



Isolamento de metabólitos do fungo entomopatogênico *Penicillium* sp. (JUANT028)

RESUMO

Thais Messias Berto
Thaismberto09081995@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianafeisouza@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Os fungos do gênero *Penicillium* estão entre os mais disseminados na superfície terrestre e são os principais produtores de metabólitos secundários em meio de cultura. O estudo que associa aspectos químicos e propriedades biológicas dos metabólitos produzidos por essas cepas fúngicas é alvo de interesse da comunidade científica mundial, pois resultou na obtenção de medicamentos e aditivos de alimentos. Este trabalho mostra os métodos de cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa utilizados para purificação e análise dos extratos fúngicos do entomopatogênico JUANT028. O extrato clorofórmio dessa cepa apresentou melhores resultados nos testes de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos e potencial para utilização no controle biológico. Por isso, este extrato foi escolhido para isolamento dos metabólitos bioativos. Posteriormente essas substâncias serão testadas como fungicidas de origem orgânica que são menos agressivos ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia. Extrato fúngico. Metabólitos.

INTRODUÇÃO

O controle biológico é caracterizado pela ação de antagonistas naturais disponíveis no ambiente que diminuem a população de um agente causador de doenças em plantas, os fitopatogênicos, por exemplo: *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. O uso de fungos como antagonistas tem sido estudado há bastante tempo. Esses podem ser aplicados a partir da aspersão de esporos ou com o uso de extratos orgânicos ricos em metabólitos secundários. Estes são produzidos durante seu metabolismo, principalmente devido ao mecanismo de defesa contra competidores naturais [1].

Os fungos do gênero *Penicillium* estão entre os mais disseminados na superfície terrestre e são os principais produtores de metabólitos secundários em meio de cultura. Esses produtos naturais são de origem orgânica e possuem estruturas químicas menos nocivas ao meio ambiente. Os fungos pertencentes a esse mesmo gênero podem produzir policetídeos bioativos por meio do seu metabolismo secundário [2].

A citrinina é um dos metabólitos secundários de fungos endofíticos, que possui uma importante atividade inibitória de crescimento de *Leishmania mexicana*, um protozoário flagelado [3].

Este trabalho tem como objetivo purificar os metabólitos secundários a partir dos extratos orgânicos da cepa JUANT028 por cromatografia em coluna (com Sephadex LH-20 e Sílica gel) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa, além de determinar seus perfis por CLAE analítica.

METODOLOGIA

1.1 Preparação do extrato

O fungo JUANT028, isolado da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), foi cultivado em um meio contendo 90g de arroz parboilizado e 75mL de água destilada, autoclavado a 121° por 45 min. Depois, inoculou-se o fungo no meio de cultura por 7 dias em Erlenmeyers em temperatura ambiente [4]. Após a maceração do fungo e o meio foram adicionados solventes orgânicos, os metabólitos então foram extraídos com clorofórmio, acetato de etila e metanol. A solução foi filtrada com o auxílio de uma bomba a vácuo e em seguida utilizou-se o rotaevaporador para diminuição da concentração dos solventes.

O presente trabalho utilizou o extrato de clorofórmio, pois apresentou resultados excelentes frente a fungos fitopatogênicos e potencial para utilização no controle biológico. Portanto, ele foi empregado nos procedimentos de purificação com a finalidade de isolar substâncias que possam ser responsáveis pela inibição de fungos fitopatogênicos.

1.2 Fracionamento cromatográfico e análise das frações

Para obtenção das frações do extrato de clorofórmio utilizou-se uma coluna cromatográfica cujo adsorvente utilizado foi o Sephadex LH-20 e a fase móvel metanol, pois é um solvente orgânico de alta polaridade, enquanto a fase estacionária é apolar, portanto, a cromatografia foi realizada em fase reversa.

No final foram obtidas 97 frações (PEACS 01 – PEACS 40, PEACS 01A – PEACS 25A e PEACS 01B – PEACS 32B).

Para reunir as frações semelhantes utilizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) que se baseia na diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6 [5].

A fase estacionária é a sílica (SiO_2) que apresenta caráter fracamente ácido [5]. E a fase móvel uma mistura de solventes orgânicos. A concentração média de eluente foi de 4,8mL de clorofórmio e 0,2 mL de metanol. As placas eluídas foram expostas à luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nanômetros. Posteriormente as mesmas foram coradas com vanilina sulfúrica para evidenciar outras substâncias que não ficaram visíveis.

1.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítica

As amostras consideradas mais puras por CCD passaram no HPLC analítico com detector ultravioleta (UV) que tem como finalidade verificar o perfil dos compostos. A constituição do solvente se alterou (elução por gradiente) [6]. Foi injetado um volume de 20 μ L de cada amostra e iniciou-se a eluição com gradiente de 10% até 90% de metanol em água, 1mL/min. As frações mais impuras passaram novamente pela cromatografia em coluna de Sephadex-LH20.

1.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparativa

A CLAE preparativa (SHIMADZU modelo LC-6AD) tem como objetivo o isolamento e purificação dos compostos. A constituição do solvente permaneceu constante (elução isocrática) [7]. Esta técnica está sendo realizada nas novas amostras obtidas do processo anterior no gradiente de 20% água Mili-Q e 80% metanol, 1mL/min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As massas dos extratos produzidos no macro cultivo do fungo JUANT028 estão exibidas no quadro 1.

Quadro 1 – Massa dos extratos secos

Extrato	Massa do extrato (g)
Clorofórmio	31,80
Metanol	383,97
Acetato de Etila	19,97

Fonte: Autoria própria (2017).

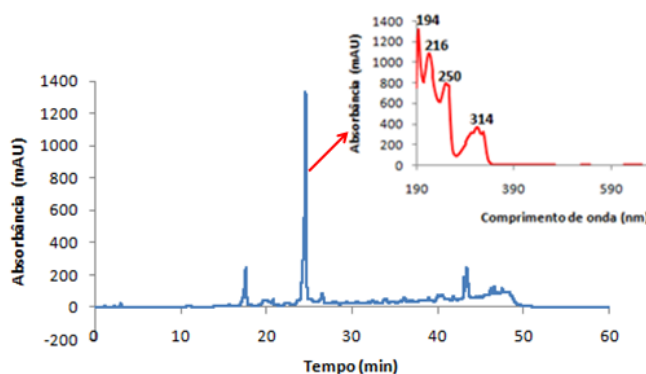
O extrato escolhido no para isolamento dos metabólitos foi o de clorofórmio, pois este inibiu os fungos fitopatogênicos, tais como *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium Oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A inibição para o último fungo citado foi de 100% a 7mg do extrato.

A purificação inicial do extrato foi realizada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (fase estacionária) e metanol (fase móvel) para isolamento dos metabólitos.

As frações consideradas semelhantes por CCD foram reunidas e no final escolheu-se 12 amostras para avaliar o perfil de metabólitos delas por CLAE com detector ultravioleta (UV) nos comprimentos de ondas 245, 280 e 330 nanômetros (nm). Todas as frações levadas para CLAE analítica possuíam uma substância de coloração amarela.

A fração PEACS 9A quando analisada por CCD mostrou uma substância amarela bastante evidente tanto em 254 quanto em 365 nm. Essa fração foi submetida à CLAE analítica gerando os sinais presentes na Figura 1.

Figura 1: Cromatograma da Fração PEACS 9A no comprimento de onda de 245 nm e o espectro da substância com tempo de retenção de 24,47 min.



Fonte: Autoria Própria (2017).

A análise do espectro de UV mostra semelhança com os metabólitos policetídeos isolados de *Penicillium*, possível gênero da cepa estudada, tal como a xantona [3].

As frações consideradas mais impuras de acordo com a CLAE analítica foram recromatografadas em coluna de Sephadex-LH20 e sílica.

As 2 frações purificadas pelos métodos descritos anteriormente e que serão levadas para análise por espectrometria de massas, RMN de próton e carbono 13 apresentam as seguintes particularidades indicadas no quadro 2.

Quadro 2: Características das substâncias isoladas

Código	Coloração da substância	Rf da substância	Peso (mg)	Solubilidade
SIL-RO	Intensa de coloração roxa e não cora com vanilina	0,7	6,4	Diclorometano e Clorofórmio
PREP-LA	Coloração laranja e cora com vanilina	0,4	13,3	Diclorometano e Clorofórmio

Fonte: Autoria própria (2017).

O projeto atualmente encontra-se na etapa final de purificar mais metabólitos secundários do extrato orgânico de clorofórmio para posteriormente determinar a estrutura dos mesmos.

O conteúdo do presente trabalho foi apresentado ao 40^a Congresso da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), que ocorreu em julho de 2017 em São Paulo (46th World Chemistry Congress). Título do trabalho: Screening organic extracts from a *Penicillium* sp (JUANT 028) grown on solid medium to inhibit the

phytopathogens: *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Autores: Igor Shiraishi, Thaís Berto e Wellington Oliveira.

CONCLUSÃO

Verificou-se que as cromatografias em coluna usando Sephadex LH-20 e sílica utilizadas simultaneamente com a CLAE preparativa são técnicas de separação e purificação de compostos e podem ser utilizadas juntamente com a cromatografia em camada delgada para reunir as frações semelhantes, facilitando assim o manuseio das amostras para estudos dos metabólitos produzidos pelo fungo.

A cepa JUANT028 produziu biomoléculas com potencial para controlar os patógenos de plantas, as quais estão sendo purificadas e identificadas no desenvolvimento do projeto e podem servir de princípio ativo para o desenvolvimento de um novo fungicida.

Isolation of metabolites of the entomopathogenic fungus *Penicillium* sp. (JUANT028).

ABSTRACT

Fungi of the genus *Penicillium* are among the most widespread on the terrestrial surface and are the main producers of secondary metabolites in culture medium. The study associating chemical aspects and biological properties of the metabolites produced by these fungal strains is of interest to the world scientific community, as it resulted in the obtaining of medicines and food additives. This work shows the methods of column chromatography, analytical and preparative high performance liquid chromatography (HPLC) used for purification and analysis of the fungal extracts of entomopathogenic JUANT028. The chloroform extract of this strain had better results in the tests of growth inhibition of phytopathogenic fungi and potential for use in biological control. Therefore, this extract was chosen for the isolation of the bioactive metabolites. Subsequently these substances will be tested as fungicides of organic origin that are less aggressive to the environment.

KEYWORDS: Cromatography. Fungal extract. Metabolites.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pela bolsa concedida ao primeiro autor, a Prof^a. Dr^a. Aneli M. Barbosa por fornecer gentilmente o fungo *Botryosphaeria rhodina* para os testes do controle biológico e ao Prof^o. Dr^o. Cesar Andrei do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela gentileza de emprestar a CLAE preparativa.

REFERÊNCIAS

- [1] GRONVOLD, J.; W,J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M. & BRESCIANI, J. 1993. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode trapping fungi: a survey of danish studies. **Vet. Parasitol.** 48:311-325.
- [2] CASTRO, M.V. **Utilização de planejamento experimental para otimizar a produção de metabólitos secundários produzidos por *Penicillium* sp., isolado do ambiente marinho.** 2015.168 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2015.
- [3] PASTRE, R.; MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, São Carlos, v.30, n.8, p.1867-1871, 2007.
- [4] JARVIS, W.R. Fusarium crown and root rot of tomatoes. **Phytoprotection**, v.69, p. 49-64, 1989.
- [5] CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia um breve ensaio.** Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Artigo_Cromatografia.pdf>.
- [6] WELLINGS, D.A. **A Practical Handbook of Preparative HPLC.** Elsevier, 2006.
- [7] KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientist.** Wiley, 2007.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

BERTO, T. M.; DANIEL, J. F. S. Isolamento de metabólitos do fungo entomopatogênico *Penicillium* sp. (JUANT028). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em:<
<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>. Acesso em: 24/08/2017.

Correspondência:

Thais Messias Berto

Rua Fernando de Noronha, número 608, Bairro Centro, Londrina, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

