



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA BIOMASSA
DE *Penicillium sclerotiorum***

Aluno de iniciação científica voluntária: Paulo Victor Menezes Lima

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi

Co-orientadora: Marília Aparecida Fidelis e Moura

I INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos, embora sejam mais conhecidos como agentes patogênicos ou causadores de “mofo” em paredes, alimentos, roupas, etc, têm importância econômica considerável para a sociedade, sendo utilizados em trabalhos na área ambiental (biodegradação de contaminantes tóxicos do solo, biodeterioração de resíduos como plástico), em saneamento (estações de tratamento de água, bioindicadores), medicina, alimentação, etc.

Apesar do grande potencial destes micro-organismos para o homem, estima-se que menos de 10% dos fungos do planeta sejam conhecidos (HAWKSWORTH, 2001) e uma parcela ainda menor tenha sido estudada quimicamente. Além disso, o Brasil é conhecido por possuir uma biodiversidade riquíssima, mas pouco explorada, principalmente quanto ao aproveitamento de fungos na indústria farmacêutica e alimentícia (STROBEL & DAYSI, 2003). É consenso admitir-se que a diversidade não seja um fenômeno isolado, de forma que tem sido observado que, quando a diversidade biológica é grande, a diversidade estrutural dos metabólitos secundários produzidos por estas espécies também seja grande. Isto ressalta ainda uma vez mais a importância ecológica e econômica dos recursos biológicos do país e é no sentido de agregar valor aos recursos naturais que este projeto se insere.

Em condições naturais, fungos são capazes de aproveitar fontes energéticas disponíveis em uma grande variedade de resíduos que contenham uma fonte de carboidratos (PETRINI,

1992), tais como resíduos vegetais e agrícolas, de destilaria, de madeireiras, etc para a produção de metabólitos primários como proteínas, lipídios e aminoácidos como lisina, metionina e triptofano (WAINWRIGHT, 1992). Desta forma, as células fúngicas constituem uma fonte balanceada de proteínas, com valor nutricional superior ao da proteína vegetal, que nem sempre apresenta estes aminoácidos essenciais.

Alguns metabólitos primários fúngicos têm importância comercial e podem ser obtidos industrialmente em grande escala, como é o caso do ácido cítrico (usado na produção de alimentos e refrigerantes), o etanol (usado na produção de bebidas alcoólicas), enzimas (pectinases, lipases e glicose isomerase, usadas no processamento de alimentos) e aminoácidos e vitaminas (suplementos alimentares) (ISAAC, 1997). A moderna indústria de alimentos comercializa um número significativo de produtos, dentre os quais derivados do leite e bebidas, que empregam micro-organismos diversos para sua fabricação. O potencial de emprego de micro-organismos na indústria alimentícia é ainda mais amplo, devido, inclusive, à atual demanda de uma grande parcela da população por alimentos mais saudáveis.

Além dos metabólitos secundários, fungos produzem uma grande variedade de produtos naturais que podem ser empregados na medicina (antibióticos, imunossuppressores, antilipidêmicos, anti-tumorais, etc) e na agricultura (antifúngicos, alelopáticos), chamados metabólitos secundários (LANGLEY, 1997). Porém, há metabólitos fúngicos extremamente tóxicos para os homens e outros animais, como as micotoxinas, cujo estudo é de grande importância para a prevenção de acidentes, principalmente por contaminação de alimentos.

Micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos que podem provocar doenças e morte em humanos e outros vertebrados (JAY, 1996; BENNETT e KLICH, 2003). As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimentos (IAMANAKA *et al.*, 2010). Cinco gêneros de fungos são considerados os principais produtores de micotoxinas: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* (MAZIERO e BERSOT, 2010). No entanto, nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir micotoxinas. Não há relatos na literatura sobre a produção de micotoxinas por fungos da espécie *P. sclerotiorum* até o presente momento.

A análise dos genomas microbianos revela numerosos genes provavelmente envolvidos na biossíntese de compostos estruturalmente complexos, porém, estes não estão associados com a produção de metabólitos conhecidos (CHÁVEZ *et al.*, 2015). Mudanças nas condições de cultivo de alguns micro-organismos podem alterar completamente o metabolismo dos mesmos, levando a uma variedade de novos metabólitos secundários a partir de uma cepa (BODE *et al.*, 2002). Assumindo que pequenas alterações no meio de cultura são capazes de modular a biossíntese de metabólitos secundários, algumas estratégias foram desenvolvidas para maximizar

a produtividade de metabólitos fúngicos, variando a composição do meio de cultura, pH, temperatura, aeração e luminosidade (BODE *et al.*, 2002 citado por TAKAHASHI *et al.*, 2013). O termo comumente utilizado para essa abordagem é OSMAC (*One Strain – Many Compounds*). A abordagem OSMAC representa uma maneira efetiva de ativar rotas metabólicas silenciadas ou pobremente expressas (TAKAHASHI, 2013).

II JUSTIFICATIVA

CARVALHO *et al.*, (2010) caracterizaram as biomassas de quatro espécies de fungos filamentosos (*P. sclerotiorum*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum*). Os resultados de seu trabalho mostraram que as biomassas dessas quatro espécies apresentaram altos teores de umidade, proteínas e minerais e baixo teor de lipídeos, indicando potencial para utilização como suplementos alimentares. Considerando-se o potencial de utilização do fungo *P. sclerotiorum* em biotecnologia de alimentos, tanto em processos fermentativos para obtenção de metabólitos de interesse, quanto o uso de sua biomassa como suplementação alimentar, é importante avaliar sua atividade metabólica e biomassa em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de nutrientes, bem como verificar se há produção de substâncias tóxicas, como as micotoxinas, que limitariam seu emprego na indústria de alimentos.

III OBJETIVO

Objetivo geral: Produzir e caracterizar a biomassa do fungo *P. sclerotiorum* cultivada em diferentes meios de cultura

Objetivos específicos:

- Cultivar o fungo *P. sclerotiorum* em diversas condições de cultivo;
- Caracterizar o teor de umidade, minerais das biomassas do fungo *P. sclerotiorum*
- Verificar se há produção de micotoxinas pela espécie;
- Determinar o perfil cromatográfico, as atividades antioxidante e anti-Alzheimer dos extratos obtidos da espécie
- Determinar a toxicidade dos extratos obtidos da espécie

IV MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultivo do fungo: Uma quantidade padronizada de esporos fúngicos será inoculada em meios de cultura contendo: glicose, peptona, cloreto de sódio (NaCl), fosfato monopotássico

(KH_2PO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4) em diferentes concentrações (planejamento fatorial). O cultivo será feito em duplicata (GOMES, 2011). Após o crescimento do fungo, extratos serão preparados com o caldo e com as biomassas fúngicas para a realização das análises. As biomassas serão obtidas *in natura* para análise posterior.

Pesquisa de micotoxinas: Os extratos serão submetidos à análise cromatográfica para detecção de micotoxinas eventualmente produzidas. A análise dos extratos será feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo da linha HP-1100 (Agilent, Waldbronn, DE) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de diodos (DAD). As separações serão realizadas em coluna de fase reversa Luna II C18 (100 mm x 2 mm de diâmetro interno; tamanho de partícula 3 μm ; Phenomenex, Torrance, US) com uma coluna de guarda C18 (4 mm x 2 mm de diâmetro interno, Phenomenex) (ABREU, 2010).

Análise de umidade: Amostras de aproximadamente 5 g serão pesadas em cápsulas e secadas em estufa a 105°C por 4 h. Decorrido esse tempo, as cápsulas contendo as amostras serão removidas da estufa, transferidas a um dessecador por 30 min e, posteriormente, submetidas a pesagem. O material será novamente colocado em estufa a 105°C, desta vez por 1h e o mesmo processo repetido sucessivamente até que a diferença entre duas pesagens consecutivas não ultrapasse 0,2 mg (CARVALHO *et al.*, 2010).

Teor de minerais: Amostras de aproximadamente 5 g serão pesadas em cápsulas e incineradas, utilizando o bico de Bunsen. Em seguida, as amostras serão transferidas a mufla a 560°C por 8 h. Decorrido esse tempo, as amostras com carbonização incompleta retornarão à mufla por mais 6 h. Após completa carbonização, todo o material será levado a um dessecador por uma hora e, então, pesado para fornecer os respectivos conteúdos de cinzas (CARVALHO *et al.*, 2010).

Atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio): Para avaliar a atividade antioxidante total dos extratos será empregada a metodologia de PRIETO *et al.* (1999). O extrato (0,1 mL), dissolvido em solvente (água, etanol ou hexano) será adicionado a 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico de 0,6 mol.L⁻¹, fosfato de sódio 28 m mol.L⁻¹, molibdato de amônio 4 m mol.L⁻¹). O conteúdo será misturado e incubado por 90 min a 95 °C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram lidas a 695 nm contra um branco (solvente e solução reagente). Os resultados serão expressos em equivalentes de ácido ascórbico (mmol de ácido ascórbico.L⁻¹ ou g⁻¹ extrato).

Poder redutor férrico (método do ferrocianeto): A capacidade antioxidante de reduzir íons de Ferro III será avaliada por meio do método de OYAIZU *et al.* (1986). A técnica consiste em misturar entre 0,25 mL de extratos de *M. alba* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), tampão fosfato ($0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 6,6) e 0,625 mL ferrocianeto de potássio 1 % (m/v). Após a homogeneização, as amostras serão incubadas por 20 min a 50 °C. Em seguida 0,625 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) será adicionado e a mistura centrifugada (3000 rpm, 10 min). Uma alíquota do sobrenadante (0,18 mL) será coletada e misturada com 1,8 mL de água e 0,36 mL de cloreto férrico (0,1 %, p/v). A leitura de absorbância será então realizada a 700 nm e os resultados obtidos serão convertidos em % de poder redutor férrico comparado ao padrão, ácido ascórbico.

Capacidade antioxidante de sequestro de radicais ABTS e DPPH: A avaliação de atividade de captura de radicais livres seguiu duas metodologias. A técnica de captura de radicais 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS) (JOHNSTONE *et al.*, 2006) consiste na preparação de uma solução ABTS (7 mmol.L^{-1} ABTS e persulfato de potássio $2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, incubados por 12 h, no escuro) e diluição esta solução em metanol até obter uma absorbância de $0,708 \pm 0,001$ a 734 nm. Em seguida, 1 mL dessa solução reagirá com 1 mL dos extratos ($2,5$ - $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 7 min. As leituras das absorbâncias serão realizadas a 734 nm. O método de captura de 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; RE *et al.*, 1999) consistiu em misturar suavemente os extratos (100 - $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com DPPH 0,3% (solução metanólica). A reação ocorreu por 30 min, no escuro. Em seguida, a absorbância foi medida a 517 nm. Nos dois ensaios, o ácido ascórbico foi usado como controle positivo, sendo preparado um branco com metanol/etanol no lugar dos extratos e a atividade antioxidante foi expressa como I_{50} , ou seja, a concentração de extrato necessária para capturar 50% dos radicais livres em solução.

Fenóis totais: A técnica de detecção de fenóis totais utilizada foi o método de Folin-Ciocalteu (GAO *et al.*, 2000). Essa metodologia consistiu em misturar os extratos das variedades de *M. alba* ($0,5 \text{ mL}$ - $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com 2,58 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Depois de 3 min, uma solução saturada de carbonato de sódio (0,3 mL) foi adicionada à mistura que, em seguida, foi incubada por 20 min à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 760 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (g ácido gálico/100 g extrato).

Flavonoides totais: Os flavonoides totais foram avaliados por meio do método de cloreto de alumínio (YANG *et al.*, 2007). Aliquotas dos extratos (0,5 mL), água (2,5 mL) e nitrito de sódio ($150 \mu\text{L}$) a 5 % (p/v) foram combinados, fortemente agitados em vórtex (10 s). Depois de 5 min

em repouso, 300 µL de cloreto de alumínio 10 % (p/v), 1 mL de NaOH (1 mmol.L⁻¹) e 550 µL de água foram adicionados. Esta mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 15 min. A absorbância das amostras foi lida a 510 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de quecertina (µg quecertina.g⁻¹ extrato).

Teste de ecotoxicidade contra *Saccharomyces cerevisiae* (Navarro et al., 2008): Aliquotas de 1, 0,1 e 1 x 10⁻² mL da solução contendo as substâncias serão incubadas em meio nutriente com um inóculo padronizado na escala 5 de McFarland de células leveduriformes. O crescimento dos micro-organismos será monitorado pela leitura da absorbância das soluções em leitora de ELISA. Aliquotas de uma solução contendo um poluente (inseticida orgânico) serão usadas como controle positivo. O aumento na velocidade de crescimento nas amostras contendo as substâncias em teste, em relação ao controle positivo, indica uma baixa ecotoxicidade das mesmas. Será também realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) usando-se contador digital para comprovação dos resultados. Os testes serão realizados em triplicata e o valor de inibição será obtido pela média das três medidas.

Teste de toxicidade aguda em microalgas (Volk, 2005): Este ensaio é considerado um dos testes mais apropriados para detecção de toxicidade aguda. O teste será realizado em placas de micropoços, contendo a microalga *Chlorella vulgaris* em meio de cultura DNS-10. Aliquotas contendo diluições seriadas do extrato ou da substância a ser testada serão colocadas nos poços. Os valores de inibição são proporcionais à toxicidade aguda das substâncias sobre a alga. Os testes serão realizados em triplicata e o valor de inibição será obtido pela média das três medidas.

Análise estatística: Os resultados serão avaliados por ANOVA (*one-way*) e por testes de comparação de médias (Tukey e Dunnett). Microsoft Excel 2010 (Roselle, IL, EUA) será usado para as avaliações. Correlações entre conteúdo de fenois e atividade antioxidante serão avaliados pelo coeficiente de correlação de Pearson (*r*) com P ≤ 0,05.

V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOHSEN, U. R.; GRKOVIC, T.; BALASUBRAMANIAN, S.; KAMEL, M. S.; QUINN, R. J.; HENTSCHEL, U. **Elicitação do metabolismo secundários em actinomicetos.** *Avanços em Biotecnologia* 33 (2015) 798-811.
- ABREU, L. M. **Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e estudos quimiotaxonômicos de fungos endófitos.** Tese. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química. Belo Horizonte, 2010.

- BENNETT, J. W.; KLICH, M. **Micotoxinas**. Revisões em Microbiologia Clínica, 2003, vol. 16, n. 3, p.497-516.
- BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. **Grandes efeitos de pequenas mudanças: possíveis formas de explorar a diversidade química da natureza**. ChemBioChem 2002, 3, 619-627.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30. 1999.
- CARVALHO, S.A.; COELHO, J. V.; TAKAHASHI, J. A.; **Triagem de fungos filamentosos tropicais em relação a seu potencial nutricional como fontes de proteína bruta, lipídeos e minerais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos Internacional. 2010; 0(00): 0001-0006.
- CHÁVEZ, R.; FIERRO, F.; GARCÍA-RICO, R. O.; VACA, I. **Fungos filamentosos de ambientes extremos como uma fonte promissora de novos metabólitos secundários bioativos**. Fronteiras em Microbiologia, 2015, vol. 6, artigo 903.
- GAO, X.; et al. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 1485-1490. 2000.
- GOMES, D.C. **Produção de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos**. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte, 2011.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 102: 1422 – 1432.
- ISAAC, S. 1997. Fungi naturally form many diverse biochemical products, some of which are now commercially important; how and why do they do this? *Mycologist* 11: 182-183.
- JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de Alimentos**. 5ª edição. 1996. p. 595-600.
- JOHNSTONE, C.; DAY, J. G.; STAINES, H.; BENSON, E. E. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolourisation assay for evaluating total antioxidant status. **Ecological indicators**, v. 6, p. 280-289. 2006.
- LANGLEY, D. 1997. Exploiting the fungi: Novel leads to new medicines. *Mycologist*. 11:165-167
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.
- NAVARRO, E.; et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 2008; 17(5), 372-386.
- OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315. 1986.
- PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L. & VIRET, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*. 1: 185 - 196.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341. 1999.
- STROBEL, G. & DAYSI, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 491 - 502.

- TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. A. P.; GOMES, D. G. C. **Abordagens clássica e epigenética para diversificação metabólica em fungos filamentosos.** *Molecules* (2013) 12:773-789.
- VOLK, R. Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology* 2005; 17(4), 339-347.
- WAINWRIGHT, M. 1992. Na Introduction to Fungal Biotechnology. Wiley, UK, 202pp.
- YANG, J.; PAULINO, R.; JANKE-STEDRONSKY, S.; ABAWI, F. Free-radical-scavenger activity and total phenols on noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and poder in procesing and storage. *Food chemistry*, v. 102, p. 302-308. 2007.

VI CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

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

Tabela 1. Cronograma

Atividades	Meses					
	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Treinamento em métodos microbiológicos						
Preparo de extratos e análise de umidade e teor de minerais						
Análise de micotoxinas por CLAE e dos perfis cromatográficos por CCD						
Determinação da atividade antioxidante						
Determinação de toxicidade						
Redação de Trabalhos para Congressos/Artigos/Relatórios						