



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

CICLOPEPTÍDEOS DE *Pseudofusicoccum* sp., UM FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Manilkara* sp.

C. G. DE SOUZA^{1,3}, A.C.M.SOBREIRA^{2,3}, F.S.A. ARAÚJO³, F.C.O. FREIRE³, K.M. CANUTO³, E.S DE BRITO³

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química

³Embrapa Agroindústria Tropical

E-mail: carolinegondimdesouza@hotmail.com

RESUMO – *Os fungos endofíticos são uma rica fonte de metabólitos de importância agrícola e farmacêutica, por isso o presente estudo teve como objetivo identificar quimicamente os metabólitos secundários produzidos pelo fungo Pseudofusicoccum sp., isolados dos galhos de Manilkara sp. visando identificar o potencial biotecnológico da linhagem em produzir substâncias de interesse industrial. Inicialmente, o fungo foi cultivado em caldo batata-dextrose a 28°C e sem agitação durante 24 dias. Após o período de fermentação, o caldo fúngico foi separado do micélio por filtração. O extrato foi obtido por partição líquido-líquido com acetato de etila. Através da cromatografia líquida e espectrometria de massas foi possível identificar dois compostos majoritários: Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile e Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu. Estudos anteriores mostraram que o Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile tem ação contra células cancerígenas.*

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais (extratos vegetais e microbianos) promove a descoberta de novas substâncias bioativas e estabelece uma busca por processos industriais sustentáveis a partir de fontes renováveis. Alguns fármacos bem conhecidos são derivados de fungos como, por exemplo: os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossuppressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros. Entre os fungos, os endofíticos (micro-organismos não patogênicos associados a plantas) representam uma fonte promissora de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 2000 substâncias descritas, sendo que destas 51% apresentam estruturas químicas inéditas e 80% atividade biológica (CHAPLA, BIASETTO e ARAÚJO, 2013). Nas últimas três décadas, o potencial biológico dos fungos endofíticos tem sido estudado e considerado como uma fonte importante para a obtenção de metabólitos secundários (compostos bioativos), inclusive em substituição a plantas, com amplas possibilidades de utilização na indústria farmacêutica e na agricultura (FREIRE, VASCONCELOS e COUTINHO, 2014). Como exemplo temos o paclitaxel (Taxol®), um diterpeno, utilizado no

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



tratamento clínico de câncer de mama, ovário e sarcoma de Kaposi e tradicionalmente isolado da planta *Taxus brevifolia*, tem sido alternativamente obtido de fungos encontrados nessa mesma espécie e de outras plantas-hospedeiras. A razão para isto é que a via biotecnológica permitiria a preservação da planta, que neste caso está ameaçada de extinção, promovendo assim a possibilidade de maiores rendimentos através do melhoramento genético das cepas fúngicas, bem como menores custos ambientais e financeiros devido a menores demandas hídricas e de terras (ZHOU *et al.*, 2010). Diante do exposto, nota-se o enorme potencial biotecnológico que os fungos endofíticos possuem em produzir diversas classes de compostos bioativos e o seu grande interesse em virtude da aplicabilidade dos seus metabólitos secundários em vários seguimentos industriais. Por este motivo, a prospecção de linhagens de fungos endofíticos produtores de moléculas de interesse comercial, bem como a identificação de novas substâncias bioativas, tem impulsionado várias pesquisas (KUSARI *et al.*, 2014).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar quimicamente os metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Pseudofusicoccum sp.*, isolados dos galhos de *Manilkara sp.* visando identificar o potencial biotecnológico da linhagem em produzir substâncias de interesse industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação do fungo

A cepa fúngica MSB-642 foi isolada de galhos da planta *Manilkara sp.* Sapotaceae, coletado no município de Crato-CE. O fungo foi identificado morfológicamente por microscopia óptica como sendo *Pseudofusicoccum sp.* A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. Francisco das Chagas de Oliveira Freire, no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza/ CE).

2.2 Cultivo e obtenção do extrato fúngico

Inicialmente, o fungo foi repicado para o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) em placa de Petri, e então incubado em BOD a 28°C e foto-período de 12 horas claro e 12 horas escuro por 5 dias. Após este período, foi realizado o corte de 5 discos de 5,5mm do meio contendo o fungo, estes discos foram repicados para 300 ml de caldo batata e dextrose. O tempo de fermentação foi de 24 dias sem agitação, período no qual foram mantidas às mesmas condições de temperatura e foto-período descritas anteriormente. Após a fase de fermentação, o caldo fúngico foi separado do micélio por filtração. O extrato fúngico foi obtido por partição líquido-líquido do caldo com acetato de etila (AcOEt) (3x100ml). A fase aquosa foi descartada, enquanto que as fases orgânicas foram reunidas, tratadas com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para remoção da umidade residual, filtradas e destiladas a pressão reduzida em um evaporador IKA® RV10 control (Staufen, Germany), a 40 °C, resultando em um sólido de cor marrom.

2.3 Espectros de massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em sistema UPLC-ESI-QTOF-MS/MS da marca Waters, modelo Acquity® UPLC/XEVO® (Milford, MA, USA), acoplado a um analisador em série tipo quadrupolo/tempo de voo (QToF). No UPLC foi utilizada uma coluna Acquity UPLC® BEH C-18 - Waters (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) com um fluxo de 0,4 mL/min a 40°C e volume de injeção da amostra de 5 µL. O sistema de eluente utilizado foi uma combinação de água acidificada (0,1 % de ácido fórmico/L) e acetonitrila acidificada (0,1% de ácido fórmico/L). O gradiente variou linearmente de 5 a 95% de acetonitrila (v/v) em 15 min. Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo e negativo numa faixa de massas de 50-1180 Da. O espectrômetro operou nas seguintes condições: programação MSE centróide, sob rampa de tensão de 20 a 40V. A pressão do “drying gas” foi de 35 psi e temperatura de 37°C e a pressão do gás de nebulização foi de 40 psi. Foram utilizadas tensões capilares de 3500 V tanto para o modo positivo (PI) quanto para o negativo (NI) e tensões escudo de pulverização de 600V. As amostras foram dissolvidas em água ou metanol, na concentração de 1mg/ml, e filtradas em membranas de teflon Millipore® com poros de 0,22 µm. Os valores das massas observados e os cálculos de erros (inferior a 10 ppm) foram obtidos através do software *MassLynx* V4.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partição líquido-líquido do caldo do fungo MSB-642 resultou na obtenção de 21,5 mg de extrato acetato de etila, correspondendo a um rendimento de 71,7 µg/mL. Substâncias fúngicas bioativas tidas como paclitaxel, camptotecina têm sido obtidas com rendimentos variáveis, mas em geral na ordem de algumas dezenas de µg/mL. Entretanto, os rendimentos são muito dependentes das condições de crescimento do fungo tais como meio de cultura, pH, aeração, temperatura, tempo de cultivo, etc (CANUTO *et al.*, 2012). O cromatograma do extrato AcOEt, obtido no sistema UPLC-ESI-QTOF-MS-MS no modo positivo, revelou 2 picos cromatográficos majoritários, após subtração dos picos pertencentes ao branco (Figura 1). Os dois picos majoritários com tempos de retenção de 10,52 (1) e 10,98 min (2) foram quimicamente caracterizados a partir de dados de suas massas exatas massa/carga (m/z), com suas respectivas fórmulas moleculares, e subsequente comparação com dados da literatura.

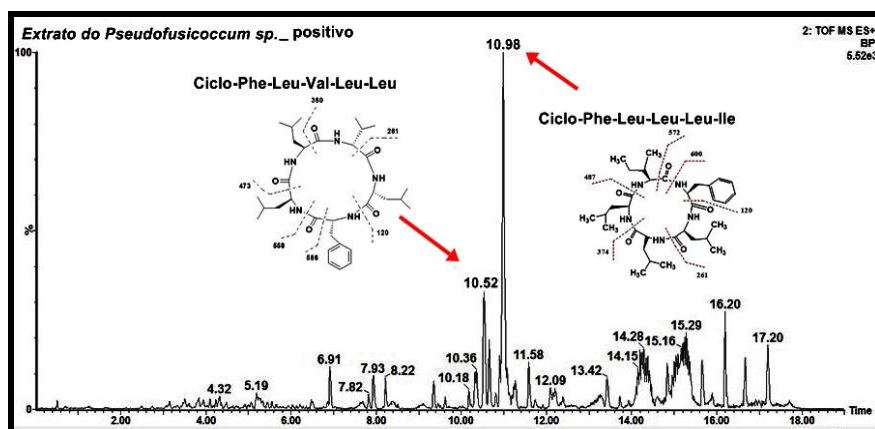


Figura 1- Espectro de massas observado em UPLC-ESI-QTOF-MS-MS no modo positivo.

3.1 Identificação do Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu

O espectro de massas de alta resolução do composto **1** (Figura 2), exibiu o íon correspondente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 608,3744 indicando a fórmula molecular $C_{32}H_{51}N_5O_5Na$ (valor calculado m/z 608,3788; erro = -7,2 ppm). No espectro de massas de **1** (Figura 2) observou-se que a molécula continha resíduos de aminoácidos, ao se subtrair os m/z dos fragmentos, resultando em valores característicos para 1 unidade de fenilalanina (Phe), 3 unidades de leucina (Leu) e 1 unidade de Valina (Val), conforme ilustrado na Tabela 1.

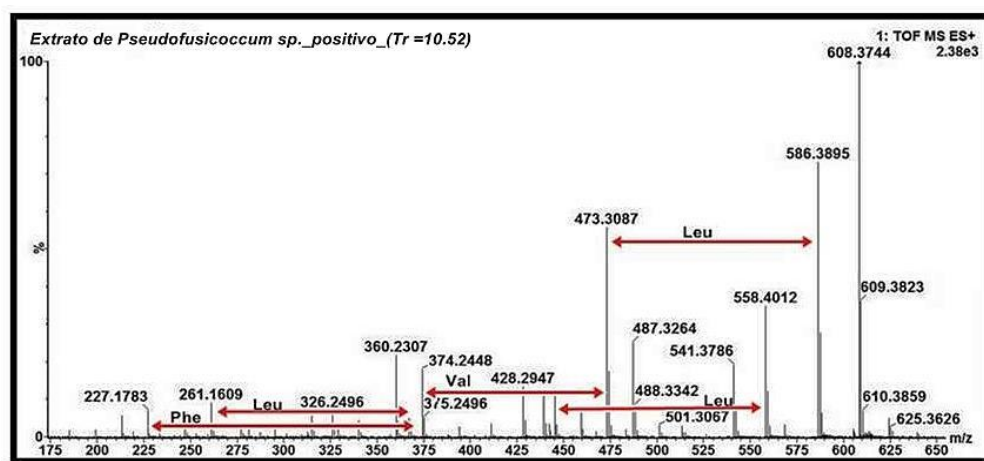
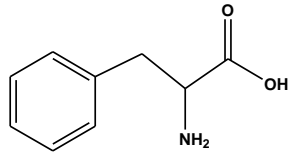
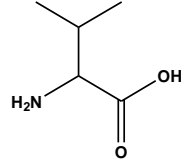
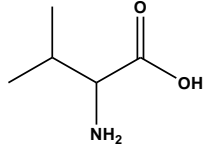


Figura 2- Espectro de massas observado em UPLC-ESI-QTOF-MS no modo positivo e a identificação dos resíduos de aminoácidos do Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu.

Tabela 1- Estrutura dos aminoácidos com a respectiva massa/carga (m/z) e fórmula molecular do Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu.

m/z	Aminoácido	Estrutura
147 m/z 374,2448 - 227,1783 = 147,0665	Fenilalanina (Phe) C_9H_9NO	
113 m/z 374,2448 - 261,1609 = 113,0839 m/z 558,4012 - 445,3185 = 113,0827 m/z 586,3895 - 473,3087 = 113,0808	Leucina (Leu) $C_6H_{11}NO$	
99 m/z 374,2448 - 473,3087 = 99,0639	Valina (Val) C_5H_9NO	

Através das informações dos espectros e a comparação com os dados da literatura, a presente substância foi caracterizada como sendo o ciclopentapeptídeo (Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu) (Figura 3), cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{51}N_5O_5$. O ciclo-D-Phe-D-Leu-D-Val-L-Leu-L-Leu foi identificado pela primeira vez a partir de cepas dos gêneros *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* e bactérias entomopatogênicas (Bode *et.al.*, 2012). Na literatura, não foram encontrados estudos sobre bioatividade para a referida substância.

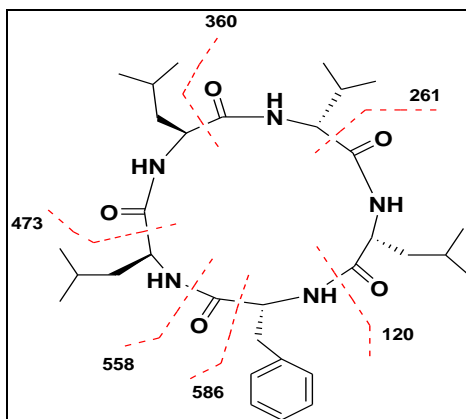


Figura 3- Estrutura molecular do Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu

3.2 Identificação do Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile

O espectro de massas de alta resolução do composto **2** (Figura 4), obtido através de ionização por *eletrospray* no modo positivo, exibiu o íon correspondente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 622,3895 indicando a fórmula molecular $C_{33}H_{53}N_5O_5Na$ (valor calculado m/z 622,3944; erro= -7,9 ppm). O espectro de massas de **2** também mostrou picos característicos para resíduos de aminoácidos, os quais foram identificados através da diferença entre os valores m/z dos mesmos. Assim, inferiu-se que o composto **2** era composto de 1 unidade de fenilalanina (Phe), 3 unidades de leucina (Leu) e 1 unidade de isoleucina (Ile), conforme ilustrado na Tabela 2.

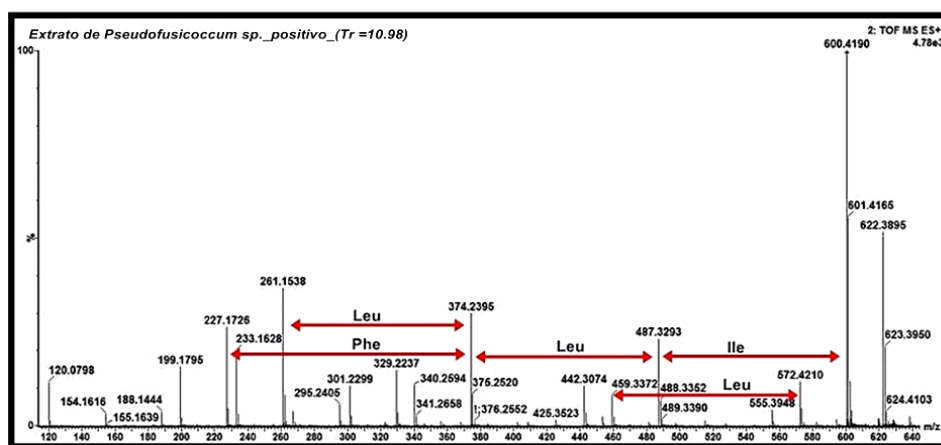
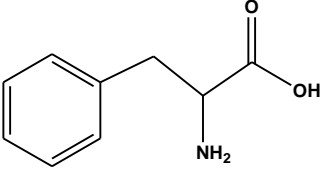
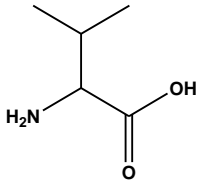
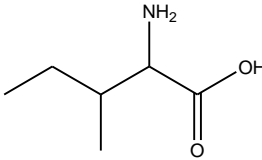


Figura 4- Espectro de massas observado em UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo e Identificação dos resíduos de aminoácidos presente no Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile.

Tabela 2- Estrutura dos aminoácidos com a respectiva massa/carga (m/z) e fórmula molecular do Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile.

m/z	Aminoácido	Estrutura
147 $m/z\ 374,2370 - 227,1714 = 147,0656$	Fenilalanina (Phe) C_9H_9NO	
113 $m/z\ 374,2370 - 261,1540 = 113,0830$ $m/z\ 487,3257 - 374,2370 = 113,0887$ $m/z\ 572,4178 - 459,3345 = 113,0833$	Leucina (Leu) $C_6H_{11}NO$	
113 $m/z\ 600,4127 - 487,3257 = 113,0857$	Isoleucina (Ile) $C_6H_{11}NO$	

Através das informações dos espectros e a comparação com os dados da literatura a presente substância se trata de um ciclopentapeptídeo, Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile (Figura 5), cuja fórmula molecular é $C_{33}H_{53}N_5O_5$. O ciclo-L-Phe-L-Leu¹-L-Leu²-L-Leu³-L-Ile foi isolado pela primeira vez pelo pesquisador Li e colaboradores (LI *et al.*, 2004) a partir de um fungo endófito (não identificado) associado a *Avicennia marina*. O mesmo autor (LI *et al.*, 2004) relatou que este composto exibiu atividade inibitória contra linhagem de célula cancerígena de hepatoma humano Bel-7402.

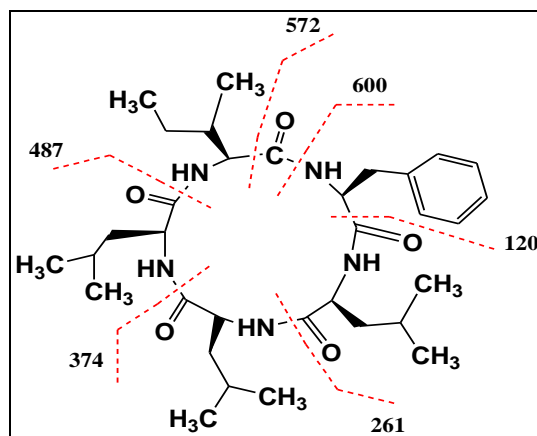


Figura 5- Estrutura molecular do Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

A literatura já relata diversas atividades biológicas importantes dentre os mais diversos ciclopeptídeos isolados a partir de fungos. A Kakadumicina A isolada de *streptomyces* sp. possui atividade antimalárica e antibiótica. A Leucinostatina A, Equinocandina A, Ecomicina, Siringomicina, Epichilcina, Talaromins A e B e Curvularida B possuem atividade antifúngica. A Fusaristatina B e Sansalvamida apresentam atividade contra câncer. Enquanto que a Malformina A₁ produzida por *Aspergillus tubingensis* mostrou potente efeito inibitório contra o vírus do mosaico do tabaco (ABDALLA e MATASYOH, 2014; BARAS *et.al.*, 2013; OTRUBOVA *et. al.*, 2008; SURYANARAYANAN *et. al.*, 2009).

4. CONCLUSÃO

No extrato acetato de etila do fungo *Pseudofusicoccum* sp., foram identificados dois ciclopentapeptídeos: o Ciclo-Phe-Leu-Val-Leu-Leu (C₃₂H₅₁N₅O₅) e o Ciclo-Phe-Leu-Leu-Leu-Ile (C₃₃H₅₃N₅O₅). O presente trabalho é um estudo preliminar que permitirá estabelecer estratégias de extração e isolamento destes ciclopeptídios, que posteriormente serão isolados em quantidade suficiente para avaliação dos seus potenciais biológicos.

5. REFERÊNCIA

ABDALLA, M. A. MATASYOH, J. C. Endophytes as producers of peptides: an overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes. **Natural Products Bioprospecting**, v. 4, p. 257–270, 2014.

BARA, R.; ALY, A. H.; WRAY, V.; LIN, W.; PROKSCH, P.; DEBBAB, A. Talaromins A and B, new cyclic peptides from the endophytic fungus *Talaromyces wortmannii*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1686-1689, 2013.

BODE, HB.; REIMER, D.; FUCHS, SW.; KIRCHNER, F.; DAUTH, C.; KEGLER, C.; LORENZEN, W.; BRACHMANN, AO.; GRÜN, P. Determination of the Absolute Configuration of Peptide Natural Products by Using Stable Isotope Labeling and Mass Spectrometry, **Chemistry - A European Journal**, v.18, p. 2342-2348. 2012.

CANUTO, K.M.; RODRIGUES, T.H.S.; OLIVEIRA, F.S.A.; GONÇALVES, F.J.T. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. Documentos, v. 154. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, n. 3, p. 421-437, 2013.

FREIRE, F. D. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. D. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v. 16, p. 61-102, 2014.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 297-303, 2014.

LI, H. J.; LIN, Y. C.; YAO, J. H.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES, E. G. Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus No. 2524. **Journal of Asian natural products research**, v.6, n.3, p.185-191, 2014.

OTRUBOVA, K.; LUSHINGTON, G.; VELDE, D. V.; MCGUIRE, K. L.; MCALPINE, S.R.; Comprehensive Study of Sansalvamide A Derivatives and their Structure–Activity relationships against Drug-Resistant Colon Cancer Cell Lines, **Journal Medicinal Chemistry**, v. 51, 530–544, 2008.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASub , N.; GOVINDARAJULUb , M.B.; SASSEc ,F.; JANSENd ,R.; MURALI,T.S. Fungal Endophytes and Bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, p. 9-19, 2009.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1707-1717, 2010.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

