

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



PRESIDENTE DA REPÚBLICA
Jair Messias Bolsonaro

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
Marcos César Pontes

DIRETORA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Antonia Maria Ramos Franco Pereira

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



Manaus
2019

Copyright © 2019, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Capa

Tito Fernandes e Rodrigo Verçosa

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Rodrigo Verçosa

EDITORA INPA

Editor-chefe

Mario Cohn-Haft.

Produção editorial

Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia / Organizador Luiz Antonio de Oliveira... [et.al].--

Manaus: Editora INPA, 2019.

35 mb, v. 3: il. color.

ISBN 978-65-5633-000-6

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Av. André Araújo, 2936, Petrópolis

Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil

Tel : 55 (92) 3643-3223

www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

Produção de pigmentos do tipo azafilonas por *Penicillium sclerotiorum*

Danielle Rolim Guimarães¹, Thiago Fernandes Sousa¹, Célio Fernando Figueiredo Angolini², Afonso Duarte Leão Souza³, Felipe Moura Araújo da Silva³, Antonia Queiroz Lima de Souza⁴, Gilvan Ferreira da Silva⁵, Hector Henrique Ferreira Koolen⁴

¹ Discentes da Graduação em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

² Pesquisador da Universidade Estadual de Campinas

³ Pesquisador e Docente do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas

⁴ Pesquisadores e Docentes do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas

⁵ Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

Emails: drg.bio17@uea.edu.br, hkoolen@uea.edu.br

Resumo

Fungos são seres vivos que apresentam grande importância ecológica, econômica e industrial. Estes são conhecidos por serem capazes de biossintetizar metabólitos secundários úteis, especialmente para as indústrias farmacêutica e alimentícia. Dentre os biocompostos produzidos por esses organismos estão as azafilonas, pigmentos naturais com atividade antimicrobiana extraídos de fungos de diversos gêneros, entre eles o *Penicillium*. Considerando o potencial biotecnológico das espécies deste gênero e dos metabólitos produzidas por elas, este trabalho apresenta técnicas indutoras de desvios metabólicos (OSMAC) utilizadas no cultivo do fungo *Penicillium sclerotiorum*, endofítico isolado da planta *Duguetia stelechantha* (Annonaceae). Por meio desta estratégia, concluiu-se que meios pobres em carbono estimulam o acúmulo de pigmentos nas células. Por meio da espectrometria de massas, cinco azafilonas foram identificadas como os constituintes majoritários do extrato.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, pigmentos, policetídeos.

Introdução

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos internos das plantas por pelo menos um período do seu ciclo de vida sem causar sintomas visíveis. Neste tipo de associação mutualística ocorre uma especializada e complexa comunicação química na qual nenhum dos parceiros interagentes é prejudicado. Além disso, benefícios individuais ocorrem para ambos os organismos (Zhang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Kusari *et al.*, 2012).

Estes organismos vêm sendo amplamente investigados quimicamente por sua capacidade de biossintetizar metabólitos secundários das mais diversas classes. Substâncias estas, que em certas situações podem ser utilizadas pela hospedeira como uma defesa química (Zhang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011; Kusari *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2015; Spiteller, 2015).

Em outras situações, os fungos incorporam parte do material genético de sua hospedeira operando como verdadeiros produtores de metabólitos especializados outrora apenas produzidos pelas plantas (Zhang *et al.*, 2006). Vários desses metabólitos são fármacos de interesse industrial, o que só aumenta o interesse biotecnológico por estes organismos. Alguns exemplos clássicos desta interação denominada transferência gênica horizontal são a produção de paclitaxel por *Taxomyces andreae* (Stierle *et al.*, 1993) e de desoxipodofilotoxina por *Aspergillus fumigatus* (Kusari *et al.*, 2009).

Dentre os fungos mais frequentemente encontrados como endofíticos, destacam-se os representantes do gênero *Penicillium* (Zhang *et al.*, 2006; Mapari *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011). Estes organismos são responsáveis por produzir, em determinadas circunstâncias, grandes quantidades de metabólitos secundários com as mais diversas atividades, tais como antibacteriana, anticâncer, antifúngica, inseticida,

herbicida, dentre outras. Além deste potencial, este gênero destaca-se pela produção de pigmentos das mais variadas cores e classes químicas (Guo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013).

Dentre os principais pigmentos com potencial na indústria alimentícia isolados de *Penicillium* spp. encontram-se moléculas como: citromicetina, viomeleína e em especial, uma série de compostos denominados azafilonas, tendo como principal representante o composto monascorubrina (Figura 1).

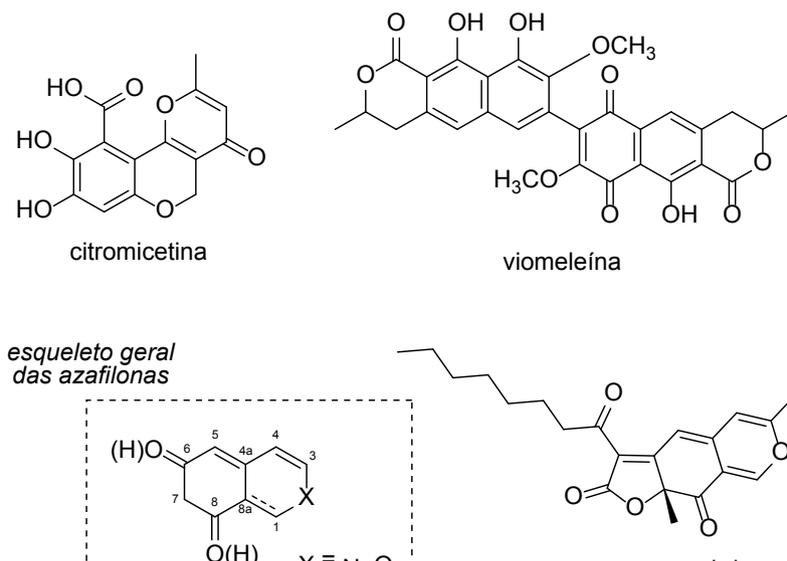


Figura 1. Estruturas químicas de alguns pigmentos fúngicos não-tóxicos e estrutura geral das azafilonas.

Na Ásia, esta classe de compostos é utilizada há séculos para colorir o arroz (Mapari *et al.*, 2010). Além do potencial colorífico, certas azafilonas possuem variadas propriedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e redutora do colesterol, esta última responsável por incluir esta classe como um nutraceutico (Mapari *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho foi utilizar uma abordagem de OSMAC (*One Strain Many Compounds*) no cultivo do fungo endofítico *Penicillium sclerotiorum*, variando os meios de cultura e a oxigenação com o intuito de otimizar a produção de metabólitos secundários do mesmo.

Material e Métodos

O fungo *Penicillium sclerotiorum* (código DgC3.2.2) foi isolado no Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos (LABMICRA) da Universidade Federal do Amazonas a partir do caule da planta *Duguetia stelechantha* (Annonaceae). Para esta etapa, o material vegetal (fragmentos de 5 mm x 5 mm) passou por assepsia em uma câmara de fluxo laminar. O procedimento ocorreu por meio de imersão em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2.5% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 2 minutos (Souza *et al.*, 2004). Ao final, os fragmentos foram lavados por imersão em água destilada esterilizada e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de ágar) com o antibiótico terramicina a 4%. Após o inóculo, as placas foram incubadas em câmaras do tipo demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 26 °C, e a cada 24 horas foi realizada a verificação do crescimento fúngico, seguido de sucessivos repiques.

A purificação das cepas fúngicas se deu por meio da obtenção de culturas monospóricas. Esta etapa foi feita através de diluições seriadas dos esporos (Petrini *et al.*, 1993). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (De Capriles *et al.*, 1989) e depositadas na coleção de microrganismos do LABMICRA e cedida pela Dra. Antonia Souza para o Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA.

A caracterização em nível de gênero foi realizada por microcultivo e análise das estruturas reprodutivas por microscopia ótica. Em seguida, o isolado monospóricico foi cultivado em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação a 150 rpm e 28 °C para obtenção de massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% (Doyle e Doyle, 1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m), quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluída para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), (Arnheim *et al.*, 1990). Os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 700 pares de bases correspondentes à região ITS. Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl₂; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 μL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57 °C por 1 min., extensão a 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min.

Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. o Alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram depositadas no GenBank.

Para a avaliação das condições de cultivo, esporos do fungo *P. sclerotiorum* (50 μL) foram inoculados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de diferentes meios de cultura (Tabela 1). Os cultivos ocorreram a 26 °C avaliando-se a influência de oxigenação constante (agitação em shaker à 180 rpm) e reduzida (estático) durante 28 dias.

Após este período, uma filtração a vácuo foi realizada para separar o micélio do caldo fermentado. Em seguida, o meio líquido contendo os metabólitos foi extraído com acetato de etila por meio de procedimento de partição líquido-líquido (125 mL, 1:1 v/v), enquanto que os metabólitos presentes no micélio foram extraídos com metanol (125 mL).

Tabela 1. Diferentes meios de cultura para a variação da fonte de carbono e condições de cultivo de *P. sclerotiorum* (DgC3.2.2).

Meio de cultura	Composição em água	Fonte primária de carbono
BDL	batata (200 g/L) D-glicose anidra (20 g/L) extrato de levedura (2 g/L)	carboidratos livres (glicose, arabinose, xilose), polissacarídeos (pectina)
ISP2	amido de milho (4 g/L) extrato de levedura (4 g/L) extrato de malte (10 g/L)	polissacarídeos (amilose e amilopectina)
Czapek modificado	D-glicose anidra (10 g/L) sulfato de ferro III (10 mg/L) nitrato de sódio (3 g/L) fosfato de potássio bibásico (1 g/L) sulfato de magnésio (500 mg/L) cloreto de potássio (500 mg/L)	carboidrato livre (glicose)
Malte	extrato de malte (20 g/L)	dissacarídeo (maltose)
Meio de Carne	extrato de carne (20 g/L) D-glicose anidra (20 g/L)	hidrolisado proteico (aminoácidos)

As caracterizações dos pigmentos produzidos foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS 6550 iFunnel da Agilent, constituído de um cromatógrafo de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). A técnica de ionização utilizada foi a eletrospray (ESI) e os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem do capilar, 4000 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 275 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. A temperatura do auto-amostrador foi mantida a 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (Dimensões 50 mm x 4.6 mm, diâmetro da partícula 2.7 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30 °C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a uma vazão de 0,4 mL/min. As identificações foram realizadas por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS em comparação com a literatura adequada. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o software Mass Hunter Qualitative Analysis versão B.07.00.

Ao final, o solvente foi removido por meio de roto-evaporação à vácuo e os extratos totalmente secos em dessecadores contendo sílica granular para remoção da umidade. O rendimento de produção de pigmento foi calculado em porcentagem através da equação:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{\text{massa da fonte de carbono}}{\text{massa de extrato obtido}} \times 100\%$$

Resultados e discussão

A avaliação da produção de pigmentos foi realizada por meio do cálculo de rendimento de extrato obtido contendo metabólitos (azafilonas). Inicialmente observou-se que durante o crescimento fúngico os pigmentos eram acumulados nas células (micélio) e que ao longo do tempo de crescimento estes eram excretados para o meio de cultura. Também se observou que a produção dos pigmentos (alteração nos padrões de cor) atinge seu ponto máximo a partir do vigésimo terceiro dia, fato este que se deu pela observação da mudança de intensidade da cor do meio de laranja claro para um vermelho escuro em um período de 72 horas (Figura 2).

Após verificadas as condições do tempo de cultivo, extratos foram produzidos para cada condição ao fim de 28 dias. Em relação ao total da massa do extrato obtida a partir do caldo fermentado (extrólitos), o cultivo no meio ISP2 sob agitação foi o mais promissor. Nesta situação, foram obtidos 747 mg de extrato de pigmentos, o que representa um rendimento de 4,15% (m/m).

Entretanto, o meio em Czapek em modo estático, ainda que menos rico em nutrientes e com pouca oxigenação nesta condição, apresentou a recuperação de 519 mg de extrato. Considerando a massa de fonte de carbono que neste último é apenas a glicose, este é o meio com o maior rendimento. Foram

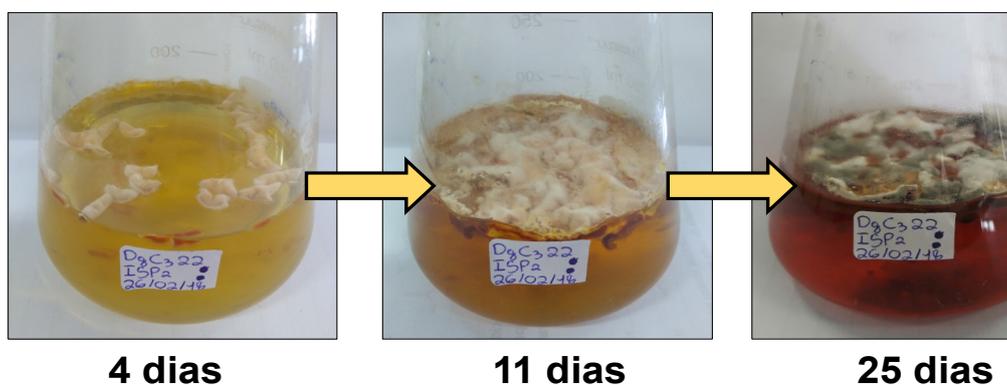


Figura 2. Crescimento estático do isolado no meio de cultura ISP2 no qual pode-se observar a pigmentação do meio.

recuperados do caldo, cerca de 5,19% (m/m) da massa fornecida na forma de pigmentos. No geral, houve alternância no modo de fermentação. Para o cultivo estático, os meios de cultura BDL e Czapek foram melhores, enquanto que os meios ISP2 e extrato de carne proporcionaram mais pigmentos sob agitação. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam rendimentos comparáveis aos das produções de azafilonas pelos fungos *Penicillium* sp. TA85S (Ogihara *et al.*, 2000) e ao da recém descoberta espécie *Talaromyces atroseus* (Frisvad *et al.*, 2013).

Tendo em vista que os pigmentos estudados neste trabalho foram excretados para o meio fermentado a partir da segunda semana, os micélios também foram analisados quanto ao seu rendimento. Para os cultivos estáticos, o micélio acumulou mais pigmentos em todos os meios de cultura, com exceção do Czapek. Curiosamente, quando submetido à agitação, o mesmo meio passou a ter o maior rendimento, cerca de 12,8% (m/m). Desta forma, escolheu-se o meio em Czapek para as identificações das azafilonas presentes mediante cultivo sob agitação e nas células desta cepa (micélio, metabólitos intracelulares).

Ao ser submetida às análises por LC-MS/MS, o extrato do micélio de *P. sclerotiorum* em Czapek apresentou uma alta complexidade. Em torno de 30 picos foram detectados por espectrometria como sendo constituintes válidos deste extrato (Figura 3). A interpretação manual dos espectros de íons produtos indicou que a amostra é realmente dominada por azafilonas. Surpreendentemente, todos os picos que possuem relação com azafilonas apresentaram moléculas protonadas ($[M + H]^+$) com razão massa/carga (m/z) pares e padrão isotópico condizente à presença de um átomo de cloro na estrutura, estratégia que adotamos inspirada em metodologias recém descritas (Allard *et al.*, 2016), mas até então, não aplicadas para pigmentos do tipo das azafilonas.

O fato de apresentarem m/z pares confirmou que se tratam de azafilonas com um número ímpar de nitrogênios em suas estruturas (regra do nitrogênio). A análise dos dados obtidos de fragmentação por meio do experimento de varredura de íons produtos permitiu a identificação de cinco azafilonas cloradas neste extrato (Figura 3). Utilizando-se como modelo a fragmentação em fase gasosa do pico majoritário, a esclerotioramina (3), foram identificadas as azafilonas: isocromofilona VI (1), isocromofilona IX (2), 2(6H)-Isoquinolineacetic acid, 7-(acetyloxy)-5-chloro-3-(3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl)-7,8-dihydro- α ,7-dimethyl-6,8-dioxo- (4) e Pentanedioic acid, 2-[7-(acetyloxy)-5-chloro-3-(3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl)-7,8-dihydro-7-methyl-6,8-dioxo-2(6H)-isoquinolinyl]- (5). Estas azafilonas foram identificadas em algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Monascus* e *Penicillium* (Gao *et al.*, 2013).

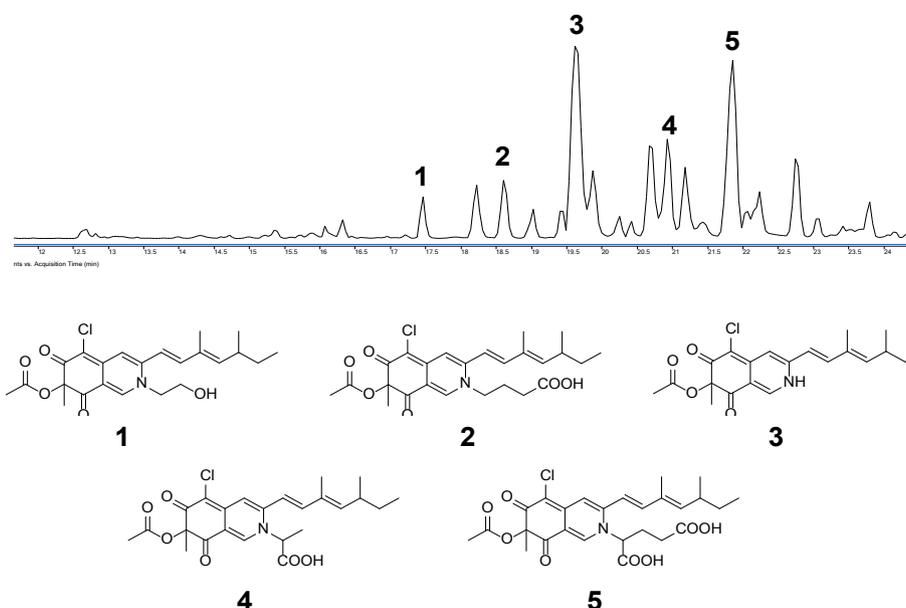


Figura 3. Cromatograma de íons totais da análise por LC-MS/MS do extrato de pigmentos produzido por *Penicillium sclerotiorum* em meio Czapek e estruturas das azafilonas identificadas.

Conclusões

A linhagem endofítica de *Penicillium sclerotiorum* é uma prolífica produtora de pigmentos com potencial biotecnológico.

Ao aplicar-se a técnica de OSMAC, verificou-se que uma fonte pobre de carbono baseada em glicose e que nela o nitrogênio fosse inorgânico permitiu a produção de metabólitos complexos. Nesta condição os pigmentos ficaram retidos em sua maioria no micélio (metabólitos intracelulares), possivelmente como reserva de carbono.

A análise química da condição com maior rendimento de produção revelou a presença de azafilonas nitrogenadas e cloradas como moléculas dominantes no extrato.

Referências

- Allard PM, Péresse T, Bisson J, Gindro K, Marcourt L, Pham VC, Roussi F, Litaudon M, Wolfender JL 2016. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry*, 88(6):3317-3323.
- Arnheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *BioScience*, 40(3):174-182.
- De Capriles CH, Mata S, Middelveen M 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106(1):73-79.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1):11-15.
- Frisvad JC, Yilmaz N, Thrane U, Rasmussen KB, Houbraken J, Samson RA 2013. *Talaromyces atroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PLoS ONE*, 8(12):84102.
- Gao JM, Yang SX, Qin JC 2013. Azaphilones: Chemistry and biology. *Chemical Reviews*, 113(7):4755-4811.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K 2008. Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2):136-142.
- Huang H, Feng X, Xiao Z, Liu L, Li H, Ma L, Lu Y, Ju J, She Z, Lin Y 2011. Azaphilones and p-terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the south China sea. *Journal of Natural Products*, 74(5):997-1002.
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7):792-798.
- Kusari S, Zühlke S, Spiteller M 2009. An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues. *Journal of Natural Products*, 72(1):2-7.
- Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS 2010. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28(6):300-307.
- Meng L, Sun P, Tang H, Li L, Draeger S, Schulz B, Krohn K, Hussain H, Zhang W, Yi Y 2011. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2):163-165.
- Meng LH, Li XM, Liu Y, Wang BG 2015. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3c]-pyrrole-4,5-dione derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters*, 26(5):610-612.
- Ogihara J, Kato J, Oishi K, Fujimoto Y, Eguchi T 2000. Production and structural analysis of PP-V, a homologue of monascorubramine, produced by a new isolate of *Penicillium* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 40(5):549-554.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3): 185-196.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Spiteller P 2015. Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports*, 32(7):971-993.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105):214-216.
- Zhang WH, Song YC, Tan RX 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5):753-771.