

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/02/2020.

**Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

Glaucia Hollaender Braun

**Exploração do Potencial Químico e Biológico de
Fungos Endofíticos e de Fungos Derivados de
Ambiente Marinho em Associação Ecológica com
Ascídias**

Araraquara, SP

2018

Glaucia Hollaender Braun

**Exploração do Potencial Químico e Biológico de
Fungos Endofíticos e de Fungos Derivados de
Ambiente Marinho em Associação Ecológica com
Ascídias**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B825e

Braun, Glauca Hollaender

Exploração do potencial químico e biológico de fungos endofíticos e de fungos derivados de ambiente marinho em associação ecológica com ascídias / Glauca Hollaender Braun. – Araraquara, 2018.

128 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

1. Fungos derivados de marinhos. 2. Fungos endofíticos. 3. Atividade biológica. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 40300005




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Investigação Química e Biológica de Metabólitos Secundários Produzidos por Fungos Endofíticos e Fungos Derivados de Ambiente Marinho em Associação Ecológica com Ascídias

AUTORA: GLAUCIA HOLLAENDER BRAUN

ORIENTADORA: ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. SÉRGIO RICARDO AMBRÓSIO
Departamento de Pós Graduação / Universidade de Franca



Profa. Dra. ANA HELENA JANUÁRIO
Departamento de Química / Universidade de Franca



Prof. Dr. JAIRO KENUPP BASTOS
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto



Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 02 de fevereiro de 2018

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro pela orientação e constante dedicação. Pela confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio pela dedicação e excelente colaboração, por toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilização do Laboratório de Produtos Naturais – UNIFRAN.

À Profa. Ana Helena Januário pela disponibilização das cepas de fungos e por todas as contribuições imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Lizandra Guidi Magalhães pelo auxílio e disponibilização do Laboratório de Parasitologia- UNIFRAN.

Ao Rodrigo Sorrechia, técnico responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, pelo auxílio no que fosse preciso e por sua amizade.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A todos os professores e colegas pós-graduandos e graduandos, pelas discussões e sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BRAUN, G. H. **Exploração do potencial químico e biológico de fungos endofíticos e de fungos derivados de ambiente marinho em associação ecológica com ascídias**. 2018. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

Produtos naturais de fungos constituem-se em fontes promissoras de novas moléculas de alta diversidade estrutural e amplo espectro de atividades biológicas, particularmente quando provenientes de organismos que ocupam nichos ecológicos específicos e/ou originários de habitats complexos. O presente trabalho objetivou a prospecção química e biológica de fungos oriundos de associações ecológicas consideradas como altamente promissoras e ainda pouco exploradas para a busca de metabólitos secundários bioativos. Realizou-se isolamento de fungos endofíticos de *Piper umbellatum* (Piperaceae), o qual resultou em 6 diferentes cepas fúngicas. Estes fungos, assim como duas diferentes espécies de fungos derivados de ambiente marinhos associados à Ascídias foram cultivados em meio líquido e obtidos extratos que foram avaliados em ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica. Os extratos provenientes das 6 cepas de fungos endofíticos isoladas, assim como os fungos derivados de ambiente marinho, apresentaram moderada atividade antibacteriana ou antifúngica. De acordo com os resultados destes ensaios de atividade biológica, as duas cepas de fungos derivados de ambiente marinhos associados à ascídias foram selecionadas para cultivos em escala ampliada para obtenção e isolamento de metabólitos secundários bioativos. Cinco substâncias foram isoladas dos extratos dos fungos associados á ascídias e estas substâncias foram submetidas a análises espectroscópicas para elucidação de suas estruturas químicas. A substância AB-I, apresentou atividades antimicrobiana e antiparasitária relevantes, com valor de CIM de 14,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *E. coli* e CI_{50} de 9,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*. A substância P-IV apresentou atividade promissora com valor de CI_{50} de 5,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Fungos derivados de marinhos. Fungos endofíticos. Atividade biológica.

ABSTRACT

BRAUN, G. H. **Exploration of chemical and biological potential of endophytic fungi and marine derived fungi associated with ascidia.** 2018. 114 f. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

Natural fungi products are promising sources of new molecules of high structural diversity and broad spectrum of biological activities, particularly when coming from organisms occupying specific ecological niches and / or originating from complex habitats. The present work aimed the chemical and biological prospection of fungi from ecological associations considered as highly promising and still little explored for the search of bioactive secondary metabolites. Endophytic fungi were isolated from *Piper umbellatum* (Piperaceae) resulting in 6 different fungi strains. These fungi, as well as two different species of fungi derived from marine environment associated with ascidia were cultured in liquid medium and obtained extracts were submitted to anti-bacterial and antifungal activity assays. The extracts from the 6 isolates of endophytic fungi, as well as fungi derived from the marine environment showed moderate antibacterial or antifungal. According to the results of these biological activity assays, the two strains of fungi derived from the marine environment associated to the ascidia were selected for cultures on an enlarged scale to obtain and isolate bioactive secondary metabolites. Five compounds from the cultivation of marine derived fungi were isolated. These compounds were submitted of structural elucidation by spectroscopy analyses. AB-I compound showed promising antimicrobial and antiparasitic activities, with MIC of 14,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against *E. coli* and IC_{50} of 9.92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against *L. amazonensis* promastigotes forms. Compound P-IV showed IC_{50} of 5.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against *L. amazonensis* promastigotes forms.

Key-words: Marine fungi. Endophytic fungi. Antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais como Fontes de Fármacos

Dentre as principais fontes de novas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, como por exemplo a síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e coleções virtuais de compostos, as substâncias de origem natural representam uma das maiores diversidades de novas estruturas químicas em relação as obtidas por síntese orgânica e demais fontes (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Produtos naturais representam a fonte mais importante de diversidade química para descoberta de novos candidatos a fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016). Os produtos naturais, assim como derivados obtidos por semi-síntese, são responsáveis por grande contribuição entre os novos fármacos aprovados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) no período de 1981- 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012, 2016; CRAGG; NEWMAN, 2013).

As principais fontes de produtos naturais que originaram fármacos aprovados pelo FDA são as plantas e os micro-organismos terrestres. Podemos destacar que apesar da intensificação recente de estudos sobre organismos marinhos como fontes de produtos naturais, estes têm se mostrados bastante promissores como fontes de novas substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos (BUTLER, 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Devido a pressões evolutivas e uma variedade de relações e funções ecológicas, micro-organismos apresentam a produção de uma alta diversidade

de metabolitos secundários. A descoberta da penicilina por Fleming em 1928, isolada de *Penicillium notatum*, deu início aos estudos com fungos como fonte de produtos naturais (DEMAIN, 2014). Atualmente, fungos são bastante conhecidos como produtores de diversas substâncias biologicamente ativas.

Dentre as substâncias provenientes de micro-organismos utilizadas para o desenvolvimento de medicamentos podemos destacar a penicilina, cefalosporina, estreptomicina e a vancomicina, empregadas no tratamento de infecções bacterianas, a mevastatina e lovastatina utilizadas no tratamento de doenças coronarianas, os antitumorais, bleomicina, dactinomicina doxorubicina e estaurosporina, e a ciclosporina, um importante imunossupressor (BHATNAGAR; KIM, 2010).

Micro-organismos destacam-se por serem metabolicamente versáteis, principalmente quanto à produção de metabólitos secundários, produzindo compostos de alta diversidade estrutural e grande número de metabólitos biologicamente ativos (BUTLER, 2004).

Os fungos constituem um grupo ainda pouco explorado quanto aos seus metabólitos secundários (STROBEL, 2006). Estimativas apontam a existência de aproximadamente 5,1 milhões de espécies fúngicas (HAWKSWORTH, 2012), mas apenas cerca de 100.000 destas espécies já foram descritas (KIRK et al., 2008) e entre essas, a maioria não foi avaliada como fonte de substâncias bioativas (NEWMAN; CRAGG, 2012), evidenciando os fungos como uma importante fonte de novos metabólitos secundários bioativos ainda pouco explorada e de alto potencial em programas de bioprospecção.

Fungos são seres vivos eucarióticos que podem ser encontrados em diferentes habitats, estando presentes no meio aquático (água doce e

marinha), terrestre (solo e matéria orgânica em decomposição) ou ainda como parasitas de diversos organismos. Todos os fungos são químio-heterotróficos, necessitando de compostos orgânicos como fonte de energia. São morfologicamente divididos entre os que possuem células com somente um núcleo, como as leveduras, ou os multi-nucleados, como os fungos filamentosos e os fungos macroscópicos (DIX; WEBSTER, 1995).

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e somente a partir de 1969 passaram a serem classificados em um reino à parte, denominado Fungi. Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético, não tem celulose na parede celular e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (BLACKWELL, 2011).

Fungos filamentosos são encontrados em diversos habitats apresentando significativa importância nos ecossistemas em que são encontrados. Estão associados à matéria orgânica em decomposição, participando dos ciclos naturais de ciclagem do carbono e outros elementos, ou como patógenos oportunistas de plantas e animais. Possuem a capacidade de sintetizar e secretar uma ampla variedade de enzimas, como as envolvidas em sua nutrição, solubilizando metabólitos absorvidos pelas hifas (SIN; HYDE; POINTING, 2002), as que permitem a catálise de produtos naturais, como celulose, proteínas e biopolímeros (RAO et al., 1998), as que atuam como agentes biocontroladores de patógenos e na defesa contra espécies competidoras (HALAOULI et al., 2006) e como agentes biorremediadores

mediante a adsorção de compostos xenobióticos (COULIBALY; GOURENE; AGATHOS, 2004). Também participam da síntese e produção dos diferentes metabólitos primários e secundários, evidenciando sua grande diversidade genética e bioquímica (ROKEM; LANTZ; NIELSEN, 2007).

1.2 Metabolismo microbiano: relações ecológicas e aplicações

Dentre a diversidade de compostos produzidos por fungos podemos distinguir aqueles que representam substâncias essenciais para a vida do organismo, denominados metabólitos primários, daqueles que possibilitam uma maior sobrevivência e adaptação, denominados metabólitos secundários (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Metabólitos primários de micro-organismos apresentam grande importância comercial e são amplamente utilizados em âmbito industrial, como exemplo podemos destacar os álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido-5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) (DEMAIN; ADRIO, 2008).

A maioria dos metabólitos secundários são mediadores de interações ecológicas e ocorrem em grupos específicos de organismos. As principais abordagens no estudo de metabólitos secundários concentram-se no isolamento e a elucidação estrutural de novas moléculas, obtenção de substâncias com atividades biológicas para desenvolvimento de novos

fármacos, estudos de funções ecológicas destas substâncias, compreensão de processos evolutivos e seu uso como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos (TEIXEIRA et al., 2014).

Metabólitos secundários de fungos podem ser muitas vezes bioativos e de baixa massa molecular e normalmente não são derivados do substrato utilizado para o crescimento celular, sendo sintetizados a partir de um metabólito primário. Os metabólitos secundários apresentam uma distribuição taxonômica restrita (nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito) e não são essenciais para o crescimento e reprodução do micro-organismo. Condições de cultivo, assim como a composição do meio, são os principais fatores que controlam a produção destes metabólitos e desta forma, portanto, podem ter sua produção otimizada. A maior produção de metabólitos secundários concentra-se na fase estacionária de crescimento do micro-organismo, na qual ocorre a transcrição de conjuntos de genes silenciáveis e são produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas (KELLER; BIRD; WINGE, 2005; CALVO; CARY, 2015).

A produção de metabólitos secundários por fungos é um processo complexo, estas substâncias pertencem a diversos grupos estruturais, como esteróides, xantonas, compostos fenólicos, cumarinas, quinonas, terpenos, citocalasanas, alcalóides e diversos outros grupos estruturais. A maior parte dos produtos naturais provenientes de fungos são originários de policetideos, peptídeos ou combinações de ambos. Eles derivam de Acetil-CoA, Malonil-CoA e aminoácidos e são agrupados por enzimas multidomínios denominadas

policetídeos sintases (PKSs), peptídeos não ribossomal sintases (NRPSs) ou sistemas híbridos PKSs-NRPSs (MISIEK; HOFFMEISTER, 2007).

Sabe-se que a biossíntese de metabolitos secundários está, geralmente, associada com o desenvolvimento morfológico do microrganismo. Muitos metabólitos secundários são produzidos por micro-organismos que apresentam hifas desenvolvidas e morfologia complexa. Os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não estão muito claros. Em estudos realizados utilizando o micro-organismo modelo *Aspergillus nidulans*, foi observado que existem mecanismos envolvidos em sinalizações intracelulares desencadeadas por Proteínas G, por Proteínas Quinase A (PKA) e por AMP cíclico, as quais regulam ambos, esporulação assexuada e a biossíntese de metabólitos secundários (CALVO; CARY, 2015).

A interdependência do metabolismo secundário com o desenvolvimento morfológico de fungos parece ser uma constante universal em fungos filamentosos e pode indicar mecanismos evolucionários subjacentes importantes na sobrevivência dos fungos e possivelmente em aspectos de patogênese (YU; KELLER, 2005).

Diferentemente dos genes envolvidos no metabolismo primário, os genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários estão localizados no genoma em forma de clusters. A regulação desses clusters de genes é controlada através de genes estruturais e por duas classes de fatores reguladores de transcrição. Uma classe específica para determinadas vias metabólicas, como por exemplo, em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* o gene aflR codifica para o fator de transcrição Zinco (II) 2-Cys6 responsável pela produção de aflotoxina, e outra classe global, a qual media fatores

ambientais, como temperatura, pH (PacC), fontes de nitrogênio (AreA) e fonte de carbono (CreA) (FLAHERTY; PAYNE, 1997; WEE; DAY; LINZ, 2016).

O envolvimento destas proteínas (CreA, PacC e AreA) no metabolismo secundário garantem que as vias metabólicas do metabolismo secundário respondam às demandas do metabolismo celular fúngico, de acordo com as condições ambientais. E podem refletir nas diferenças encontradas na produção de metabólitos secundários quando fungos são submetidos ao crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperatura e valores de pH (YU; KELLER, 2005; BRACARENSE; TAKAHASHI, 2014).

Micro-organismos de nichos ecológicos específicos são considerados fontes ricas de diversidade estrutural de produtos naturais (KÖNIG et al., 2006; SASHIDHARA; WHITE; CREWS, 2009). Sob condições ambientais particulares, estas agem como um seletor efetivo para adaptações evolutivas de vias metabólicas, o que possibilita a geração de produtos naturais únicos (THATOI et al., 2013).

Ressalta-se que, uma única espécie fúngica quando proveniente de diferentes habitats produz distintos e diversificados metabólitos secundários, de acordo com as características evolutivas das cepas resultantes dos diferentes nichos ecológicos e que muitas vezes assegura uma identidade única na produção de metabólitos secundários (FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVÁ; MÚČKOVÁ, 2007).

7. CONCLUSÃO

Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre fungos endofíticos isolados de *P. umbellatum*. Neste trabalho foi possível isolar 6 diferentes cepas de fungos endofíticos, as quais apresentaram produção de metabólitos secundários de moderada atividade antibacteriana e antifúngica. Futuros estudos de otimização de cultivo, bem como a identificação taxonômica destes isolados, são necessários para determinar se estes fungos são fontes promissoras de metabólitos secundários bioativos.

Não foram encontrados relatos na literatura, até o presente momento, sobre o potencial de produção de metabólitos secundários de cepas marinhas associadas à ascídias dos fungos *Paecilomyces* sp. e *Absidia coerulea*. Decorrente de cultivos em meio líquido e procedimentos cromatográficos, foram isoladas 5 substâncias destes fungos, estas substâncias foram

submetidas a análises espectroscópicas para elucidação de suas estruturas químicas.

A cepa derivada de ambiente marinho do fungo *A. coerulea* foi avaliada quanto a capacidade de realizar biotransformações, esta cepa demonstrou-se promissora para estudos de biotransformação, sendo capaz de biotransformar a (-)-cubebina em (-)-hinoquinina.

A substância AB-I, apresentou atividades antimicrobiana e antiparasitária relevantes, com valor de CIM de $14,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *E. coli* e CI_{50} de $9,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*. A substância P-IV não apresentou atividade antimicrobiana, contudo, em ensaio antileishmania apresentou atividade promissora com valor de CI_{50} de $5,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a atividade antileishmania da substância P-IV, assim como seu isolamento do fungo *Paecilomyces* sp., são até o presente momento, inéditos na literatura.