



Exploração da biossíntese de ciclodepsipeptídeos produzidos pelo fungo *P. brasilianum*

Palavras-Chave: *Penicillium*, Produtos naturais, citotoxicidade

Autores:

Pedro Dominguez Branco [IQ - UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Taicia Pacheco Fill (orientadora) [IQ - UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O fungo *Penicillium brasilianum* é conhecido por seu arsenal de metabólitos secundários, que inclui anticancerígenos (SECA, A. M., & PINTO, D. C., 2018), antibióticos (de LIMA PROCÓPIO, R. E., et. al., 2014), inseticidas (MISHRA, S. K. et. al., 1987), entre outros. Entretanto, após recente sequenciamento de seu genoma, foi descoberto que uma grande parte deste potencial biossintético continua amplamente inexplorado. Neste sentido, um grande número de agrupamentos de genes putativos estão codificados em seu genoma, sem expressão de produtos naturais correspondentes. (BAZIOLI J. M. et al., 2017).

Tais genes estão silenciados em condições padrão de cultivo em laboratório, entretanto, muitas vezes podem ser ativados a partir de manipulação genética. Tendo isso em mente, o fungo teve o gene *rapL* deletado, e como resultado houve o surgimento de compostos com massas moleculares não observadas anteriormente, indicando a potencial expressão de novos PN e consequente diversidade estrutural.

OBJETIVOS:

Explorar o potencial biossintético e obtenção de novos metabólitos secundários a partir da deleção do gene *rapL* no fungo *Penicillium brasilianum*. Analisar e caracterizar o perfil metabólico pré e pós deleção do gene. Caracterizar novos produtos naturais induzidos pelo fungo.

METODOLOGIA:

Cultivo de *P. brasilianum* (pequena e larga escala) e extração:

O fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio de cultura sólido PDA (batata-dextrose-ágar), inoculado sob condições assépticas em placas de Petri e mantido em estufa a 25 °C. Após 7 dias de cultivo, as placas foram retiradas da estufa e foi preparada uma solução de esporos de concentração aproximada de 10⁶ esporos por mL.

Foi preparado 1 litro de meio de cultura *Czapek*, o qual foi suplementado com 0,5 g/L de sulfato de manganês e autoclavado. O meio de cultura foi dividido em 6 Erlenmeyers de 250 mL previamente autoclavados, nos quais o mutante foi inoculado, a partir da solução de esporos preparada, e cultivado por 12 dias, diferente do previsto inicialmente, de 7 dias, para que o fungo pudesse se desenvolver melhor.

As extrações e pré-purificações em pequena escala para estudo de caracterização dos metabólitos foram efetuadas via sonicação em acetato de etila na proporção 1:1 com o meio de cultura (*overnight*). No dia seguinte o micélio foi filtrado, o solvente rotavaporado e a amostra preparada para análise LC-MS.

Para o cultivo em larga escala foram preparados 11 litros de meio de cultura *Czapek* seguindo o mesmo procedimento acima. O volume total foi dividido em Erlenmeyers de 1 e 2 litros previamente autoclavados. O fungo foi inoculado com a mesma solução de esporos utilizada anteriormente e cultivado também por 12 dias. A extração dos metabólitos secundários foi feita através do mesmo procedimento citado acima.

Isolamento e caracterização:

Após a obtenção do extrato bruto, este foi pesado e fracionado com coluna *Sephadex LH-20* utilizando metanol como fase móvel.

As frações ímpares foram enviadas para análise de perfil cromatográfico em HPLC, sendo agrupadas as que possuem o mesmo perfil. Então se iniciou o desenvolvimento dos métodos para isolamento dos compostos de interesse, que após serem isolados serão elucidados através de técnicas espectroscópicas.

Análise GNPS:

Paralelamente ao isolamento dos compostos, está sendo repetido o cultivo em pequena escala idêntico ao anterior, mas com o preparo de uma solução de esporos do fungo selvagem e a adição de 3 Erlenmeyers para cultivo do mesmo, somando com os 6 Erlenmeyers de cultivo do fungo mutante, com a adição de cis prolina em 3 destes. Após extração e preparo das amostras para LC-MS/MS, será realizada análise de GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), que organiza os espectros de fragmentação obtidos em *clusters* pela semelhança entre eles, e também compara a fragmentação com um banco de dados para a identificação de compostos. A finalidade dessa análise é confirmar e quantificar a produção de metabólitos novos pós mutação do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Comparação do metabolismo selvagem/mutante:

A partir das análises preliminares, foram comparados os metabolismos do fungo *P. brasilianum* selvagem e mutante. Esses resultados apontaram o surgimento de íons novos nas análises após a deleção do gene, tendo eles as razões massa/carga 251, 471 e 527. A comparação dos cromatogramas de íon extraído pré e pós deleção está nas figuras 1 a 3 abaixo.

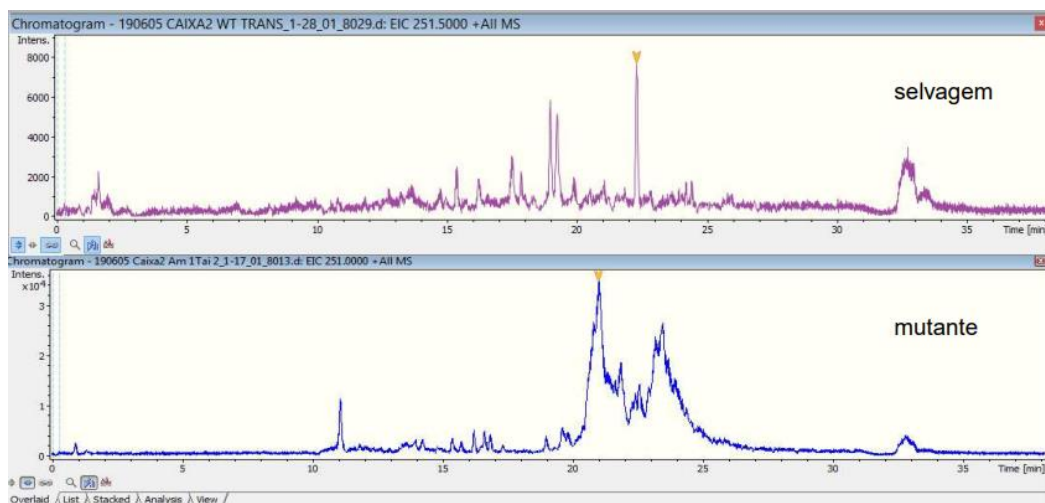


Figura 1: comparação dos cromatogramas de íon extraído para a m/z 251 para os extratos do fungo selvagem (acima) e mutante (abaixo).

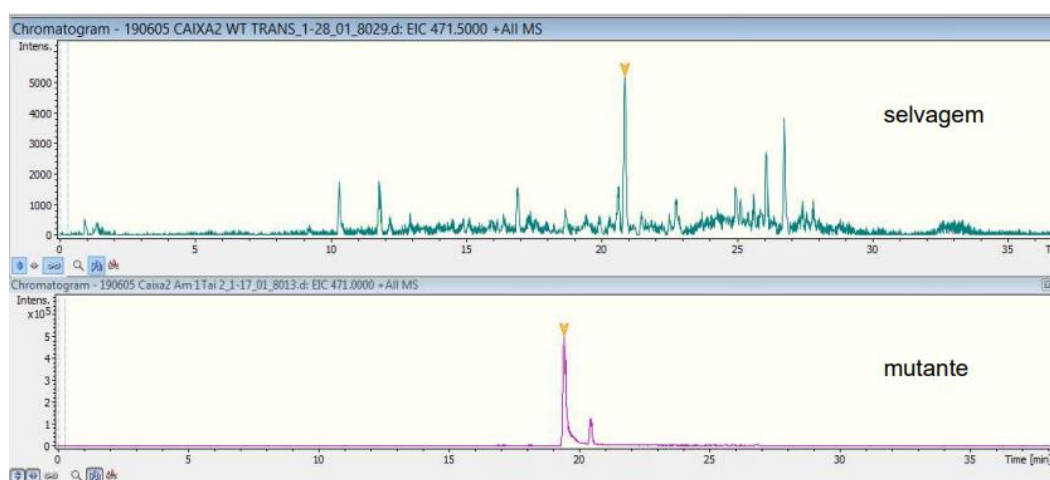


Figura 2: comparação dos cromatogramas de íon extraído para a m/z 471 para os extratos do fungo selvagem (acima) e mutante (abaixo).

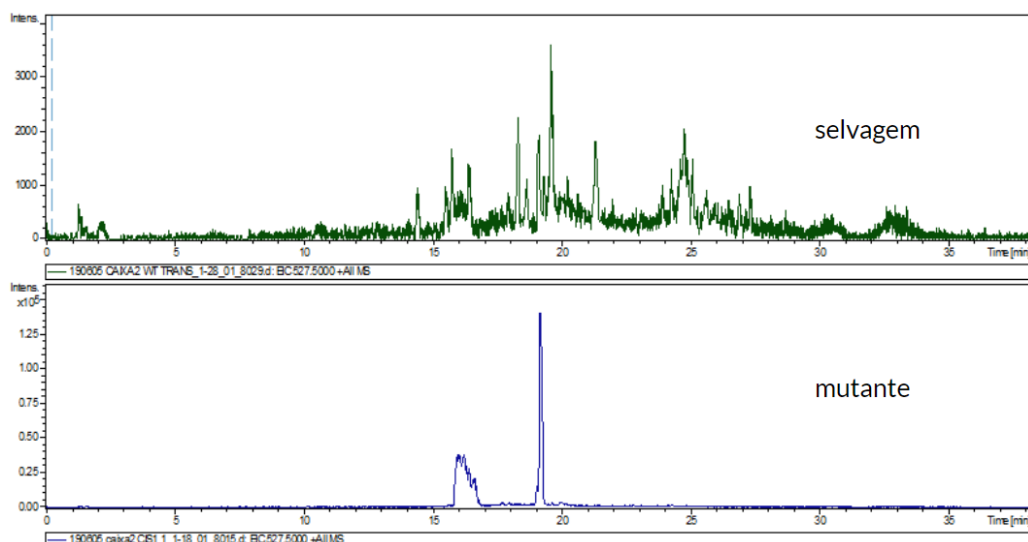


Figura 3: comparação dos cromatogramas de íon extraído para a m/z 527 para os extratos do fungo selvagem (acima) e mutante (abaixo).

É possível perceber pelas baixas intensidades nos cromatogramas do fungo selvagem que os três compostos passaram a ser produzidos apenas após a mutação genética.

Cultivo e extração do fungo mutante em pequena escala:

Na análise de cromatografia líquida com espectrometria de massas de alta resolução, realizada no software *Xcalibur* da empresa Thermo Fisher Scientific, foi confirmada a presença dos íons de m/z 251, 471 e 527. Entretanto, não foi observada diferença significativa na produção desses compostos com e sem a adição da *cis* prolina.

Para o íon de m/z 251,09 foi encontrada a possível fórmula estrutural $C_{13}H_{14}O_5$ que, segundo pesquisa no *Dictionary of Natural Products* (DNP - <http://dnp.chemnetbase.com/>) corresponde à citrinina (fig. 4), um metabólito secundário comumente produzido por fungos. Com a comparação da fragmentação obtida do íon com a fragmentação encontrada na literatura houve a confirmação de que o composto realmente corresponde à citrinina.

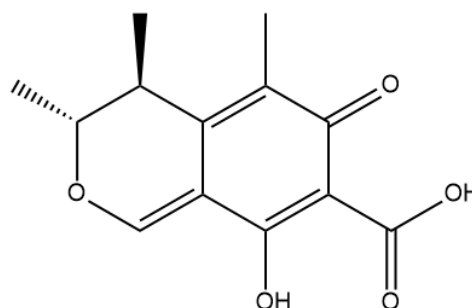


Figura 4: estrutura da citrinina.

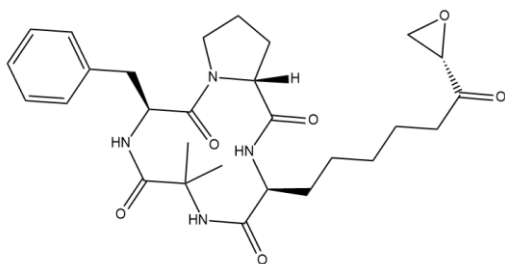


Figura 5: estrutura da clamidocina.

Para o íon de m/z 527,14 foram encontradas algumas possíveis fórmulas moleculares, entretanto a única com resultado relevante foi $C_{28}H_{38}N_4O_6$, que corresponde à clamidocina (fig. 5), um ciclotetrapeptídeo já descrito no metabolismo de fungos. Já para o íon de m/z 471, também foram encontradas diversas fórmulas moleculares possíveis, entretanto a única que obteve

resultados no DNP foi $C_{25}H_{26}O_9$, porém o número de possibilidades apontadas é muito grande, tendo algumas delas já sido identificadas no metabolismo de bactérias, como *Streptomyces sp.* e *Nocardia sp.* ou outros fungos, como *Aspergillus terreus* e *Penicillium crustosum*, mas nenhum dos resultados foi encontrado associado a *Penicillium brasilianum*.

Posteriormente à confirmação da presença desses compostos, o experimento foi repetido em escala maior para que fosse produzida massa suficiente para o isolamento e caracterização dos mesmos.

Isolamento dos compostos selecionados:

Após a obtenção de 1,05 g de extrato bruto com o cultivo em larga escala, este mesmo foi pesado e fracionado em coluna Sephadex, com metanol atuando como fase móvel, obtendo 30 frações, numeradas de P1 a P30. Estas foram enviadas para análise de perfil cromatográfico em HPLC institucional, então foram agrupadas as frações com o mesmo perfil e numeradas novamente de B1 a B17.

Essas 17 frações foram então encaminhadas para análise de espectrometria de massas de baixa resolução, na qual foi identificada a presença do íon m/z 251 nas frações B1, B2 e B4; m/z 471 nas frações B6 a B9; e m/z 527 nas frações B2 a B6.

CONCLUSÕES:

Com os resultados obtidos até agora, foi possível perceber que a deleção do gene *rapL* no fungo *Penicillium brasilianum* fez com que o microrganismo começasse a produzir metabólitos que não produzia em sua forma selvagem, de *m/z* 251, 471 e 527.

A partir de pesquisas na literatura foi possível concluir que o íon 251 corresponde à citrinina, que apesar de ser produzida por outros organismos não era produzida originalmente pelo *P. brasilianum*, e que possivelmente o íon 527 se trata da clamidocina.

Após o fracionamento do extrato bruto de 1,05 g e a identificação de em quais frações os íons de interesse estão presentes foram realizadas análises em HPLC para otimização do método de isolamento dos mesmos, entretanto, após perceber que provavelmente não haveria massa suficiente para realizar as análises necessárias, foi decidido repetir o cultivo em larga escala.

BIBLIOGRAFIA:

SECA, A. M., & PINTO, D. C. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 263.

de LIMA PROCÓPIO, R. E., da Silva, I. R., MARTINS, M. K., de AZEVEDO, J. L., & de ARAÚJO, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(5), 466-471. SPECIAN, V., ORLANDELLI, R. C., FELBER, A. C., AZEVEDO, J. L., & PAMPHILE, J. A. (2014). Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Journal of Health Sciences*, 16(4).

MISHRA, S. K., KELLER, J. E., MILLER, J. R., HEISEY, R. M., NAIR, M. G., & PUTNAM, A. R. (1987). Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *Journal of industrial microbiology*, 2(5), 267-276.

BAZIOLI J. M., AMARAL L. M., FILL T. P., RODRIGUES-FILHO E.; Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential. *Molecules*, 2017;22: 858. doi:10.3390/molecules22060858