

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E MOLECULAR NETWORKING PARA UMA RÁPIDA E EFICIENTE TRIAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS

Luciana Araújo Xavier¹, Eduardo Jorge Pilau², Carla Porto³, Adriana Flach¹, Luiz Antonio M. A. da Costa¹

¹ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Boa Vista, RR, Brazil. e-mails: luciana.xavier@ufr.br; aflat@ufr.br; luizufrr@gmail.com.

² Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá, PR, Brazil. e-mail: epilau@gmail.com

³ MS Bioscience - Incubadora Tecnológica de Maringá - Complexo UEM, Maringá, PR, Brazil. e-mail:cporto.silva@gmail.com

Palavras-chaves: annona, cromatografia, fungos endofíticos, molecular networking

Introdução

Os fungos endofíticos associados à plantas brasileiras apresentam uma ampla quimiodiversidade inexplorada ou ainda pouco investigada. Assim, é necessário a busca por análises que permitam uma acelerada e eficaz avaliação desses sistemas, visando a descoberta de compostos de interesse biológico. A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica clássica e eficiente, bastante empregada nas análises preliminares para perfil de classes de produtos naturais e para atividade biológica. Nas últimas décadas, o Molecular Networking (MN) obtido pela plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) tem se mostrado útil na análise metabolômica e interpretação de grande conjunto de dados [1]. Assim, o objetivo do estudo foi utilizar a técnica clássica de CCD aliada a análise por MN, para uma rápida e eficiente triagem dos fungos endofíticos de *Annona jahnii* Saff.

Material e Métodos

Trinta linhagens fúngicas do gênero *Penicillium sp.* previamente isoladas de *A. jahnii* foram cultivadas em microescala em tubos de ensaio. Os fungos com os códigos F78, F82, F168, F169, F534, F573 e F577 foram cultivados em meio líquido de batata dextrose (BDL) [2]. Os codificados com F11, F13, F14, F19, F48, F76, F142, F167, F187, F241, F329, F412, F563, F564 e F570 em meio AVEIA [2]. O meio ISP2 [2] foi usado para as linhagens F5, F22, F54, F141, F347, F370, F387 e F391. Após 15 dias de cultivo, os meios líquidos foram extraídos com acetato de etila e os micélios com álcool etílico. Alíquotas de cada extrato foram aplicadas em CCDs para caracterização preliminar das classes flavonóides, cumarinas, alcaloides e terpenos e reveladas com reagentes específicos para cada classe [3]. Para a determinação qualitativa da atividade antioxidante, usou-se como revelador o reativo 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os extratos selecionados foram analisados em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência UHPLC (Shimadzu, Nexera X2, Japão), com coluna Acquity UPLC CHS C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm (Waters, USA)). A fase móvel consistiu em: solvente A (água com ácido fórmico 0,1 % v/v) e solvente B (acetonitrila com

0,1% de ácido fórmico). O fluxo de eluição foi: 2% B 0-1 min, 30% B 1-3 min, 80% B 3-20 min, 98% B 20-32 min, mantido a 2% B 32- 38 minutos a uma temperatura de 40 °C. O espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Germany) com geometria Q-TOF com fonte de ionização electrospray operada em modo positivo. Para gerar o MN os dados de espectrometria de massa foram tratados de acordo com a documentação do GNPS [4]. O MN foi visualizado usando o software Cytoscape e a anotação dos metabólitos desenvolvida de acordo com SILVA et al., 2020 [5].

Resultados e Discussão

A triagem por CCD (Figura 1) mostrou-se eficiente na detecção das classes propostas. Para atividade antioxidante, 80% dos extratos dos micélios apresentaram teste positivo, contra apenas 40% dos extratos do meio líquido (Figura 2). Os terpenos foram a classe mais abundante, visualizada em 82% dos extratos. Cumarinas e flavonóides são as classes com menor detecção. Os alcaloides foram predominantes nos extratos do micélio (96%).

Figura 1: Placas CCD dos extratos fúngicos. A) Cumarina (revelador solução etanólica de NaOH (5%)), B) Alcaloide (revelador Dragendorff), C) Flavonóides (revelador NP-PEG), D) terpenos (revelador vanilina sulfúrica ácida), E) antioxidante (revelador DPPH)

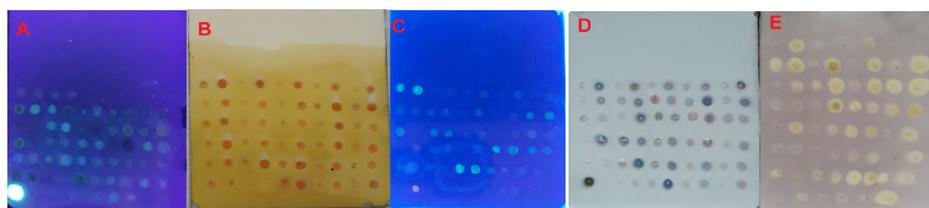
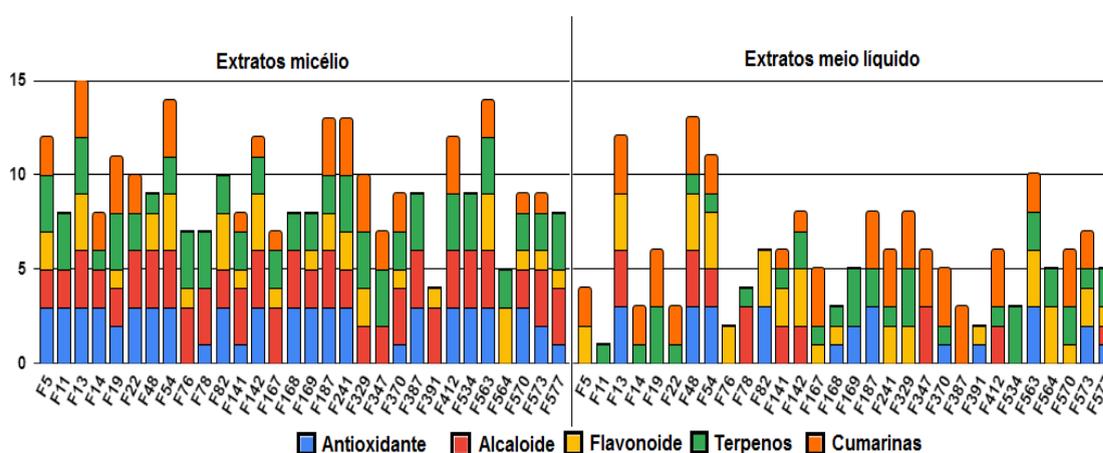


Figura 2: Resultados da detecção das classes metabólicas e atividade antioxidante dos 60 extratos. A amplitude das barras indicam a intensidade das manchas observada visualmente nas placas

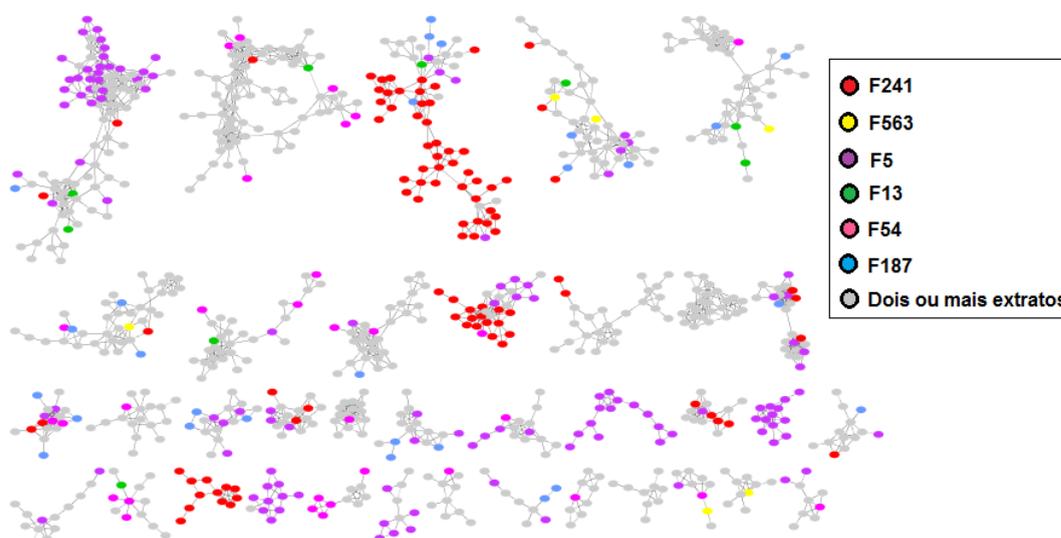


As análises preliminares por CCD, possibilitaram a seleção dos 6 extratos (F5, F13, F54, F187, F241 e F563) mais promissores, todos do micélio. Para a seleção, observou-se além da detecção, a intensidade das manchas para cada classe (Figura 1), assim selecionou-se extratos com: forte atividade antioxidante e presença forte ou moderada para a maioria das

classes verificadas (Figura 2). Estes extratos foram analisados por UHPLC e os dados espectrais foram organizados na plataforma GNPS, obtendo-se o MN (ID=b04481afeb264c3c996af4568913a5bd). As entidades químicas apresentadas no MN dos seis extratos, somaram 4.224, representadas por círculos (nodes) (Figura 3). Apesar desta elevada diversidade química, apenas 189 obtiveram anotação na biblioteca do GNPS, destes 27 foram identificados putativamente através da comparação manual dos espectros. O compartilhamento dos dados em repositórios espectrais, aumenta o número de anotações nessas abordagens computacionais, facilitando assim a desreplicação de mais compostos [4]. Alguns compostos putativamente identificados incluem a andrastina A e curvularina, dentre outros que possuem atividades biológicas já relatadas [6,7].

O MN é uma excelente ferramenta para comparação do perfil metabólico dos diferentes extratos. Observa-se na Figura 3, por exemplo, que a maioria das entidades químicas foram detectadas em mais de um extrato, nodes cinzas observados com maior abundância. Os extratos F5 (nodes roxos) e F241 (nodes vermelhos), apresentaram um elevado número de entidades detectadas exclusivamente nestes extratos. As entidades químicas destes dois extratos, estão também amplamente distribuídas nos diversos clusters do MN. Os clusters são agrupamentos de entidades químicas com características estruturais similares que são conectadas por linhas. Assim, o estudo aprofundado dos fungos F5 ou F241, poderia facilmente fornecer informações sobre o perfil químico dos extratos das outras linhagens fúngicas. Pois, a identificação de uma entidade química dentro do cluster permite a identificação de outra no mesmo cluster, a partir da extrapolação da perda ou ganho de um grupo químico [5].

Figura 3: Clusters com mais de 7 nodes obtidos da rede molecular gerada com os dados dos 6 extratos selecionados



Diante dos resultados, os extratos F5 e F241 se apresentaram mais promissores, em razão da sua ampla diversidade química exclusiva, detecção de uma forte atividade antioxidante e possibilidade de explorar o perfil dos demais extratos, através da análise dos clusters no MN.

Conclusões

Os dados aqui apresentados permitem não apenas a triagem dos fungos estudados, mas também apresentam informações importantes sobre o perfil metabólico dos diferentes extratos. A baixa desrepliação dos compostos usando a plataforma do GNPS e MN, demonstra a complexidade dos extratos. Assim, verificasse a necessidade de mais pesquisas e divulgação dos estudos de metabolômica de microbiotas associadas à flora brasileira. O estudo, portanto, contribuirá para as futuras pesquisas na área.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRÓ-AMAZÔNIA – código do financiamento 3260/2013; Processo 23038.000726/2013-43), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ MCTIC/CNPq No. 428988/2018-0), e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM).

Referências Bibliográficas

- [1] ALMEIDA, R.T.R.; PRADO, R.M.; PORTO, C.; SANTOS, G.T.; HUWS, S.A.; PILAU, E.J. Exploring the rumen fluid metabolome using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and Molecular Networking. **Scientific Reports**. 8:17971, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-36196-4.
- [2] SOUSA, Gilmara Prado de. **Produção de metabólitos e atividades biológicas de fungos endofíticos associados à *Annona jahnii* Saff. do lavrado de Roraima**. 2018. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2018.
- [3] WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. New York, editora Springer, 1996. p. 384.
- [4] WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y. et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking". **Nature biotechnology**, 34, n. 8, 828-837, 2016.
- [5] SILVA, E.; GRAÇA, J.P.; PORTO, C.; PRADO, R. M.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MEYER, M.C., et al. Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. **Scientific Reports**. 10:138. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56782-4>.
- [6] MATSUDA, Y.; AWAKAWA, T.; ABE, I. Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. **Tetrahedron**. 69 (38): 8199-8204, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029>.
- [7] HA, T. M.; KO, W.; LEE, S. J.; KIM, Y. C.; SON, J. Y.; SOHN, J. H. et al. Anti-Inflammatory Effects of Curvularin-Type Metabolites from a Marine-Derived Fungal Strain *Penicillium* sp. SF-5859 in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Macrophages. **Marine Drugs**, 15, 282, 2017. doi:10.3390/md15090282.