

EFEITO DE MANGANÊS E COBALTO CATIÔNICOS NO METABOLISMO DE *Aspergillus* sp.

Data de aceite: 02/06/2024

Bianca Araújo dos Santos

Instituto Federal do Maranhão,
Departamento de Química
São Luís – Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/8207491229332589>

Anne Karoline Maiorana Santos

Instituto Federal do Maranhão,
Departamento de Química
São Luís – Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/6356548165575851>

Lourivaldo da Silva Santos

Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Exatas e Naturais
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/3232898465948962>

Edson Rodrigues-Filho

Universidade Federal de São Carlos,
Departamento de Química
São Carlos – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/3667941735597178>

Antônio José Cantanhede Filho

Instituto Federal do Maranhão,
Departamento de Química
São Luís – Maranhão
0000-0002-2009-2817

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um aumento de pesquisas com fungos endofíticos que são micro-organismos que vivem no interior de tecidos vegetais e que em algum momento do seu ciclo não causam danos ao hospedeiro, além de serem capazes de produzir moléculas com potencial atividade biológica (ALVES et al., 2014)

Dentre estes micro-organismos, os fungos se destacam por possuírem um reservatório biologicamente inexplorados com compostos ativos que apresentam atividade biológica, sendo uma alternativa para seu uso na produção de compostos de interesse comercial (BRAKHAGE et al., 2017). Na produção de metabólitos secundários isolados a partir de fungos, as variações no meio de cultivo, como a disponibilidade de nutrientes (fonte de carbono, nitrogênio, fosfato e oxigênio) e fatores ambientais contribuem para sua diversidade metabólica (VAID et al., 2022).

Estudos modernos que envolvem

indução metabólica através de alterações do cultivo durante crescimento do micro-organismo tais como temperatura, pH, suplementação do meio de cultura, exposição de luz UV e entres outros, podem afetar o perfil metabólico dos micro-organismos. Logo, através da ativação de novas rotas metabólicas da produção de substâncias de interesse, pode-se explorar a biodiversidade química oferecida pelos endófitos (LI et al., 2019) .

Nos últimos anos, o tratamento de doenças infecciosas oportunistas e por micro-organismos com uso de antibióticos tem sido impactada pelo surgimento de micro-organismo resistentes aos antibióticos comercializados (RIBEIRO, 2019). A utilização de compostos bioativos a partir de fungos endofíticos vem se demonstrado promissora ao combate de micro-organismos causadores de doenças infecciosa. As substâncias de grande relevância produzida pelos fungos endofítico, possuem potencial na inibição ou eliminação de patógenos bacterianos e fúngicos de plantas e humanos (SILVA et al., 2018).

Diante ao que foi exposto, o capítulo deste e-book destina-se a relatar sobre o experimento realizado com o fungo endofítico *Aspergillus* sp., isolado a partir da espécie vegetal *Dizygostemon riparius* e cultivado em meio Czapek suplementado com CoCl_2 e MnCl_2 visando modificações no perfil químico e indução de metabólitos secundários de interesse.

2. *Aspergillus* sp.

As espécies de *Aspergillus* podem ser consideradas como um gênero que produz uma ampla diversidade de metabólitos secundários, pertencentes à diferentes classes como terpenos, alcaloides, peptídeos, policetídeos e esteroides sendo que alguns deles exibiram resultados frente a testes biológicos (HE et al., 2017). Em Xu et al., (2020) foi relatado que fungos sob ambiente de extremo estresse como os de origem marinha são ricos em metabólitos secundários contendo nitrogênio básico, o que é o caso das espécies de *Aspergillus* que produzem grande número de alcaloides heterocíclicos estruturalmente únicos.

A presença de uma variedade de metabólitos secundários com atividade biológicas isolados de espécies do gênero *Aspergillus* é explicado pela sua resistência ao sal, além do seu crescimento rápido e tão facilmente obtidas de muitos substratos (BUGNI 2014).

Diversas pesquisas com extratos de micélio e caldo de cultura de fungos do gênero *Aspergillus* já demonstraram uma atividade biológica marcante como pode ser verificado em pesquisas realizadas por Henrikson et al. (2011) que produziram o extrato bruto de *A. fumigatus*, isolado de solo e verificaram atividade contra cepas de bactérias *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Monggoot et al. (2018), os extratos de acetato de etila do filtrado da cultura de *Aspergillus* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em Silva e colaboradores (2018), as frações obtidas do caldo

de fermentação do endofítico *A. fumigatus* (CBA2743) também tiveram bons resultados em sua atividade antimicrobiana.

Tais pesquisas evidenciam a importância do estudo com este gênero, sua facilidade de trabalho devido a adaptação e resistência a diversificados ambientes, inclusive os extremos e sobretudo, a aplicação de compostos biossintetizados pelo metabolismo fúngico.

2.1 Suplementação aos meios de cultivo de *Aspergillus sp.*

Com base no tempo de formação do micélio em diferentes sais halogenados e em conformidade com os dados de literatura, com o intuito de verificar a influência tanto de metais como dos halogênios no meio de fermentação, a espécie *Aspergillus sp.* foi cultivada com três caldos nutritivos diferentes. O primeiro foi o meio líquido Czapek como controle do experimento. No segundo, este meio foi acrescido com $MnCl_2$ em sua composição. E o terceiro, foi suplementado com $CoCl_2$. Após o período de incubação de 21 dias, o caldo foi submetido à partição líquido-líquido e o micélio ao processo de extração. Em seguida, os respectivos extratos foram concentrados em evaporador rotativo. Por fim, foi realizado o fracionamento dos extratos brutos, seguido da análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e posteriormente, cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detector de arranjo de diodos (UHPLC-DAD).

Na análise dos cromatogramas por UHPLC, observou-se que as frações 01, 02 e 03 tanto para o controle quanto para os meios suplementados possuíam baixa diversidade de metabólitos conforme as Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. No entanto, a fração MnMF1 (Figura 1), oriunda do cultivo suplementado com $MnCl_2$ destacou-se em relação às demais frações, pois apresentou um pico de uma substância induzida ($TR \cong 5,57$ min) que não está presente no controle CMF1. Além de uma substância suprimida no controle ($TR \cong 7,24$ min) que não é observado nos cromatogramas dos meios modificados.

Para as frações “02”, foi possível verificar no cromatograma da fração $CoMF_2$ (Figura 2), a presença de uma substância induzida ($TR \cong 7,19$ min), que não foi observada no controle e no meio suplementado com $MnCl_2$ (CMF_2 e MnF_2). Na figura 3, a fração $CoMF_3$ possui maior diversidade de metabólitos, destacando-se os picos com tempo de retenção entre 6,9 min e 9,90 min.

Na figura 4, nota-se uma semelhança no perfil cromatográfico das frações oriundas do cultivo com a suplementação dos sais halogenados, uma vez que os cromatogramas referentes às frações $CoMF_4$ e $MnMF_4$ foi possível observar picos referentes a substâncias induzidas com tempos de retenção de 9,39 à 9,93 min que não são observadas no controle CMF_4 .

Figura 1: Cromatogramas comparativos obtidos do UPLC-DAD à 280 nm das frações $CoMF_1$, $MnMF_1$ e $CoMF_1$.

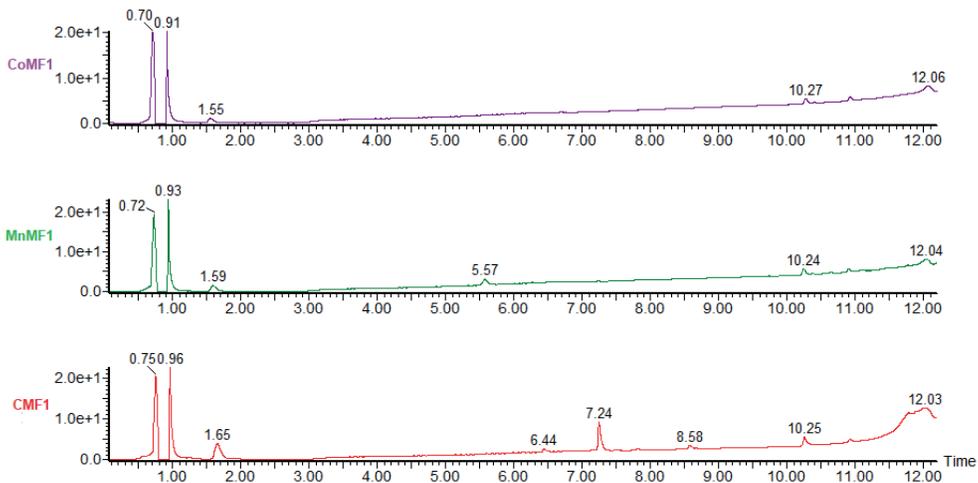


Figura 2: Cromatogramas comparativos obtidos do UPLC-DAD à 280 nm das frações $CoMF_2$, $MnMF_2$ e $CoMF_2$.

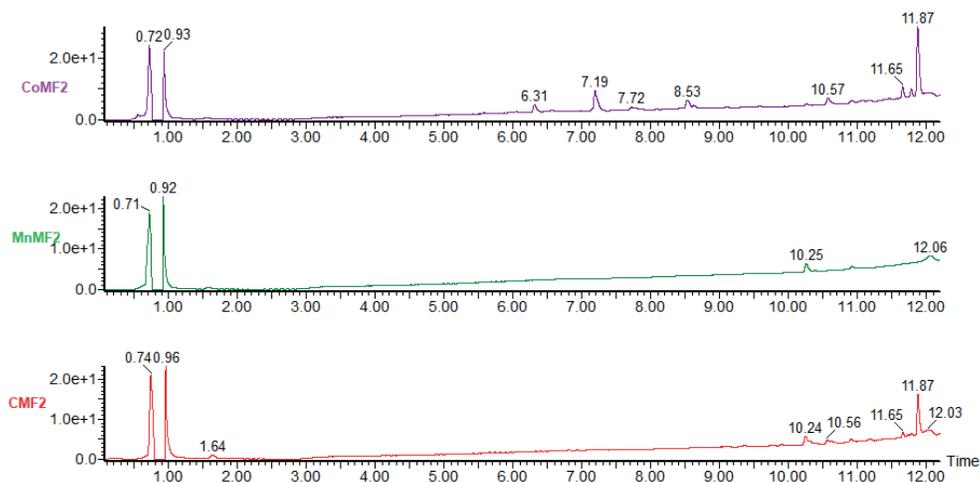


Figura 3: Cromatogramas comparativos obtidos do UPLC-DAD à 280 nm das frações CMF_3 , MnMF_3 e CoMF_3 .

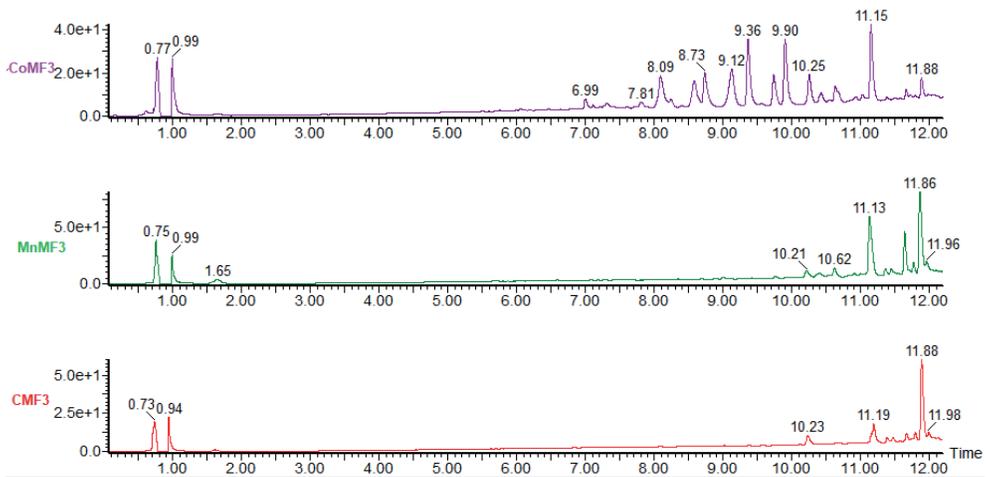
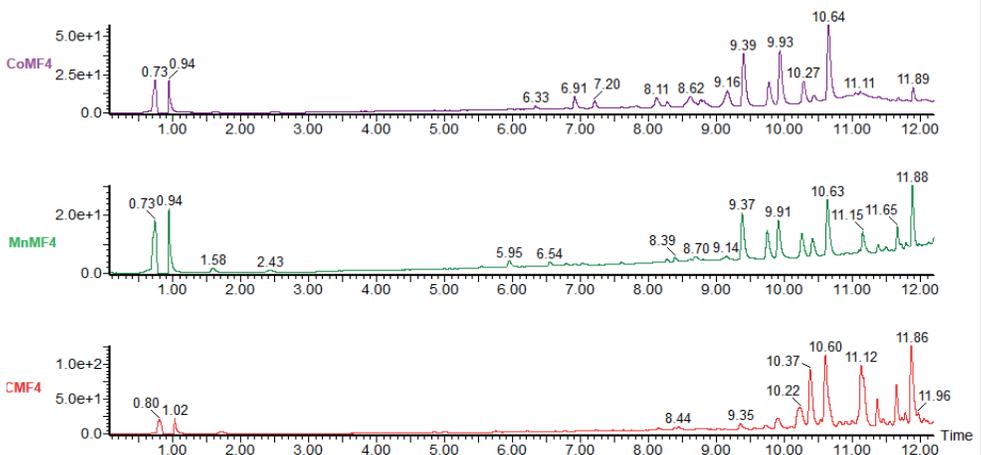


Figura 4: Cromatogramas comparativos obtidos do UPLC-DAD à 280 nm das frações CMF_4 , MnMF_4 e CoMF_4 .



Mediante a modificação no meio de cultivo com a suplementação de sais halogenados, pode-se verificar um aumento da diversidade metabólica (indução de metabólitos) com o aparecimento de novas bandas nos cromatogramas na maioria das frações obtidas do cultivo suplementado com os sais CoCl_2 e MnCl_2 . Em estudos realizados por (LOTFY et al., 2021) os extratos derivados de *Aspergillus awamori* em diferentes condições de fermentação mostraram uma enorme diversidade de metabólitos secundários após análises por Espectroscopia de Massas de Alta Resolução (HRMS).

3. INDUÇÃO AO METABOLISMO DE FUNGOS

A variação das condições de crescimento do fungo endofítico, como composição, pH, temperatura ou forma do recipiente de cultura podem levar a influência no rendimento de certos compostos devido a mudanças no perfil do metabolismo de uma cepa fúngica (YNUITAI et al., 2018).

Fungos endofíticos cultivados em meios com halogênios podem induzir a ativação de novos metabólitos secundários. Os halogênios podem influenciar os genes ou as enzimas do micro-organismo que envolve a biossíntese de polipeptídios de forma que aumentem a produção de metabólitos dos fungos (LOTFY et. al, 2021). Conseqüentemente, o aumento da diversidade de compostos químicos para os diferentes setores industriais está associado com a exploração da biodiversidade microbiana além de muitos benefícios científicos esperados como resultados dessa exploração (NICOLETTI et. al., 2016).

Em trabalhos realizados por QUANG et al. (2020) demonstrou-se que o fungo de origem marinha *Trichoderma* sp. quando cultivado em água com sais halogenados, produziu novas substâncias do tipo epifítico dicetopiperazinas halogenadas. A seleção de sais de halogênios em estudo na indução do metabolismo no fungo endofítico *Aspergillus aculeatus* causou uma alteração significativa de metabólitos padrão do fungo endofítico, no qual rendeu vários novos conjugados de L-triptofano e L-ácido láctico em estudos realizados por WANG et al., 2018.

4. CONCLUSÃO

A análise da biomassa verificadas através das técnicas analíticas cromatográficas como UPLC-DAD dos meios de cultivo em Czapek suplementados com sais halogenados mostraram que houve alterações no metabolismo do micro-organismo *Aspergillus* sp., essas alterações, podem estar relacionadas à presença dos cátions metálicos de (Mn e Co) em supressão ao cátion de ferro (Fe) no meio Czapek (controle). Portanto pode-se inferir que o micro-organismo mostrou sensibilidade quanto as alterações no meio de cultivo.

O presente estudo mostrou que os diferentes perfis químicos sugerem que possivelmente a suplementação do meio de cultivo por adição de sais inorgânicos alteraram a rota biossintética de micro-organismos, seja pelos cátions metálicos presentes ou pelos ânions de halogênios, que são os pilagres da abordagem OSMAC (One Strain Many Compounds), ou seja, que uma única cepa possa produzir uma rica diversidade de metabólitos secundários. Portanto se faz necessário mais estudos para verificação dos fatores que ocasionaram as mudanças no perfil químico apresentado. Se faz ainda necessário o cultivo em larga escala para isolamento das substâncias induzidas e/ou suprimidas. Dessa forma os resultados obtidos são satisfatórios e se mostram como uma ferramenta biotecnológica para a exploração de micro-organismos endofíticos.

Esta pesquisa foi realizada com apoio da Capes por meio do Edital nº21/2018 (Programa de Cooperação Acadêmica na Amazônia – Procad-AM).

REFERÊNCIAS

ALVES, G. F. et al. Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14,n. 7, p 34-38, 2012.

BRAKHAGE, A. A. Regulação do metabolismo secundário dos fungos. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, pág. 21-32, 2013.

BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat Prod Rep**. Feb;21(1):143-63, 2014.

HENRIKSON, J. C.; ELLIS, T. K.; KING, J. B.; CICHEWICZ, R. H. Reappraising the structures and distribution of metabolites from black aspergilli containing uncommon 2-benzyl-4H-pyran-4-one and 2-benzylpyridin-4(1H) -one systems. **Journal of Natural Products**. Ago;74(9), 1959–1964, 2011.

HU, X.; XIA, Q. W.; ZHAO, Y.Y.; ZHENG, Q. H.; LIU, Q.Y.; CHEN, L.; ZHANG Q. Q. Speradines F–H, three new oxindole alkaloids from the marine-derived fungus *Aspergillus oryzae*. **Chem. Pharma**. Bull. 2014.

LI, F. Y.; WANG, Y. H.; LIU, J. B.; LI, Y. X.; LI, Z. M. Synthesis, insecticidal evaluation and mode of action of novel anthranilic diamide derivatives containing sulfur moiety as potential ryanodine receptor activators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 27(5), 769–776, 2019.

LOTFY, M. M.; SAYED, A. M.; ABOULMAGD, A. M.; HASSAN, H. M.; EL. A. D.; ABOUZID, S. F.; EL-GENDY, A. O.; RATEB, M. E.; ABDELMOHSEN, U. R.; ALHADRAMI, H.; MOHAMMED, R. Metabolomic profiling, biological evaluation of *Aspergillus awamori*, the river Nile-derived fungus using epigenetic and OSMAC approaches. **RSC Advances**. 11(12), 6709–6719, 2021.

MONGGOOT, S.; PICHAITAM, T.; TANAPICHATSAKUL, C.; PRIPDEEVECH, P. Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrephora wangii*. **Arch Microbiol** :951-959, 2018.

NICOLETTI, R.; TRINICONE, A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. **Marine drugs**, v. 14(2), 37, 2016.

QUANG, T. H.; PHONG, N. V.; ANH, L. N.; THI, T.; HANH, H. Secondary metabolites from a peanut-associated fungus *Aspergillus niger* IMBC-NMTP01 with cytotoxic , anti-inflammatory , and antimicrobial. **Nat. Prod. Res.** 1–9., 2020.

RIBEIRO, S.F.L.; GARCIA, A. da C.; SANTOS, H.E.D.; MONTOYA, Q.V.; RODRIGUE, A.; OLIVEIRA, J.M.; OLIVEIRA, C.M. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi from *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kujit (Mistletoe). **African Journal of Microbiology Research** Vol. 12(11), p. 263-268, 21, 2018.

SILVA, I. M.; OGUSKU, M. M.; CARVALHO, C.M.; MAKI, C.S.; RUDI, P.R. Metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus* and their in vitro effect against the causal agent of tuberculosis. **Acta Amaz.** 48(1):63–69, 2018.

VAID, S.; SHARMA, S.; DUTT, HC; MAHAJAN, R.; BAJAJ, B.K. An eco-friendly novel approach for bioconversion of *Saccharum spontaneum* biomass to biofuel-ethanol under consolidated bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 363, p. 127784, 2022.

XU, K.; YUAN, X.L.; LI, C.; LI, A.X. Recent Discovery of Heterocyclic Alkaloids from Marine-Derived *Aspergillus* Species. **Mar Drugs**. 14;18(1):54, 2020.