em rotavapor e o extrato transferido para frasco pesado

(TAKAHASHI *et al.*, 2008). Serão estabelecidos os parâmetros (fase móvel, ajuste de pH, pressão de bombas, volume de injeção, vazão e outros) ideais de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**Isolamento e identificação das substâncias:** O isolamento das substâncias bioativas será realizado utilizando-se técnicas de cromatografia em coluna aberta usando sílica gel. As substâncias puras terão suas estruturas identificadas/elucidadas utilizando-se técnicas espectroscópicas no infravermelho, no ultravioleta, de espectrometria de massas, de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13, inclusive utilizando técnicas bidimensionais, raios-X e análise elementar.

**Bioensaios:** Os testes biológicos a serem realizados são:

**Atividade antimicrobiana** (Takahashi *et al.*, 2008; Zacchino e Gupta, 2007): A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor diluição da substância em que ocorre a inibição do crescimento dos micro-organismos. Este teste será realizado em microplacas esterilizadas, contendo 96 poços organizados em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze colunas. As colunas de 1-12 receberão a substância teste diluída de forma seriada (1000 a 0,49 µg/mL). As linhas de A-H receberão o inóculo, cuja concentração deve ser ajustada em um espectrofotômetro para corresponder a 0,5 da escala Mc Farland em comprimento de onda de 530 nm (inóculo fúngico) e 600 nm (inóculo bacteriano). Serão feitos controles positivo e negativo. As placas serão incubadas a 36 °C por 24 e 48 h e, após este período serão feitas as leituras para verificar a porcentagem de inibição do crescimento dos microrganismos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e *Candida albicans*). As leituras serão realizadas em um equipamento de leitura automática de microplacas. Os testes serão realizados em quintuplicata e o valor de inibição será obtido pela média das cinco medidas.

**Atividade antimicrobiana contra *Malassezia furfur*** (Takahashi *et al.*, 2008; Zacchino e Gupta, 2007): Será utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente, sendo que o meio de cultura deverá ser otimizado para se adequar ao teste, visto que *M. furfur* é um fungo de difícil cultivo e lipodependente. As condições para sua manutenção e crescimento em ágar já foram estabelecidas (Oliveira, 2010), restando somente otimizá-lo para o crescimento em meio de cultura líquido para a determinação da CIM das amostras ativas. Os testes serão realizados em quintuplicata e o valor de inibição será obtido pela média das cinco medidas.

**Inibição da acetilcolinesterase (Marston, 2002):** Aliquotas de 100 µg das amostras testes, dissolvidas em solvente volátil, serão aplicadas em placas de cromatografia em sílica gel. Após eluição, as placas serão borrifadas com solução de iodeto de acetilcolina e 5,5'-ditiobis [2,2 ácido nitrobenzóico] em tampão *tris* HCl. Após a secagem, as placas serão borrifadas com enzima acetilcolinesterase tipo VI S liofilizada, dissolvidas em 50 mM de tampão *tris* HCl. Após incubação, o desenvolvimento de coloração amarela nas placas indicará resultado positivo para inibição da acetilcolinesterase. Galantamina será utilizada como controles positivos. Para o teste em placas de 96 poços e determinação da atividade em leitora de ELISA, os reagentes anteriormente descritos serão adicionados em micropoços e a leitura será realizada pela leitura da alteração de cor em comprimento de onda específico. Os testes serão realizados em triplicata e o valor de inibição será obtido pela média das três medidas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bills G. F.; Platas G.; Fillola A.; Jimenez M.R.; Collado J.; Vicente F.; Martin J.; Gonzalez A.; Bur-Zimmermann J.; Tormo J.R.; Pelaez F., 2008. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *Journal of applied microbiology*, 104,1644-1658.
- Bode, H. B., Bethe, B., Hofs, R., 2002. Zeeck Axel Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 3, 619-27.
- Borris, R. P. Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology* 1996, 51(1-3), 29-38.
- Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P.; Reist, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 33(2), 109-119.
- El-Aasar, S.A., 2006. Cultural Conditions Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Agriculture & Biology* 8, 468-473.
- Elias, B.C., Said, S., Albuquerque, S., Pupo, M.T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological Research* 2006;161:273-280
- Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 2002; 13, 51-54.
- Schurmann, B.T.M. ; SALLUM, W. S. T. ; TAKAHASHI, J. A. . Austin, dehydroaustin and other metabolites from *Penicillium brasilianum*. *Química Nova (Impresso)* , v. 33, p. 1044-1046, 2010.

Takahashi, J.A.; Castro, M.C.M.; Souza, G.G.; Lucas, E.M.F.; Bracarense, A.A.P.; Abreu, L.M.; Marriel, I.E.; Oliveira, M.S.; Floreano, M.B.; Oliveira, T.S.; Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. Mycologie Méd.*, 2008, 18, 198.

Takahashi, J.A.; Lucas, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Quím. Nova* 2008; 31, 1807-1813.

Takahashi, JA; Teles, APC, Bracarense, AAP, Gomes, DC. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. *Phytochemistry Reviews*, 2013. Disponível *on line* em <http://link.springer.com/article/10.1007/s11101-013-9305-5>. DOI 10.1007/s11101-013-9305-5

Zacchino, S.A.; Gupta, M.P. *Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos*. Rosario. Corpus Editorial y Distribuidora, 2007.

## VI. CRONOGRAMA

O cronograma é apresentado na Tabela 1, que se segue.

Tabela 1. Cronograma

Atividades	Meses					
	1	2	3	4	5	6
Preparo de extratos sob aeração e determinação dos parâmetros e análise dos perfis cromatográficos por CLAE						
Cultivo em escala ampliada; preparo de extrato.						
Isolamento das substâncias bioativas						
Identificação estrutural das substâncias bioativas						
Bioensaio de atividade contra <i>M. furfur</i>						
Bioensaio de atividade antimicrobiana						
Bioensaio de atividade anti –Alzheimer						
Redação de Trabalhos para Congressos/Artigos/Relatórios						