



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza  
Instituto de Química  
**Projeto Final de Curso**

**Avaliação da atividade antioxidante dos metabólitos  
gerados durante o crescimento do fungo endofítico  
*Penicillium citrinum***

Thiago Wolff

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2012

Avaliação da atividade antioxidante dos metabólitos gerados durante o crescimento do fungo endofítico *Penicillium citrinum*

**Autor:**

**Thiago Wolff**

**Projeto final submetido à banca examinadora, como requisito para conclusão do Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.**

**Orientador:**

**Prof. Rodrigo Volcan Almeida (IQ-UFRJ)**

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2012

W855

WOLFF, Thiago.

Avaliação da atividade antioxidante dos metabólitos gerados durante o crescimento do fungo endofítico *Penicillium citrinum*. / Thiago Wolff. Rio de Janeiro, 2012.

42 f.

Trabalho de conclusão do curso de Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Rodrigo Volcan Almeida.

1. Bioquímica. 2. Química orgânica. 3. Fungos endofíticos. 4. *Penicillium citrinum*. I. Almeida, Rodrigo Volcan. (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Título.

CDD 574

## **Agradecimentos**

*Agradeço aos meus pais, Alberto Costa Wolff e Anazilda Angélica Wolff, e meu irmão, Bruno Wolff pelo constante apoio durante a minha graduação; agradeço também a todos os meus amigos da universidade pela compreensão e ajuda quando requerida; e aos meus orientadores, Ligia Maria Marino Valente e Rodrigo Volcan Almeida, pelas oportunidades, confiança e também pela amizade, por terem sido importantes no meu processo de formação profissional.*

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELA.....	v
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Opuntia monachanta</i> .....	3
1.2 Fungos endofíticos.....	4
1.3 Os cactos e seus fungos associados.....	6
1.3.1 <i>Penicillium citrinum</i> e citrinina.....	8
1.4 Atividade antioxidante.....	9
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Reagentes.....	12
3.2 Manutenção da cultura.....	12
3.3 Cultivo do fungo endofítico <i>P. citrinum</i> .....	12
3.4 Determinação do peso seco durante o crescimento.....	13
3.5 Dosagem de glicose.....	13
3.6 Extração dos metabólitos.....	14

3.7 Análise da atividade antioxidante.....	14
3.8 Cromatografia em camada delgada (CCD) e densitometria.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	17
4.1 Determinação do peso seco e da glicose no meio ao longo do crescimento.....	17
4.2 Avaliação da atividade antioxidante, análise por cromatografia em camada delgada e densitometria dos extratos gerados durante o crescimento.....	21
5. CONCLUSÃO.....	30
6. PROPOSTAS FUTURAS.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química do taxol.....2
- Figura 2:** *Opuntia monacantha*.....4
- Figura 3:** Estrutura química do campferol e da isoramnetina.....4
- Figura 4:** Estrutura química de algumas substâncias biologicamente ativas: penicilina e griseofulvina.....5
- Figura 5:** Foto do fungo endofítico *Penicillium citrinum* isolado dos cladódios da espécie *Opuntia monacantha* em 24 e 48 horas com aumento de 400 vezes.....7
- Figura 6:** Estrutura química da citrinina.....8
- Figura 7:** Reação de redução do radical DPPH.....14
- Figura 8:** Reação de complexação do  $\text{Fe}^{3+}$  com as hidroxilas fenólicas.....16

**Figura 9:** Curva de crescimento do fungo endofítico *P. citrinum* gerada do primeiro cultivo em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.....17

**Figura 10:** Curva de crescimento do fungo endofítico *P. citrinum* gerada do segundo cultivo em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.....19

**Figura 11:** Consumo de glicose durante o crescimento do fungo *P. citrinum* em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.....20

**Figura 12:** CCD dos extratos obtido pela partição acetatos de etila revelados com: UV 254 nm, UV 365 nm, reagente DPPH 0,4 mM, e FeCl<sub>3</sub> 10%. Em sílica gel como fase estacionaria e a fase móvel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1), com aplicação 5 µL de amostra na concentração de 25 mg/mL em metanol, em 0,5 cm, com espaçamento de 0,5 cm entre uma aplicação e outra, e eluição de 8,0 cm.....24

**Figura 13:** CCD dos extratos obtido pela partição acetatos de etila revelados com UV 365 nm. Os números indicam o tempo de cada de cultivo, em dias. As condições foram: sílica gel como fase estacionaria e a fase móvel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH (9:1), com aplicação 5 µL de amostra na concentração de 10 mg/mL em metanol, em 0,5 cm, com espaçamento de 0,5 cm entre uma aplicação e outra, e eluição de 8,0 cm. E em C é a aplicação de uma fração enriquecida em citrinina com concentração de 2 mg/mL.....26

**Figura 14:** Densitograma da placa cromatográfica com aplicação da amostra na concentração de 10 mg/mL.....27



## TABELAS

**Tabela 1:** Massas de extrato obtidas nas partições do meio de cultura com acetato de etila ao longo do crescimento.....21

**Tabela 2:** Resultados dos ensaios de atividade antioxidante com o reagente DPPH dos extratos gerados.....22

**Tabela 3:** Resultados da integração do densitograma após separação por CCD dos extratos gerados.....28

RESUMOPROJETO DE CURSO – IQWX01

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS METABÓLITOS GERADOS DURANTE O CRESCIMENTO DO FUNGO ENDOFÍTICO *Penicillium citrinum*

**ALUNO:** Thiago Wolff

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Rodrigo Volcan Almeida, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

O estudo recentemente iniciado buscando metabólitos novos e/ou ativos de fungos endofíticos da espécie *Opuntia monacantha* levou ao isolamento do fungo *Penicillium citrinum*. O extrato acetato de etila obtido por partição do meio de cultura deste fungo após sete dias de crescimento apresentou uma alta atividade citotóxica *in vitro* em células da linhagem MCF-7, células de câncer de mama, e uma moderada atividade antioxidante no ensaio com radical DPPH (IC<sub>50</sub> 34,5 µg/mL). O aumento de escala do cultivo deste fungo levou o isolamento da micotoxina citrinina.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de crescimento desta cepa de *P. citrinum*, visando um maior entendimento da produção de seus metabólitos e das atividades apresentadas. Com isso, o fungo foi cultivado em paralelo em erlenmeyers de 500 mL com 120 mL de meio Sabouraud Dextrose (conc. de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL, agitação de 170 RPM à 30 °C) para o acompanhamento do crescimento em 3, 5, 7, 11 e 18 dias. Fez-se o peso seco (com procedimentos diferentes) ao longo desse tempo e verificou-se em ambos que o crescimento acontecia até o quinto dia, e a dosagem da glicose por CLAE mostrou seu esgotamento entre o quinto e o sétimo dia.

O perfil dos metabólitos ao longo desse tempo foi comparado por CCD (gel de sílica; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1; revelação: UV a 254 e 365 nm; FeCl<sub>3</sub> 10%; e DPPH), e pode-se ver que o perfil dos metabólitos mudou ao longo do tempo e os dos dois cultivos realizados para a determinação do peso seco por métodos diferentes foram semelhantes entre si. Os extratos mostraram uma atividade antioxidante moderada no ensaio com DPPH, exceto o ponto de sete dias do primeiro cultivo (IC<sub>50</sub> 16,7 µg/mL). A análise por densitometria usando o aplicativo ImageJ mostrou que a concentração de citrinina aumenta até um máximo e depois diminui.

## 1. INTRODUÇÃO

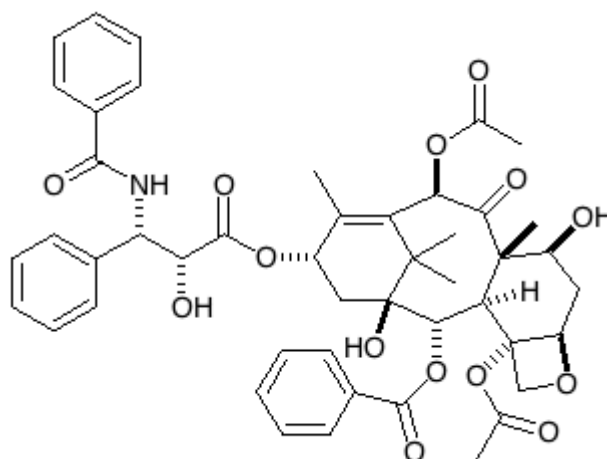
---

A natureza continua sendo uma das mais importantes fontes de novas substâncias biologicamente ativas (1, 2). A busca dessas substâncias se dá principalmente a partir de plantas superiores e organismos marinhos. No entanto, um volume crescente de dados tem sugerido que micro-organismos associados à plantas, especialmente fungos e bactérias endofíticas e rizosféricas representam uma fonte ainda pouco explorada de produtos naturais com estruturas químicas diversas de relevância biológica e ecológica (3).

A capacidade de formar associações com fungos e outros micro-organismos pode ser uma das estratégias mais bem sucedidas que as plantas adotaram para a adaptação às adversidades do ambiente terrestre. As comunidades fúngicas associadas às plantas desempenham diversas funções biológicas importantes e impõem fortes efeitos na ecologia, na capacidade de adaptação e na evolução das plantas. Elas incluem fungos mutualistas, antagonistas, saprófitos ou patógenos, ocupando diferentes nichos, como o solo, a filosfera (epífitos), a rizosfera e, em associações mais íntimas com as plantas, o interior dos tecidos vegetais (endófitos) (4).

Nas relações mutualísticas, os fungos podem conferir benefícios às plantas como a tolerância a estresses bióticos e abióticos, promoção do crescimento, resistência à doenças, resistência à herbivoria e aumento da aquisição de nutrientes. Já no comensalismo, a associação favorece o fungo sem, no entanto, gerar qualquer efeito benéfico ou prejudicial à planta hospedeira, enquanto que, nas interações parasíticas, a presença do fungo traz prejuízos à planta (4).

Uma única linhagem de fungo endofítico ou de rizosfera pode produzir várias substâncias bioativas. Essas substâncias podem ser estruturalmente diferentes ou semelhantes às produzidas pela planta hospedeira. Como exemplos de produção de mesmos metabólitos têm-se o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* encontrado na parte interna das cascas de *Taxus brevifolia* (5) e que produz, assim como a planta, o taxol (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura química do taxol

Essa substância de alto valor agregado e amplo uso na terapêutica do câncer possui uma estrutura complexa com vários centros quirais, está presente em pequena quantidade na planta de origem e possuem rotas sintéticas (ou semi-sintéticas) que apresentam altos custos. Desse modo, a produção em larga escala por via biotecnológica é uma possibilidade bastante atrativa (6, 7). Esses fatos ilustram a dificuldade do acesso às moléculas bioativas de origem natural em quantidade suficiente, tanto para a fase de estudos preliminares, como para produção comercial, o que vem a ser uma das principais limitações no processo de desenvolvimento de fármacos derivados de produtos naturais. Por outro lado, os estudos com micro-organismos endofíticos e/ou rizosféricos mostram que além da diversidade das estruturas químicas e atividades biológicas apresentadas, eles podem levar à produção de grandes quantidades de compostos bioativos com um importante viés de sustentabilidade (8).

Além disso, o isolamento, cultivo e identificação de micro-organismos dependem de amostras muito pequenas, que causam pouco ou nenhum impacto às populações nativas, ao contrário do que pode ocorrer quando se pretende trabalhar com macro-organismos. Os estudos nesta área podem promover ainda o conhecimento da biodiversidade num sentido mais amplo.

### 1.1 *Opuntia monacantha*

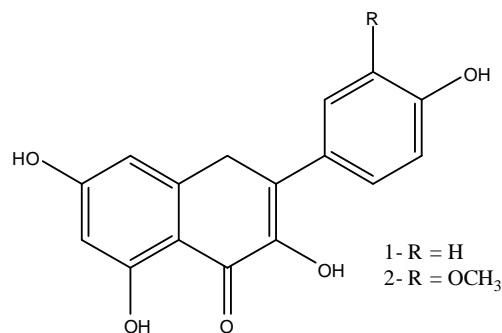
A família Cactaceae contém cerca de 2000 espécies, que crescem principalmente em regiões áridas e semi-áridas do continente americano (9). No Brasil existe a ocorrência de aproximadamente 400 espécies em todo território nacional. Os frutos e cladódios dos cactos, especialmente os das espécies do gênero *Opuntia*, são largamente empregados em muitos países como alimento e remédio apresentando várias propriedades farmacológicas. Os estudos da composição química das cactáceas levaram à detecção e/ou ao isolamento principalmente de triterpenóides, esteróides, flavonóides, betalaínas e alcalóides (10, 11). No entanto, no Brasil, os cactos além de sub-utilizados, têm sua constituição química e potencial terapêutico ainda pouco conhecido.

A espécie *Opuntia monacantha* Haw. (Cactaceae) é nativa no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e foi introduzida e naturalizada na Austrália, China, Cuba, Himalaia, Índia e África do Sul (Figura 2). Estudos sobre a família Cactaceae mostraram que os cladódios dessa espécie apresentam atividade antitumoral e antioxidante moderada, flavonóides glicosilados antioxidantes e baixo teor de alcalóides (12, 13). Essa espécie mostra também uma interessante resistência seletiva à cochonilha *Diapris echinocacti* Bouché (14) e parece possuir um mecanismo de defesa quando predada por larvas de *Cactoblastis cactorum*, um parasita de espécies do gênero *Opuntia* (15). Além disso, os frutos e cladódios dos cactos são empregados como alimento e remédio apresentando várias propriedades farmacológicas (10) e, recentemente, foi observado uma significativa atividade antidiabética e anti-AGE (*Advanced Glycation Endproducts*) dos polissacarídeos encontrados nos cladódios da espécie *O. monacantha* (16, 17).



**Figura 2:** *Opuntia monacantha*

No Brasil podemos encontrar três espécies de *Opuntia*. Contudo não há muitas informações sobre a composição química e sobre o potencial terapêutico e nutricional dessas espécies. Em outros estudos foi verificado que a espécie *O. monacantha* possui um potencial nutricional, uma atividade antioxidante, além do isolamento de dois flavonóides: campferol e isorramnetina (Figura 3), através de fracionamentos guiados por ensaios de atividade (13).



**Figura 3:** Estrutura química do campferol (1) e da isorramnetina (2).

## 1.2 Fungos endofíticos

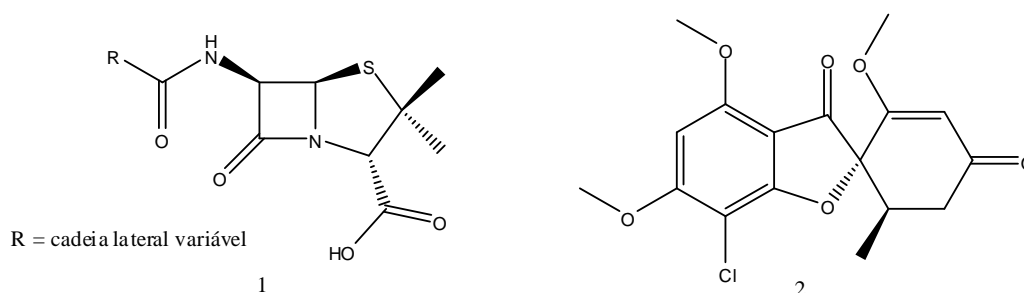
Os micro-organismos estão entre as principais fontes de moléculas biologicamente ativas que encontram um vasto campo de aplicação na medicina, na agricultura e na indústria (3). Diferentemente de outras fontes de substâncias naturais, como plantas e organismos marinhos, eles têm ampla distribuição, sendo encontrados nos sistemas vivos e não-vivos em diferentes ambientes. Os fungos são, particularmente, uma profícua fonte dessas substâncias (3) e os fungos

endofíticos são aqueles que colonizam, durante parte do seu ciclo de vida, os tecidos vivos internos de plantas sem lhes causar danos, produzindo metabólitos bioativos que podem proteger a planta hospedeira de herbívoros, patógenos e outros estresses abióticos, além de auxiliar no seu ciclo de crescimento e na sua competitividade ao meio (12, 18).

Contudo, não há uma definição clara do termo endofítico, assim como não há clareza quanto às interações entre os micro-organismos e a planta hospedeira, podendo variar de acordo com as populações e comunidade (19).

Dentre os seres endofíticos, os fungos são os mais comumente isolados, podendo se isolar diversas colônias de diversas partes do vegetal, mas apenas algumas espécies de fungos estão em quantidade significativa. Além disso, também há indícios de que haja uma especificidade no conjunto hospedeiro, no caso a planta, e os seres endofíticos (19).

A importância dos fungos endofíticos na produção de substâncias biologicamente ativas está ligada à sua sobrevivência em ambientes distintos. E entre as aplicações das substâncias produzidas por tais pode-se citar analgésica, antitumoral, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária, entre outros. Muitas dessas substâncias já possuem fármacos no mercado, como a penicilina e a griseofulvina, que possuem ação antibacteriana e antifúngica, respectivamente. Além disso, eles podem ser usados como vetor para introdução de genes em espécies de plantas economicamente interessantes, agentes biológicos no controle de pragas e na produção de enzimas (19).



**Figura 4:** Estrutura química de algumas substâncias biologicamente ativas: penicilina (1) e griseofulvina (2).

Nos últimos vinte anos centenas de microorganismos endofíticos foram cultivados e submetidos à investigação detalhada levando à caracterização

estrutural e avaliação biológica de um grande número de substâncias naturais, muitas com estruturas inéditas e bioatividades interessantes (3). Além de existir uma tendência de produzir drogas através de processos fermentativos, devido às possíveis vantagens técnicas, econômicas, energéticas e ambientais, e ao desenvolvimento da biologia molecular (19).

### **1.3 Os cactos e seus fungos associados**

Estudos já revelaram a presença de fungos endofíticos em espécies da família Cactaceae. Particularmente sobre o gênero *Opuntia*, fungos foram encontrados na rizosfera relacionada aos cactos *Opuntia leptocaulis* (2, 20) e *O. versicolor* (21) nativos do Deserto de Sonora, EUA, e produzem grande diversidade de substâncias, com estruturas químicas inéditas, atividade anticancerígena e forte influência na adaptação das espécies ao meio de ocorrência (22). O fato estimulou o estudo dos fungos endofíticos presentes na espécie *O. monacantha* devido as suas propriedades e a facilidade de coleta.

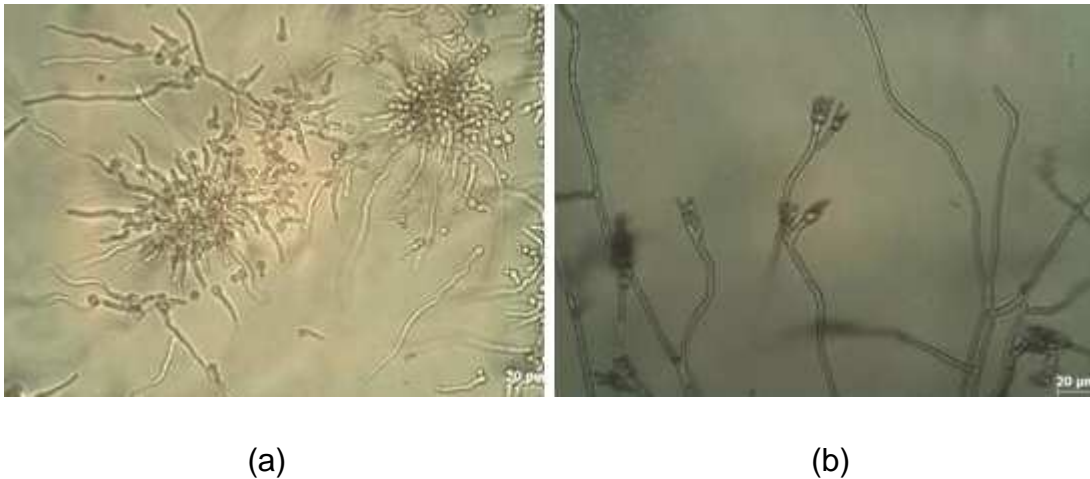
O fracionamento bioguiado do extrato acetato de etila dos metabólitos do fungo endofítico *Chaetomium globosum*, isolado da raiz do cacto *Opuntia leptocaulis*, permitiu o isolamento de novas xantonas, além de duas antraquinonas conhecidas. Além disso, um dos compostos isolados apresentou uma alta citotoxicidade em sete diferentes linhagens de células cancerígenas, induzindo sinais clássicos de apoptose (2, 20).

O fungo *Aspergillus terreus* foi isolado da rizosfera de um cultivo da espécie *Opuntia versicolor* e também por fracionamentos bioguiados foi possível isolar uma nova ciclopentadiona, dois novos derivados de ácidos terrecíclicos e cinco compostos já conhecidos. Todos os compostos foram avaliados quanto a citotoxicidade em três diferentes linhagens de células e mostraram uma atividade citotóxica moderada (21).

Nesta perspectiva cladódios da espécie *O. monacantha* foram coletados na praia de Grumari (RJ), submetidos a um processo de esterilização superficial por lavagem com água destilada, solução de NaClO 3%, e novamente água destilada estéril, a fim de se eliminar os micro-organismos que vivem na superfície do vegetal.



Então, foram inoculados pedaços da parte interna do cladódio, e após repiques sucessivos visando o isolamento das estirpes, foram isoladas, visualmente, seis colônias diferentes. Uma das colônias isoladas foi identificada como sendo o fungo endofítico *Penicillium citrinum*. A análise morfológica deste fungo ao longo de 24 e 48 horas, usando microscópio óptico com aumento de 400 vezes (Figura 5) (23).



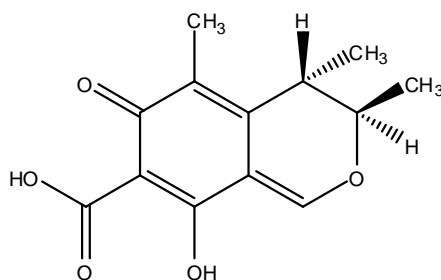
**Figura 5:** Foto do fungo endofítico *Penicillium citrinum* isolado dos cladódios da espécie *Opuntia monacantha* em 24 (a) e 48 (b) horas com aumento de 400 vezes.

Tal fungo foi cultivado em erlemeyer de 500 mL com 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL, e após 7 dias de crescimento o meio de cultura foi filtrado e submetido a partição com acetato de etila, a fim de se extrair os seus metabólitos secundários produzidos. O extrato obtido apresentou uma moderada atividade antioxidante (IC<sub>50</sub> 34,5 μg/mL), no teste com reagente DPPH (radical Difenilpicrilhidrazil), e uma alta atividade citotóxica na linhagem MCF-7, células de câncer de mama, no teste com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (23).

Realizou-se um primeiro aumento de escala a fim de obter maior massa de extrato acetato etila, da mesma forma que os primeiros estudos em erlemeyer de 500 mL contendo 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, na concentração de esporos de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL, com agitação de 170 RPM e a temperatura de 30°C. Novamente, após sete dias de crescimento filtrou-se o meio de cultura (com aplicação de vácuo utilizando funil de Büchner) separando-o da massa celular.

Porém desta vez foram cultivados cinco erlemeyers em paralelo nestas mesmas condições para cada fungo (23).

O meio líquido de cultura foi submetido a uma partição com acetato de etila e conseguiu-se obter mais massa de extrato, que foi particionada através de uma coluna de gel de sílica que gerou, entre outras, uma fração rica em uma substância identificada como sendo a micotoxina citrinina (Figura 6) (23).



**Figura 6:** Estrutura química da citrinina

Desse modo é interessante conhecer a cinética de crescimento visando encontrar o tempo ideal para a extração desses metabólitos com alta atividade antioxidante e anticancerígena.

### 1.3.1 *Penicillium citrinum* e citrinina

Há mais de 150 espécies filamentosos no gênero *Penicillium*. E a espécie *Penicillium citrinum* é frequentemente isolada de milho, soja, arroz, trigo e amaranto e é o principal produtor da micotoxina citrinina (24, 25).

A citrinina, um metabólito benzopirano tóxico ácido (*3R-trans*)-4,6-Dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-carboxílico, possui fórmula molecular  $C_{13}H_{14}O_5$ , ponto de fusão em torno de 175 °C e é um sólido amarelo, insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e solúvel em solventes como clorofórmio e acetato de etila (26).

Esta substância pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus*. Sua descoberta data da década de 1930, sendo inicialmente estudada com o propósito de ser empregada como antibiótico. Porém, após a demonstração de sua atividade nefrotóxica, tal objetivo foi descartado. Essa

segunda descoberta gerou uma preocupação em torno de suas propriedades, uma vez que os fungos produtores dessa micotoxina são contaminantes naturais de frutas e grãos, com potencial toxicidade para consumidores de tais produtos (25, 27, 28).

Micotoxinas produzidas por alguns fungos filamentosos podem contaminar grande variedade de alimentos e ração animal. Devido aos seus vários efeitos tóxicos e à sua alta resistência a tratamentos térmicos, a presença de micotoxinas em alimentos é potencialmente perigosa para a saúde humana e animal (28).

#### **1.4 Atividade antioxidante**

Os organismos aeróbios vivem em função do oxigênio molecular, utilizando-o como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Todavia quando não ocorre a redução total do oxigênio são formadas moléculas quimicamente reativas, conhecidas como espécies reativas de oxigênio – EROs (29). Dentre estas as espécies, a mais tóxica é o radical hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ) que possui a capacidade de criar um mecanismo cíclico de auto-oxidação, que vai se ampliando progressivamente e lesando as estruturas intracelulares, o meio extracelular e os tecidos. Além deste radical, outras duas espécies reativas de oxigênio podem ser formadas, o radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que apesar de menos tóxicas, também podem gerar radical hidroxila por reações catalisadas por metais. Diante desta produção e levando-se em conta os efeitos danosos desses radicais, os organismos que evoluíram utilizando o oxigênio selecionaram mecanismos de defesa, que incluem enzimas e moléculas antioxidantes, a fim de controlar a produção de EROs bem como reparar os danos por eles causados. O balanço entre a produção de EROs e a defesa antioxidante determina o grau de estresse oxidativo que, muitas vezes, causa lesões irreparáveis às biomoléculas (30). As EROs atuam como toxinas, mediadores e moduladores de processos inflamatórios estando, conseqüentemente, relacionadas a várias patologias como dengue, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer e outras (31). Os antioxidantes endógenos e exógenos são efetivos para o tratamento de algumas, mas não todas as condições associadas com danos oxidativos *in vivo* e a procura por essas

substâncias seria um interessante ponto de partida na busca de candidatos promissores à terapia de várias doenças.

Sabe-se ainda que fungos endofíticos têm produzido numerosos compostos antioxidantes que podem exercer uma importante contribuição no aumento da tolerância ao estresse oxidativo das plantas hospedeiras (32). Desse modo o conhecimento desses metabólitos secundários com potencial antioxidante produzidos por esses fungos poderia contribuir para o conhecimento dos mecanismos de defesa dessas plantas.

## 2. OBJETIVO

---

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos metabólitos produzidos durante o crescimento do fungo endofítico *Penicillium citrinum*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 Reagentes e meio de cultura

O meio de cultura usado no crescimento do fungo foi Sabouraud Dextrose Broth (SIGMA) na concentração de 30 g/L (10 g de peptona micológica e 20 g de glicose. Ainda para o inóculo foram usados os sais  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (VETEC) para o preparo de solução tampão e Tween 80.

Os solventes orgânicos usados foram: acetato de etila grau P.A. (VETEC) em uma partição líquido-líquido; metanol grau P.A. (VETEC) para dissolver a amostra e como fase móvel para cromatografia em camada delgada; e diclorometano grau P.A. (VETEC) como fase móvel em cromatografia em camada delgada.

Também foram usados o reagente DPPH, radical Difenilpicrilhidrazil, (ALDRICH) e a solução do sal  $\text{FeCl}_3$  (VETEC), como reveladores na análise por cromatografia em camada delgada. Além do uso de água destilada e água grau Milli-Q (resistividade maior que 18,2 m $\Omega$ .cm), somente para a diluição da amostra para a dosagem de glicose por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 3.2 Manutenção da cultura

A cultura foi estocada em geladeira, em temperatura de 5 a 10 °C, dentro de tubos de ensaio com rosca em meio Sabouraud Dextrose, na concentração de 30 g/L, com 2% de ágar-ágar.

#### 3.3 Cultivo do fungo endofítico *P. citrinum*

O fungo endofítico *P. citrinum* foi cultivado em erlemeyer de 500 mL contendo 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.

As suspensões de esporos foram obtidas por meio de raspagem superficial das culturas no meio Sabouraud Dextrose com 2% de ágar-ágar. Os esporos foram transferidos para um tubo com uma solução estéril de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7, com uma gota de Tween 80. Esta foi agitada usando um vórtex e os

esporos foram contados em câmara de Neubauer. Então calculou-se o volume da solução com esporos necessário para se fazer o inóculo na concentração final de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.

No inóculo foram preparados 600 mL de meio Sabouraud Dextrose na concentração de 30 g/L e inoculou-se o fungo na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL. Agitou-se o meio, a fim de se conseguir maior homogeneidade, e separou-se 120 mL deste todo em cinco erlemeyers diferentes de 500 mL, de forma a assegurar que todos os frascos continham a mesma quantidade de esporos.

### **3.4 Determinação do peso seco durante o crescimento**

Para se fazer a cinética de crescimento do fungo foi feito o seu peso seco após 3, 5, 7, 11 e 18 dias de crescimento. O cultivo para cada ponto foi feito em erlemeyers diferentes.

Primeiramente realizou-se tal experimento filtrando todo o meio de cultura, os 120 mL (com aplicação de vácuo utilizando funil de Büchner) através de papel de filtro, separando-o da massa celular, posteriormente seca em estufa a 60°C até peso constante. Então pesou-se a massa seca usando balança analítica.

Também se verificou a evolução do peso seco filtrando uma alíquota de 5,0 mL do meio de cultura usando uma membrana com porosidade de 0,22 µm. Tal filtração foi feita a vácuo e realizada em duplicata. A massa de célula foi seca em estufa a 60°C até atingir peso constante e depois pesada. Nesse experimento não foi feita a medida para o ponto de 18 dias de crescimento e também foi realizado cultivos em paralelo para cada ponto.

### **3.5 Dosagem de glicose**

O consumo de glicose foi verificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram feitas usando detector por índice de refração. Utilizou-se uma coluna HPX-87P (BioRad), fase móvel água grau milliQ, fluxo de 0,6 mL/min, temperatura da coluna de 80 °C e volume injetado de 20 µL. A corrida teve duração de 25 minutos e o tempo de retenção da glicose foi de 12,3 min. No método foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio de cultivo nos mesmos tempos em que foram realizadas as quantificações por peso seco, além do ponto 0 (referente a glicose

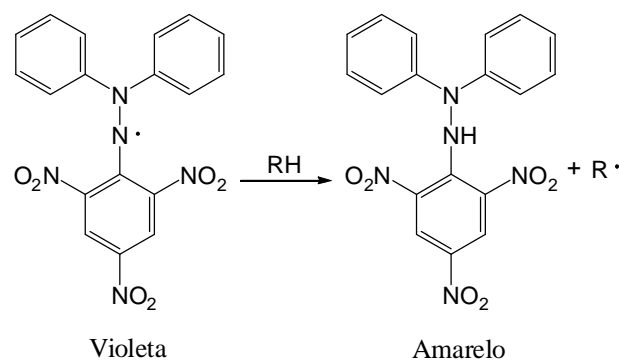
inicial do meio). A glicose foi quantificada através de uma curva de calibração já construída e gravada no equipamento.

### 3.6 Extração dos metabólitos

Após o crescimento o meio de cultura, todo o meio de cultura (120 mL) foi filtrado (com aplicação de vácuo utilizando o funil de Büchner), separando-o da massa celular. O sobrenadante foi submetido a uma partição com 50 mL de acetato de etila (4 vezes), as frações acetato de etila foram reunidas e o excesso de água retirado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Após filtração, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e o extrato seco pesado, para o cálculo do rendimento.

### 3.7 Análise da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi usado o reagente DPPH (Difenilpicrilhidrazil). O radical DPPH, de fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ , é um reagente que possui a cor violeta e ao ser reduzido apresenta uma coloração amarelada (Figura 7). Deste modo, após o tempo de reação, é possível medir a absorbância, no comprimento de onda de 517 nm, o DPPH remanescente (que não reagiu) no espectrofotômetro. Ele é um radical livre devido a um átomo de nitrogênio em sua estrutura que possui um elétron desemparelhado.



**Figura 7:** Reação de redução do radical DPPH

O ensaio consiste em reagir soluções de diferentes concentrações dos extratos obtidos (variando as concentrações finais do ensaio de 10  $\mu\text{g/mL}$  a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) com o reagente DPPH e após 30 minutos de reação, ler no espectrofotômetro a absorção do DPPH remanescente em 517 nm (33). A



porcentagem de inibição do radical DPPH pelo(s) agente(s) redutor(es) possivelmente presente(s) nos extratos (substâncias antioxidantes) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}) \times 100}{\text{absorbância do controle}}$$

O controle correspondente foi: 150 µL de MeOH + 50 µL de solução 200 µM de DPPH. O branco utilizado nas análises foi 200 µL de MeOH, volume correspondente ao volume total de reação. As amostras analisadas estavam em uma solução estoque com concentração de 1 mg/mL em MeOH, aproximadamente, pois cada extrato foi diluído de forma a ficar em uma concentração nessa faixa.

A concentração final de DPPH usada no ensaio foi de 50 µM em MeOH e o volume final de 200 µL, completando esse volume com MeOH sempre que a soma dos volumes da solução de DPPH e da amostra não fosse 200 µL. A leitura foi feita usando espectrofotômetro com leitor de placas de Elisa.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e geraram uma curva de porcentagem de inibição por concentração das amostras, para cada extrato. A atividade antioxidante foi expressa como valores de IC50 em µg/mL, que é a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH. O IC50 de cada amostra foi calculado a partir da equação da reta gerada em casa experimento.

### **3.8 Cromatografia em camada delgada (CCD) e densitometria**

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada usando cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (MERCK). A fase móvel utilizada foi a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1). A aplicação foi de 5 µL de amostra na concentração de 25 mg/mL em metanol, em 0,5 cm, usando uma seringa graduada, com espaçamento de 0,5 cm entre uma aplicação e outra. A amostra eluiu em 8,0 cm. Os reveladores usados foram radiação ultravioleta a 254 e 365 nm, além de revelação com reagente DPPH 0,4 mM em metanol e com solução FeCl<sub>3</sub> 10%.

O reagente  $\text{FeCl}_3$  10% é um revelador para fenóis. O cátion  $\text{Fe}^{3+}$  reage com as hidroxilas fenólicas formando um complexo colorido (Figura 8). Lembrando que alguns enóis também reagem.



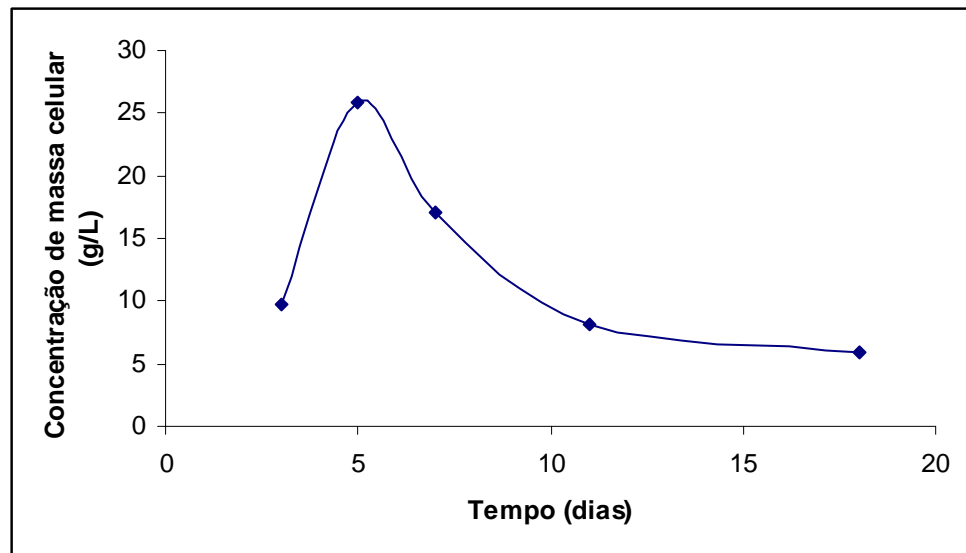
**Figura 8:** Reação de complexação do  $\text{Fe}^{3+}$  com as hidroxilas fenólicas

Para densitometria, medida da densidade luminosa oriunda de uma banda da placa cromatográfica, realizou-se a análise com o mesmo sistema, tendo como única diferença a concentração das amostras, que passou de 25 mg/mL para 10 mg/mL. Para realização da medida da densidade luminosa revelou-se as placas apenas com UV a 365 nm, e também aplicou-se na placa uma amostra enriquecida em citrinina como referência. A densitometria foi realizada a partir de uma fotografia da placa cromatográfica, e as medidas foram feitas através do aplicativo ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação do peso seco e da glicose no meio ao longo do crescimento

A determinação do peso seco foi realizada de duas formas diferentes. Na primeira determinação filtrou-se todo o meio de cultura usando papel de filtro, secou-se a massa celular em estufa a 60 °C e pesou-se. A massa obtida foi dividida pelo volume total de meio líquido (120 mL) a fim de se obter o valor em g/L. Com isso, se construiu uma curva de crescimento de concentração de massa celular por tempo (Figura 9).



**Figura 9:** Curva de crescimento do fungo endofítico *P. citrinum* gerada do primeiro cultivo em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.

Na curva de crescimento observa-se que o fungo endofítico *P. citrinum* cresce até o quinto dia. Posteriormente, verifica-se uma queda da biomassa. Porém este declive não era esperado, e sim um patamar após o quinto dia, uma vez que quando o fungo para de crescer toda a biomassa gerada durante seu crescimento ainda deveria ser observada na determinação do peso seco.

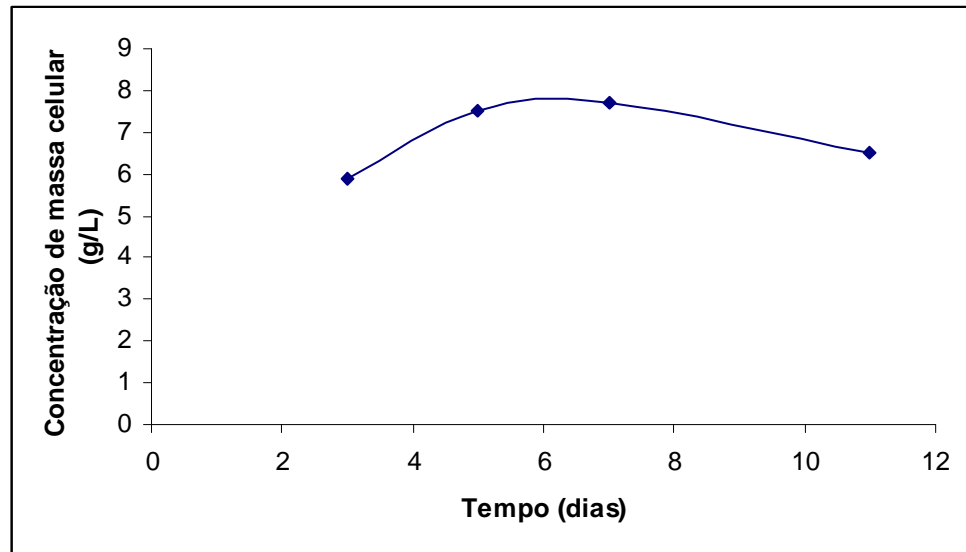
A lise celular é um processo de destruição da membrana celular, que pode ocorrer através de quitinases, proteases e glucanases que hidrolisam os componentes da parede celular, havendo a destruição da célula. Uma justificativa para a queda da biomassa observada está na lise celular, que gera fragmentos

celulares de menor tamanho, que podem atravessar o poro do papel de filtro. Deste modo parte da biomassa gerada pode ter sofrido lise celular, gerando fragmentos que não ficaram retidos no papel de filtro e, conseqüentemente, acarretando a perda de massa observada após o quinto dia de crescimento.

Com o intuito de se verificar melhor o comportamento da curva de crescimento do fungo estudado, realizou-se uma segunda determinação do peso seco ao longo do tempo. Nesta segunda determinação filtraram-se 5,0 mL de meio de cultura usando membrana com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ , pois desta forma os fragmentos de célula frutos de uma lise celular ficariam retidos. A massa de célula também foi seca em estufa a 60  $^{\circ}\text{C}$  neste segundo experimento.

Outra diferença entre as determinações de peso seco realizadas é que nesta segunda determinação não se fez o ponto referente a 18 dias de crescimento. Uma vez que já no primeiro havia sido observado que o fungo não estava mais crescendo após o quinto dia. Com isso fez-se apenas mais dois pontos (7 e 11 dias) após esse período.

Com os resultados de massa seca obtidos, esses valores foram divididos pelo volume de meio líquido filtrado, no caso 5 mL, para se obter o valor em g/L. Então se construiu uma curva de crescimento de concentração de massa celular por tempo (Figura 10).



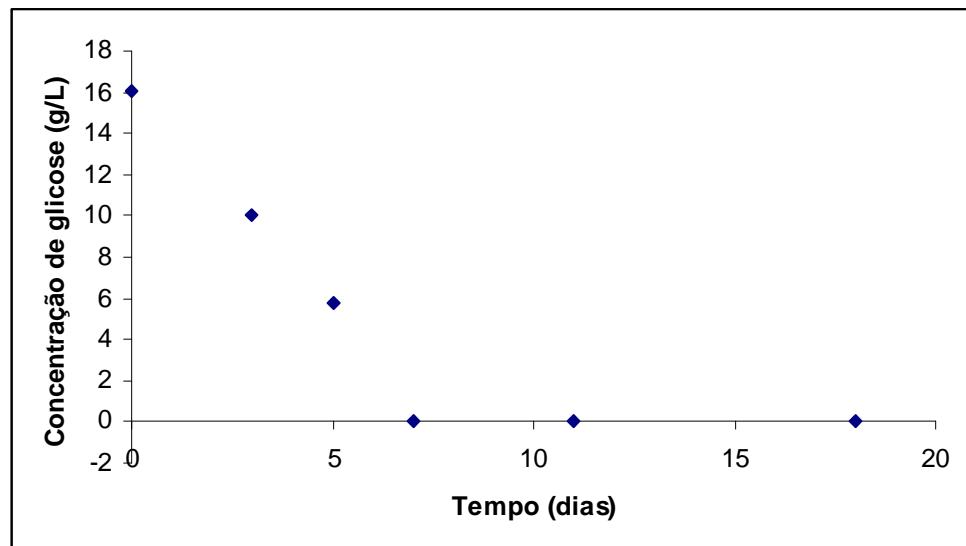
**Figura 10:** Curva de crescimento do fungo endofítico *P. citrinum* gerada do segundo cultivo em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.

Nesta segunda determinação observa-se o crescimento do fungo até o quinto dia, sendo que do quinto para o sétimo dia o fungo entra em fase estacionária de crescimento, diferentemente da primeira determinação, quando se observou um crescimento até o quinto dia e uma brusca queda de biomassa após esse tempo. Também foi possível observar nesta curva uma queda da biomassa após sétimo dia. Outra diferença entre os experimentos está nas concentrações de células obtidas. No primeiro experimento observou-se um aumento da biomassa ao longo do tempo muito maior que no segundo.

É possível apontar alguns problemas experimentais nesta segunda determinação, pois uma das dificuldades foi manter o meio homogêneo para a retirada de uma alíquota para filtrar. E também não era possível filtrar todo o meio de cultura, como na primeira determinação, pois tal volume entupiria o poro da membrana. Deste modo, apesar das duplicatas, uma alíquota poderia conter um micélio a mais ou a menos que na outra, devido à dificuldade de homogeneização do sistema, e esta diferença gerou resultados próximos entre si. Contudo, isto não explica a menor massa de células, sugerindo que neste segundo cultivo o fungo realmente cresceu menos que no primeiro.

Todavia, em ambos os experimentos pode ser observado que o fungo endofítico estudado cresce até – aproximadamente – 6 dias, e após esse período pode ocorrer uma lise celular, pois há uma queda nos valores de massa filtrada.

Durante a primeira determinação de peso seco, foram retiradas alíquotas nos tempos estudados mais a alíquota do ponto 0, para a dosagem de glicose via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram feitas diluições para os 3 primeiros pontos, o inicial, o de 3 dias e o de 5 dias, a fim de fazer com que as concentrações caíssem na faixa de concentrações da curva de calibração. Com resultados construiu-se uma curva de concentração de glicose por tempo (Figura 11).



**Figura 11:** Consumo de glicose durante o crescimento do fungo *P. citrinum* em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL.

A glicose do meio acaba entre o quinto e o sétimo dia, o que é coerente com os resultados da cinética de crescimento, uma vez que coincide com o crescimento do fungo neste período. Associando este resultado com a queda da massa de células verificada após o sétimo dia, pode-se sugerir que ocorre a morte dos fungos logo após cessar a sua fonte de carbono, no caso glicose.

#### 4.2 Avaliação da atividade antioxidante, análise por cromatografia em camada delgada e densitometria dos extratos gerados durante o crescimento.

Após a separação de todo o micélio do meio líquido por filtração, o sobrenadante foi submetido a uma partição com acetato de etila, a fim de se extrair os metabólitos produzidos durante o crescimento do fungo endofítico *P. citrinum*.

Para cada tempo de crescimento realizou-se uma partição que gerou diferentes massas de extrato (Tabela 1).

**Tabela 1:** Massas de extrato obtidas nas partições do meio de cultura com acetato de etila ao longo do crescimento.

Tempo de crescimento (dias)	Massa de extrato do cultivo 1 (mg)	Massa de extrato do cultivo 2 (mg)
3	13,6	13,0
5	20,0	20,2
7	16,7	19,6
11	12,3	18,1
18	12,2	*

Cultivo 1, o primeiro cultivo em que o peso seco foi feito usando papel de filtro; e o cultivo 2, o segundo cultivo em que o peso seco foi feito usando membrana.

As maiores massas de extratos foram obtidas na extração após 5 dias de crescimento. Depois deste tempo houve uma queda da massa de extrato obtida em ambos os experimentos. Este tempo de 5 dias está próximo ao tempo em que há consumo total da glicose do meio e do tempo em que o fungo para de crescer.

Na fase orgânica da extração ficaram solubilizadas as moléculas que possuem baixa solubilidade em água, pois a outra fase da partição trata-se de um solvente mais polar que o acetato de etila. A queda de rendimento do extrato pode ter sido em função da degradação de moléculas maiores, em moléculas polares menores, após o esgotamento da glicose no meio.

Com os extratos obtidos foram realizados ensaios para verificar a atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi medida através do ensaio com radical DPPH.

Como já mencionado, a atividade antioxidante foi avaliada usando-se diferentes concentrações de extrato, de onde estimou-se o IC50 (Tabela 2), que é a concentração de extrato necessária para reduzir 50% do DPPH do meio.

**Tabela 2:** Resultados dos ensaios de atividade antioxidante com o reagente DPPH dos extratos gerados.

Tempo de crescimento (dias)	IC50 do extrato do cultivo 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50 do extrato do cultivo 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )
3	24,0	39,3
5	39,5	35,5
7	16,7	38,2
11	31,6	57,0
18	41,5	*

O Cultivo 1, o primeiro crescimento em que o peso seco foi feito usando papel de filtro; e o Cultivo 2, o segundo crescimento em que o peso seco foi feito usando membrana.

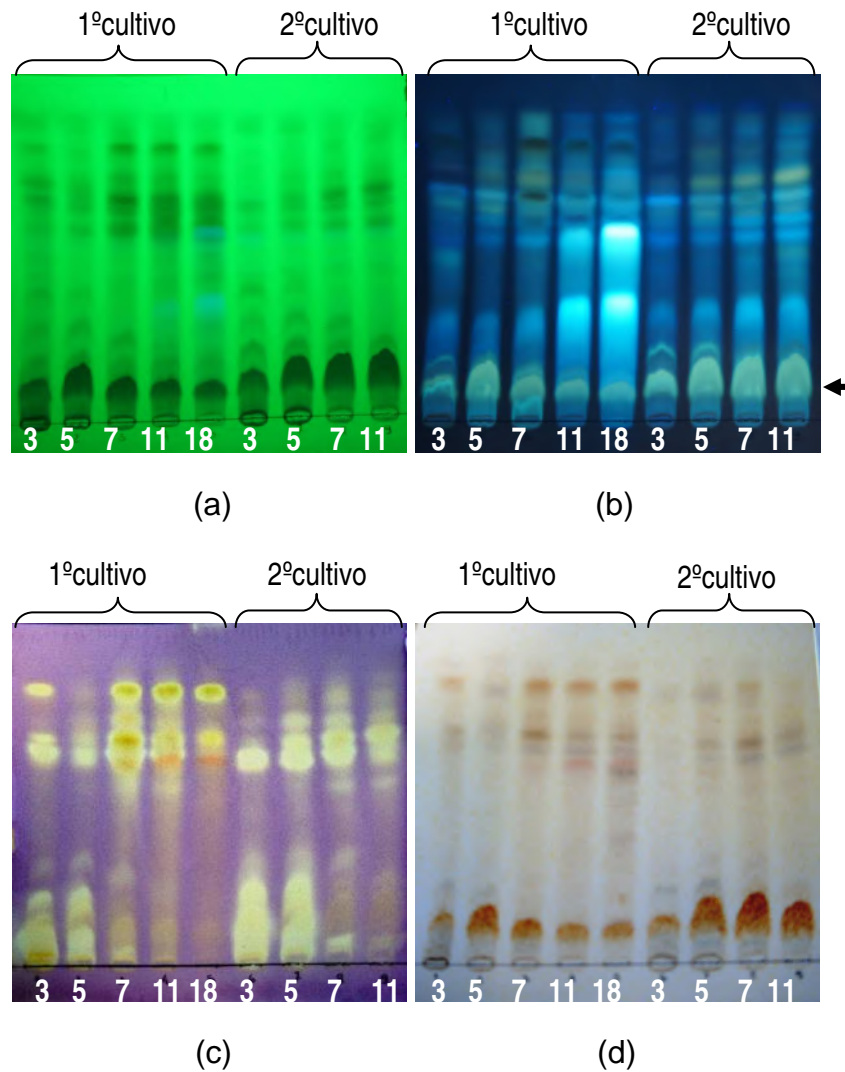
De uma forma geral todos os extratos mostraram uma atividade antioxidante moderada, exceto o extrato de 7 dias do primeiro cultivo que apresentou uma maior atividade (IC50 16,7  $\mu\text{g/mL}$ ). Lembrando que como o IC50 é a concentração de extrato capaz de reduzir a concentração de DPPH à metade, quanto menor o IC50 maior a atividade antioxidante.

Também se pode notar que os resultados do segundo cultivo não variaram muito durante o cultivo do fungo, o que sugere que a taxa de produção dos metabólitos com essa atividade é praticamente a mesma, não sendo favorecida em qualquer período específico do crescimento.



Uma forma de se avaliar a atividade antioxidante qualitativamente é por cromatografia em camada delgada usando como revelador o reagente DPPH. Após ser reduzido, o radical DPPH apresenta a cor amarela, o que permite visualizar onde está concentrada a atividade antioxidante após uma separação por cromatografia. Tal análise também permite verificar se todos os extratos possuem o mesmo perfil químico e se a atividade está concentrada no mesmo ponto.

Deste modo, realizou-se uma cromatografia em camada delgada e revelou-se a placa usando diferentes reveladores, como radiação ultravioleta a 254 e 365 nm, além de reveladores químicos como DPPH e o  $\text{FeCl}_3$  (Figura 12).



**Figura 12:** CCD dos extratos obtido pela partição acetatos de etila revelados com: (a) UV 254 nm, (b) UV 365 nm, (c) reagente DPPH 0,4 mM, e (d)  $\text{FeCl}_3$  10%. Os números indicam o tempo de cada de cultivo, em dias. As condições foram: sílica gel como fase estacionaria e a fase móvel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1), com aplicação 5  $\mu\text{L}$  de amostra na concentração de 25 mg/mL em metanol, em 0,5 cm, com espaçamento de 0,5 cm entre uma aplicação e outra, e eluição de 8,0 cm.

Nas CCD reveladas usando radiação UV a 254 e 365 nm é possível observar que o perfil químico dos metabólitos produzidos se modifica ao longo do tempo. Pode-se verificar uma tendência a formar moléculas menos polares ao longo do tempo, pois as bandas com maior fator de retenção ( $R_f$ ) se intensificam conforme o maior tempo de cultivo do fungo. Além disso, visualmente, observa-se o efeito contrário nas bandas com menor  $R_f$  ao longo do tempo.

Lembrando que fator de retenção ( $R_f$ ) é considerado um dos parâmetros mais importantes em CCD. Ele é a razão entre a distância percorrida pela substância pela

distância de eluição da fase móvel. Logo, quanto maior o  $R_f$ , maior a distância percorrida pela amostra.

Comparando os dois cultivos realizados, o primeiro foi aquele em que o peso seco foi realizado filtrando-se com papel de filtro todo o micélio e o segundo é o que fez-se tal determinação usando uma membrana, nota-se pela CCD que são semelhantes. Porém o aparecimento de uma banda azul mais intensa (quando revelada em 365 nm) no primeiro cultivo, em 11 dias, sugere uma maior variação dos metabólitos ao longo do tempo neste cultivo.

O resultado da placa revelada com DPPH foi muito interessante. Lembrando que as bandas que possuem atividade revelaram-se como uma banda amarela, fruto da redução do radical DPPH. Nele pode-se verificar que as substâncias com potencial antioxidante se modificam ao longo do tempo, pois nos extratos gerados com menor tempo de cultivo, até 5 dias, as substâncias reveladas possuem baixo  $R_f$ , e nos extratos gerados com maior tempo de cultivo, a partir de 5 dias, elas aparecem em um  $R_f$  maior.

Analisando as CCD dos extratos gerados no primeiro cultivo, não é possível ver diferenças na atividade antioxidante entre os extratos, apesar de um extrato ter mostrado uma maior atividade no ensaio quantitativo com o radical DPPH. O mesmo acontece para os extratos gerados no segundo cultivo, porém nesse a atividade antioxidante não variou muito ao longo do tempo e as bandas que mostraram atividade na CCD também são diferentes entre os extratos com o decorrer do tempo.

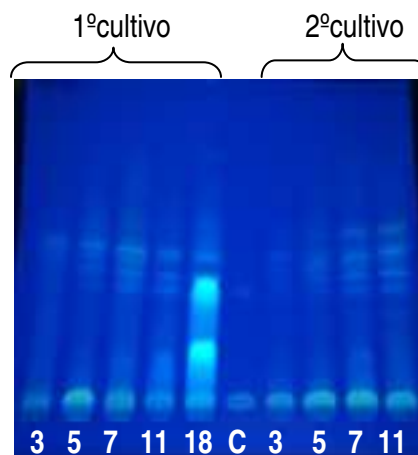
Todos os extratos tiveram bandas reveladas com  $\text{FeCl}_3$  10%, o que indica a presença de fenóis em todos eles. É possível ver uma banda indicando a presença de fenol próximo a base, revelada na cor laranja, além de outras bandas coloridas com maiores  $R_f$ s, que só aparecerem mais intensamente após 7 dias de cultivo.

É importante comparar as CCD reveladas usando o reagente DPPH e as reveladas com  $\text{FeCl}_3$  10%, pois compostos fenólicos normalmente possuem atividade antioxidante. Essa atividade é dada pelas suas propriedades redutoras e estrutura química, que possuem um importante papel no sequestro de EROs e quelação de metais de transição, agindo na etapa de iniciação e propagação do processo oxidativo. Além disso, os intermediários formados são estáveis devido à ressonância do anel aromático destas estruturas (34).

Comparando-se as duas placas observa-se que bandas foram reveladas usando os dois reagentes, o que sugere que tais compostos fenólicos devem ser responsáveis pela atividade antioxidante. Também há bandas reveladas com o  $\text{FeCl}_3$  10% e que não foram reveladas usando o reagente DPPH, então essas tratam-se de compostos fenólicos que não possuem potencial antioxidante.

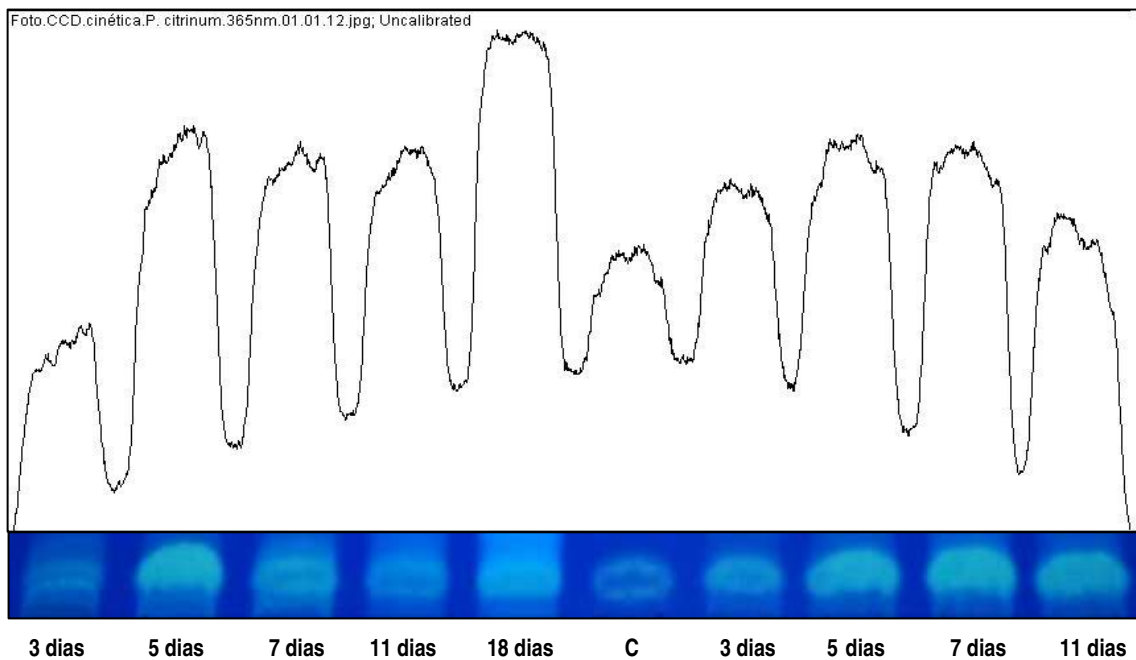
Ainda sobre as CCD, é possível visualizar uma mancha amarela mais intensa em todas as amostras (indicada na figura 12 com uma seta), quando reveladas no UV a 365 nm. Além disso, é possível observar uma variação da sua intensidade entre os extratos, a fim de se confirmar essa variação de intensidade ao longo do tempo, que é proporcional a quantidade da substância em questão, realizou-se uma medida por densitometria.

Como essa banda amarela é a mais intensa e a densitometria é a medida da densidade luminosa, a luminosidade de outras bandas poderiam interferir na análise, por isso fez-se outra CCD em uma concentração mais baixa de amostra (10 mg/mL), para realizar a medida relativa da banda por densitometria (Figura 13). Além disso, aplicou-se também uma fração rica em citrinina, isolada em outro trabalho, por ser uma das principais substâncias produzidas pelo fungo *P. citrinum*.



**Figura 13:** CCD dos extratos obtido pela partição acetatos de etila revelados com UV 365 nm. Os números indicam o tempo de cada de cultivo, em dias. As condições foram: sílica gel como fase estacionaria e a fase móvel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1), com aplicação 5  $\mu\text{L}$  de amostra na concentração de 10 mg/mL em metanol, em 0,5 cm, com espaçamento de 0,5 cm entre uma aplicação e outra, e eluição de 8,0 cm. E em C é a aplicação de uma fração enriquecida em citrinina com concentração de 2 mg/mL.

Pode-se visualizar a alteração da intensidade, ao longo do tempo, da banda que possui mesmo Rf que a citrinina, e esta é uma banda que aparece em todos os extratos. Então adotou-se a abundância de tal como parâmetro para se verificar a alteração dos metabólitos produzidos ao longo do tempo, por densitometria (Figura 14).



**Figura 14:** Densitograma da placa cromatográfica com aplicação da amostra na concentração de 10 mg/mL. O primeiro grupo de dias é referente ao primeiro cultivo, o C é amostra de referência (fração enriquecida em citrinina), e o segundo grupo de dias é referente ao segundo cultivo.

Os picos no densitograma são referentes à densidade de luminosidade medida para área recortada da figura, onde foram destacadas apenas as bandas de interesse da placa cromatográfica. Então os picos foram integrados e calculou-se a porcentagem relativa da banda. A porcentagem relativa foi calculada em relação ao pico de maior área do densitograma para cada cultivo, sendo esse considerado o 100% e os demais referentes a ele. No caso a porcentagem relativa é a razão da área em questão pela maior área daquele cultivo multiplicado pelo fator 100 (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados da integração do densitograma após separação por CCD dos extratos gerados.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Área</b>	<b>Porcentagem relativa (%)</b>
3a	8008,7	52,6
5a	15216,9	100
7a	13051,7	85,8
11a	11097,6	72,9
18a	16735,3	-
3b	8065,9	63,0
5b	13576,0	95,0
7b	14290,6	100
11b	12802,2	89,6

a: referente ao primeiro crescimento; b: referente ao segundo crescimento.

Pode-se verificar em ambos os cultivos que há uma variação na concentração de citrinina ao longo do tempo, confirmando o que já se havia sugerido apenas com as CCD antes da densitometria. Nos dois casos também há um aumento na concentração de citrinina até certo tempo, seguido de uma queda. Lembrando que a densitometria foi uma técnica adotada apenas para estimar a porcentagem relativa de citrinina ao longo do cultivo.

No segundo cultivo observa-se um aumento da concentração de citrinina até o sétimo dia, seguido de uma pequena queda até o décimo primeiro dia. Já no primeiro cultivo há um aumento da concentração até o quinto dia, seguido de uma queda até o décimo primeiro dia.

Entretanto, ao observar a banda referente à citrinina com 18 dias nota-se que ela não é a mais intensa, mas foi a que apresentou a maior área devido ao rastro luminoso de outra banda, dessa forma não se pode afirmar o que acontece com a concentração de citrinina neste ponto, por isso descartou-se tal ponto na

determinação da área relativa e adotou-se como 100% a área referente ao quinto dia. Lembrando que a exclusão desse ponto não impediu a estimativa das demais concentrações deste primeiro cultivo.

De uma forma geral, após todas as análises, pode-se dizer que ambos os cultivos apresentaram resultados semelhantes, principalmente pela análise por CCD em que pode ser observado em quase que sua maioria a mesma gama de bandas nos dois cultivos. Contudo em alguns resultados como os do ensaio com o reagente DPPH e a cinética de crescimento apresentaram algumas diferenças.

## 5. CONCLUSÃO

---

O presente trabalho avaliou a atividade antioxidante dos metabólitos associados ao crescimento do fungo endofítico *Penicillium citrinum* isolado dos cladódios de *Opuntia monacantha*. Primeiro realizou-se a cinética de crescimento do fungo em 120 mL de meio Sabouraud Dextrose, pH 5,6, com agitação de 170 RPM a temperatura de 30°C na concentração de inóculo de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL, com procedimentos de determinação de peso seco diferentes, e em ambas as determinações verificou-se que o fungo endofítico cresce até, aproximadamente, o quinto dia. Também se realizou a dosagem de glicose do meio ao longo desse crescimento e verificou-se o seu esgotamento entre o quinto e o sétimo dia de crescimento.

Para analisar a atividade antioxidante dos metabólitos produzidos foi feita uma partição com acetato de etila, a fim de se extrair os metabólitos, e houve variação da massa de extrato obtida ao longo do tempo, sendo o extrato do quinto dia o que apresentou maior massa. No ensaio com radical DPPH para avaliar a atividade antioxidante os extratos mostraram uma atividade moderada, exceto o extrato de 7 dias do primeiro cultivo que apresentou uma maior atividade (IC<sub>50</sub> 16,7 µg/mL). Também se pode dizer que não houve muita variação na atividade entre os dias do segundo cultivo.

Na análise por CCD dos extratos obtidos ao revelar as placas com radiação UV a 254 e 365 nm verificou-se que o perfil químico dos metabólitos produzidos se modifica ao longo do tempo, aparecendo bandas com maior R<sub>f</sub> conforme maior tempo de cultivo e ficando menos intensas as de baixo R<sub>f</sub>. E pode-se verificar também que ambos os cultivos apresentaram um perfil químico semelhante entre si. Ao revelar as placas com o reagente DPPH pode-se perceber que as substâncias que apresentaram atividade antioxidante se modificam ao longo do tempo, pois os extratos com menor tempo de crescimento apresentou mais bandas com baixo R<sub>f</sub>, enquanto os extratos a partir do sétimo dia revelaram bandas com um R<sub>f</sub> mais alto. Por fim, a revelação com solução de FeCl<sub>3</sub> 10% mostrou a presença de compostos fenólicos no extrato, e alguns deles mostraram atividade antioxidante também, uma vez que as bandas foram reveladas com os dois reagentes. E pode-se verificar a



variação da porcentagem relativa da banda do mesmo Rf que o da citrinina ao longo do tempo, apresentando um máximo, seguido de uma queda, por densitometria.

Pode-se concluir que, apesar de algumas diferenças nos resultados da cinética de crescimento e do ensaio quantitativo com o radical DPPH, ambos os cultivos apresentaram resultados semelhantes, principalmente pela análise por CCD em que pode ser observado, em quase que em sua maioria, a mesma gama de bandas nos dois cultivos.

## 6. PROPOSTAS FUTURAS

---

Melhorar o método para medir o crescimento celular e após este estudo prévio da cinética, pretende-se fazer uma otimização das condições de cultivo através de um planejamento experimental, estudando a influência de diferentes variáveis na produção de compostos bioativos, como: a forma de cultivo; concentração de meio Sabouraud Dextrose; concentração de sais (concentração de água do mar artificial utilizada); pH; temperatura e tempo de cultivo.

Após essa otimização será estudado uma ampliação de escala de cultivo. Inicialmente, o aumento da escala será feito aumentando-se o número de frascos de cultivo, garantindo-se as mesmas condições metabólicas (aeração). O processo de extração será feito apenas com maiores volumes de solvente, visando-se avaliar os rendimentos obtidos e também as atividades biológicas dos metabólitos extraídos em maior escala. Após a validação dos rendimentos e das atividades biológicas dos metabólitos extraídos serão conduzidos experimentos em maiores volumes de meio de cultura (500 mL) ainda em frascos agitados e posteriormente em biorreator.

Nesta sistemática de trabalho relacionada à busca das substâncias bioativas o trabalho de isolamento dos metabólitos presentes nos extratos ativos dar-se-á por acompanhamento pelos ensaios biológicos (isolamento bio-guiado). Esta estratégia deve gerar poucas frações permitindo o acompanhamento mais ágil e racional da bioatividade. No processo, os extratos serão submetidos a métodos cromatográficos como cromatografia em coluna (CC) por adsorção (gel de sílica) e/ou exclusão (Sephadex LH-20), cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-Prep) em gel de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica e semi-preparativa utilizando-se detector de ultravioleta (UV) e arranjo de diodo (DAD). A caracterização estrutural inequívoca das substâncias de interesse será estabelecida por Espectrometria nas regiões do infra-vermelho (IV) e UV, espectrometria de massas (impacto de elétrons) e eletrospray (CLAE-EM), RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em uma e duas dimensões, rotação óptica, dicroísmo circular e transformações químicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Koehn, F. E.; Carter, G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4, 206-220.
2. Wijeratne, E. M. K.; Paranagama, P. A.; Gunatilaka, A. A. L., Five new isocoumarins from Sonoran desert plant-associated fungal strains *Paraphaeosphaeria quadrisepitata* and *Chaetomium chiversii*. *Tetrahedron* **2006**, 62, 8439-8446.
3. Gunatilaka, A. A. L., Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, (3), 509-526.
4. Romão, A. S. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* - planta hospedeira. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.
5. Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, and endophytic fungus of pacific yew. *Science* **1993**, 260, 214-216.
6. Yuan, J. I.; Jian-Nan, B. I.; Bing, Y.; Xu-Dong, Z., Taxol producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. *Chinese Journal of Biotechnology* **2006**, 22, 1-6.
7. Sirikantaramas, S.; Asano, T.; Sudo, H.; Yamazaki, M.; Saito, K., Camptothecin: therapeutic potential and biotechnology. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2007**, 8, 196-202.
8. Kusari, S.; Spiteller, M., Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural Product Reports* **2011**, 28, 1203-1207.
9. Bravo-Hollis, H.; Scheinvar, L. A., El interesante mundo de las cactáceas. Ed. Fondo de Cultura Económica: Mexico, **1995**.
10. Stintzing, F. C.; Carle, R., Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutritional Food Research* **2005**, 49, 175-194.
11. Mata, R.; Mclaughlin, J. L., Cactus alkaloids. 50. A comprehensive tabular summary. *Revista Latinoamericana de Quimica* **1982**, 12, 95-117.
12. Valente, L. M. M.; Scheinvar, L.; Silva, G. C.; Antunes, A. P.; Santos, F. A. L.; Oliveira, T. F.; Tappin, M. R. R.; Aquino-Neto, F. R.; Pereira, A. S.; Carvalhaes, S. F.; Siani, A. C.; Santos, R. R.; Soares, R. O. A.; Ferreira, E. F.; Bozza, M.; Stutz, C.;

Gibaldi, D., Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacognosy Magazine* **2007**, 3, (11), 167-172.

13. Valente, L. M. M.; Paixão, D.; Nascimento, A. C.; Santos, P. F. P.; Scheinvar, L. A.; Moura, M. R. L.; Tinoco, L. W.; Gomes, L. N. F.; Silva, J. F. M., Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chemistry* **2010**, 123, 1127-1131.

14. Lima, I. M. M.; Gama, N. S., Registro de plantas hospedeiras (Cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diapris echinocacti* (Bouché), cochonilha-da-palmaforageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. *Neotropical Entomology* **2001**, 30, 479-481.

15. Lenzi, M.; Soares, J.; Orth, A. I., Predação de *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. (Cactaceae) por *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) em restingas da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* **2006**, 19, (3), 35-44.

16. Yang, N.; Zhao, M. M.; Zhu, B. H.; Yang, B.; Chen, C. H.; Cui, C.; Jiang, Y. M., Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2008**, 9, (4), 570-574.

17. Zhao, M.; Yang, N.; Yang, B.; Jiang, Y.; Zhang, G., Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladodes in relation to their anti-glycated activities. *Food Chemistry* **2007**, 105, 1480-1486.

18. Strobel, G.; Daisy, B., Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2003**, 67, (4), 491-502.

19. Ferrara, M. A., Fungos endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. *Revista Fitos* **2006**, 2, (1), 73-79.

20. Wijeratne, E. M. K.; Turbyville, T. J.; Fritz, A.; Whitesell, L.; Gunatilaka, A. A. L., A new dihydroxanthone from a plant-associated strain of the fungus *Chaetomium globosum* demonstrates anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 7917-7923

21. Wijeratne, E. M. K.; Turbyville, T. J.; Zhang, Z.; Bigelow, D.; Pierson, L. S.; VanEtten, F. D.; Whitesell, L.; Canfield, L. M.; Gunatilaka, A. A. L., Cytotoxic constituents of *Aspergillus terreus* from the rhizosphere of *Opuntia versicolor* of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products* **2003**, 66, 1567-1573.

22. Turbyville, T. J.; Wijeratne, E. M. K.; Whitesell, L.; Gunatilaka, L. A. A., The anticancer activity of the fungal metabolite terrecyclic acid A is associated with modulation of multiple cellular stress response pathways. *Molecular Cancer Therapeutics* **2005**, 4, 1569-1576.

23. Wolff, T.; Ferreira, I. R. C. G.; Almeida, R. V.; Liu, M. X.; Gunatilaka, A. A. L.; Scheinvar, L. A.; Pereira, M. D.; Castro, F. A. V.; Valente, L. M. M., Investigation of the diversity and production of bioactive metabolites of the microbiota associated with *Opuntia monacantha* (Cactaceae) In *3rd Brazilian Conference on Natural Products*, Ouro Preto, MG, Brazil, 2011
24. Tonon, S. A.; Marucci, R. S.; Jerke, G.; Garcia, A.; Vellon, L.; Ferreras, J., Hongos contaminantes del arroz producido em La región central del Mercosur. *Alimentaria Latino Americana* **1996**, 214, 39-45.
25. Hetherington, A. C.; Raistrick, H., Studies in biochemistry of microorganisms XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Phil. Trans. R. Soc. London* **1931**, 220, 269-297.
26. Ribeiro, S. M.; Chagas, G. M.; Campelo, A. P.; Kluppel, M. L., Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effects on the homeostasis of reactive oxygen species. *Cell Biochemistry and Function* **1997**, 15, 203-209.
27. Damodaran, C.; Ramadoss, C. S.; Shanmugasundaram, E. R. B., A rapid procedure for the isolation, identification and estimation of citrinin. *Analytical Biochemistry* **1973**, 52, 482-488.
28. Betina, V., Citrinin and related substances. In: V. Betina (Ed). *Mycotoxins, production, isolation, separation and purification*. Elsevier, Sci. Publ. Co. Inc. **1984**, New York, 3-236.
29. Beckman, K. B.; Ames, B. N., The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* **1998**, 78, 547-581.
30. Fernandes, P. N.; Mannarino, S. M.; Silva, C. G.; Pereira, M. D.; Panek, A. D.; Eleutherio, E. C. A., Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* **2007**, 12, 236-244.
31. Sies, H.; ed., Antioxidants in disease, mechanisms and therapy. In *Advances in Pharmacology*, Academic Press: San Diego, **1997**.
32. White-Jr, J. F.; Torres, M. F., Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol. Plant.* **2010**, 138, 440-446.
33. Sharma, O. P.; Bhat, T. K., DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* **2009**, 113, 1202-1205.
34. Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.;

Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica. Nova* **2007**, 30, (2).

35. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 461-477.