



COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Aspergillus austroafricanus* MgF2 CONSERVADO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Yuliana Padron-Antonio^{1,2}, Anne T. F. de Souza^{1,2}, Lucas de S. Falcão², Patricia M. Albuquerque^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil.

² Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil.

Palavras-Chave: Fungos endofíticos, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante.

Introdução

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem dentro dos tecidos vegetais sem causar nenhum sintoma ao hospedeiro (EBADI et al., 2024; GURGEL et al., 2020). As associações endófito-hospedeiro permitem o desenvolvimento, aptidão e crescimento de ambos, por meio da produção de metabólitos secundários como terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (SINGH et al., 2022; YE et al., 2020). Os compostos fenólicos são de grande relevância para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas (LIN et al., 2016). Entre as atividades biológicas que apresentam, os fenólicos se destacam por sua capacidade antioxidante não enzimática, pois atuam como doadores de hidrogênio ou aceptores de radicais livres. Os metabólitos secundários de fungos endofíticos apresentam diversas outras aplicações biológicas, como antimicrobianos, antitumorais, antivirais, entre outros. O interesse pelo potencial dos fungos endofíticos vem se refletindo na quantidade de cepas documentadas, sendo de mais de 3 milhões de cepas de diversos microrganismos (SMITH et al., 2020). Este número significativo implica na necessidade de métodos de armazenamento adequados que mantenham a viabilidade do fungo, mantendo sua morfologia e a produção de metabólitos secundários bioativos. A técnica de preservação por subcultura oferece como vantagens o baixo custo e a simplicidade; no entanto, essa técnica afeta a morfologia fúngica e leva a diferenças na produção de metabólitos (HU et al., 2014). Na Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA) é utilizado o método de subcultura, com quatro técnicas de preservação que são: Castellani (PC), arroz integral (PA), fragmento de meio de cultura BDA (PB) e papel de filtro (PF). Neste contexto, este estudo objetiva comparar a morfologia, a produção de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do fungo endofítico amazônico *Aspergillus austroafricanus* MgF2, a partir de sua preservação nas quatro técnicas utilizadas pela CCM/UEA.

Material e Métodos

O fungo utilizado neste trabalho é o *Aspergillus austroafricanus* MgF2, endofítico isolado das folhas de *Myrcia guianensis* (FALCÃO et al., 2024). Esse fungo está depositado na CCM/UEA e foi conservado pelas quatro técnicas de preservação (PC, PA, PB e PF). O fungo foi reativado em ágar batata dextrose (BDA) a 28°C por 5-7 dias para determinar eventuais alterações morfológicas. Para determinação da produção dos metabólitos secundários, o fungo foi cultivado em 150 mL de meio líquido Batata Dextrose (26,5 g/L), suplementado com extrato de levedura (2 g/L) e cloreto de sódio (5 g/L), pH 5,0. Após a esterilização do meio, foram inoculados três fragmentos com micélio de aproximadamente 5x5 mm. Os frascos foram incubados em condições estáticas a 30 °C por 14 dias, ao abrigo da luz. Posteriormente foi feita a extração dos metabólitos com acetato de etila (1:1) e filtração a vácuo. O acetato de etila foi rotaevaporado e os extratos armazenados a -18 °C. O potencial antioxidante foi determinado pelo ensaio de eliminação do radical DPPH (FREITAS PIRES et al., 2022), por meio do cálculo da concentração eficiente (EC₅₀) e pelo método FRAP (poder antioxidante redutor férrico) (MACUPHE; OGUNTIBEJU; NCHU, 2021). Quercetina e ácido ascórbico foram utilizados como padrões. Para análise das frações presentes nos extratos fúngicos, foi empregado um sistema UHPLC Shimadzu, modelo Nexera XR. Foi utilizado um Detector de Arranjo de Diodos (DAD) modelo SPD-M20A. A fase móvel consistiu em 20% de acetonitrila e 80% de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/min. A fase estacionária foi uma coluna Shimadzu ODS(H). As amostras foram solubilizadas em metanol (1 mg/mL) e filtradas em filtro de PVDF/L 0,45 mm. A leitura foi realizada a 320 nm.

Resultados e Discussão

Na morfologia macroscópica, foram observadas diferenças significativas quando os fungos foram reativados a partir das quatro técnicas de preservação utilizadas pela CCM/UEA. Na Figura 1, observa-se que o fungo *A. austroafricanus* MgF2 apresenta maior produção de esporos quando conservado pela técnica PB, além de uma maior pigmentação.

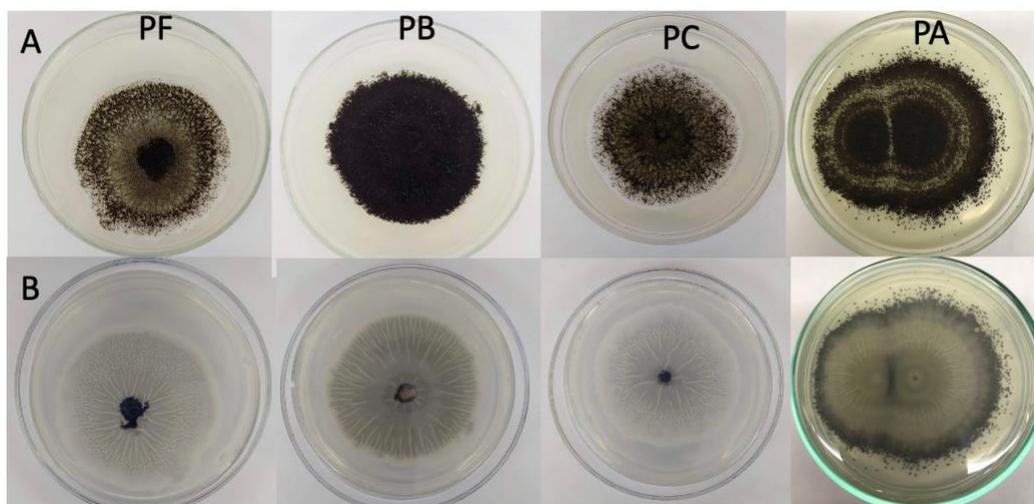


Figura 1. *Aspergillus austroafricanus* MgF2. Cultura em meio BDA, a partir do fungo armazenado nas quatro técnicas de preservação. A) Frente do cultivo; B) Verso do cultivo. PF = Papel filtro. PB = BDA. PC = Castelenni. PA = Arroz integral.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de atividade antioxidante dos extratos fúngicos de *A. austroafricanus* MgF2, obtidos a partir das culturas preservadas nas quatro técnicas.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos do fungo <i>Aspergillus austroafricanus</i> MgF2. Atividade antioxidante (AA) obtida pelo método DPPH; concentração eficiente para sequestro de 50% dos radicais livres DPPH• (EC ₅₀) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP).			
Extratos fúngicos	AA*(%)	EC ₅₀ (mg/mL)	FRAP* (mmol TE/g)
MgF2-AcEt-PB	35,05	13,07	0,035
MgF2-AcEt-PA	82,61	4,15	0,136
MgF2-AcEt-PF	80,43	5,65	0,120
MgF2-AcEt-PC	79,35	2,08	0,351
Quercetina	98,00	0,008	NT
Ácido ascórbico	NT	NT	163,1

* Ensaio realizado com os extratos fúngicos na concentração de 10 mg/mL. A quercetina e o ácido ascórbico foram testados a 40 µg/mL. NT = não testado. Os resultados são expressos como médias dos ensaios realizados em triplicata.

No teste FRAP, a atividade antioxidante do extrato produzido com o fungo preservado em PB foi a mais baixa, obtendo 0,035 mmol equivalentes de Trolox/g. No entanto, o extrato do fungo preservado em PC apresentou uma maior atividade antioxidante, de 0,351 (mmol TE/g). No teste de sequestro do radical DPPH, o extrato produzido pelo fungo *A. austroafricanus* MgF2, preservado em PB foi o que apresentou menor atividade antioxidante (AA% de 35,05), além de precisar de 13,07 mg/mL de extrato para inibir 50% do DPPH. No entanto, o extrato do fungo preservado em PC apresentou uma maior eficiência, com EC₅₀ de 2,08 mg/mL e 79,35% de AA. As técnicas de preservação PA e PF geraram resultados semelhantes, com AA de 82,61 e 80,43% e EC₅₀ de 4,15 e 5,65 mg/mL, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o descrito pela literatura, que reporta o método de Castellani como o mais recomendado para manter as características morfológicas e de produção de metabólitos bioativos (AYALA-ZERMEÑO et al., 2017; MICHALISKI et al., 2023).

No cromatograma apresentado na Figura 3 é possível observar que os extratos fúngicos obtidos a partir dos fungos preservados pelas técnicas PA e PB não apresentaram

picos de absorção no comprimento de onda determinado (320 nm), característico de compostos fenólicos (ZHU et al., 2023) Já os extratos fúngicos obtidos das culturas preservadas pela técnica PF apresentaram picos definidos, enquanto os maiores picos foram observados para os extratos obtidos a partir dos fungos preservados pela técnica PC. Esses dados concordam com os obtidos nos ensaios de atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, destacando-se a atividade antioxidante (SAUCEDA et al., 2017). Isso deve-se a sua estrutura molecular, mais precisamente à presença de grupos hidroxila, e aos efeitos de conjugação e ressonância dos anéis aromáticos que o compõem (CHARLTON et al., 2023). Esses compostos permitem manter um estado redox adequado, pois ajudam a eliminar ou inativar radicais livres por diferentes mecanismos, como eliminação de radicais, quelação de íons metálicos e ativação de enzimas antioxidantes intracelulares (CHAUDHARY et al., 2023).

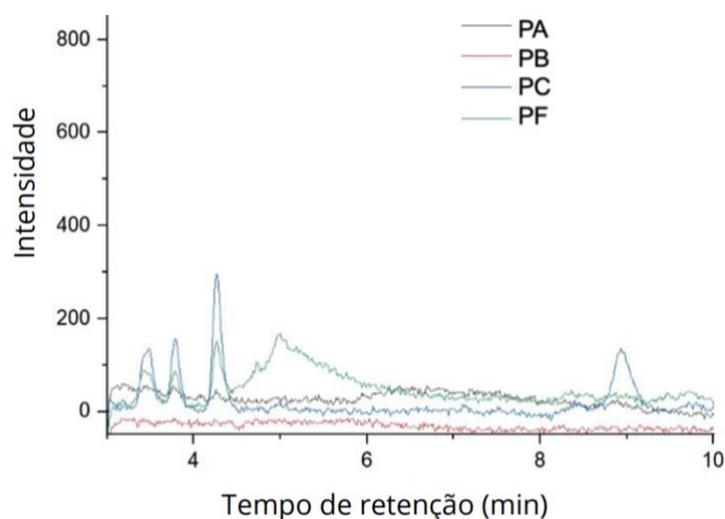


Figura 2. Cromatograma obtido por HPLC dos extratos obtidos do fungo *Aspergillus austroafricanus* MgF2 quando preservado por diferentes métodos. PF = Papel filtro. PB = BDA. PC = Castellani. PA = Arroz integral.

Conclusões

Para o fungo endofítico *A. austroafricanus* MgF2, o método de armazenamento PC (Castellani) mostrou-se o mais eficiente, pois no que diz respeito à produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante, o fungo preservado por esta técnica apresentou melhores resultados nos ensaios FRAP e DPPH. Além disso, o extrato produzido com o fungo preservado em PC apresentou os maiores picos na análise por HPLC na região de absorção de compostos fenólicos.

Agradecimentos



Os autores agradecem à Universidade do Estado do Amazonas-UEA, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pelo apoio a esta pesquisa.

Referências

AYALA-ZERMEÑO, M. A., GALLOU, A., BERLANGA-PADILLA, A. M., ANDRADE-MICHEL, G. Y., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. C., ARREDONDO-BERNAL, H. C., & MONTESINOS-MATÍAS, R. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, v. 121, n. 11, p. 920–928, nov. 2017.

CHARLTON, N. C., MASTYUGIN, M., TÖRÖK, B., & TÖRÖK, M. Structural Features of Small Molecule Antioxidants and Strategic Modifications to Improve Potential Bioactivity. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1057, 20 jan. 2023.

CHAUDHARY, P., JANMEDA, P., DOCEA, A. O., YESKALIYEVA, B., ABDULL RAZIS, A. F., MODU, B., CALINA, D., & SHARIFI-RAD, J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, 10 maio 2023.

EBADI, M., AHMADI M., TAHMOURESI H., PAZHANG M., MOLLAEI S. Investigation the biological activities and the metabolite profiles of endophytic fungi isolated from *Gundelia tournefortii* L. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 6810, 25 mar. 2024.

FALCÃO, L. DE S., OLIVEIRA, I. L., GURGEL, R. S., DE SOUZA, A. T. F., MENDONÇA, L. S., USUDA, É. O., DO AMARAL, T. S., VEGGI, P. C., CAMPELO, P. H., DE VASCONCELLOS, M. C., ALBUQUERQUE, P. M., & DE MORAES, M. A. Development of cassava starch-based films incorporated with phenolic compounds produced by an Amazonian fungus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 258, p. 128882, fev. 2024.

FREITAS PIRES, D. G. DE, E ARAÚJO, L. M., MESQUITA, P. G., NEVES, F. A. R., & BORIN, M. F. Antioxidant activity of mycelia methanolic extracts of endophytic fungi BvFV and BvFIX isolated from leaves of *Bauhinia variegata*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, 2 dez. 2022.

HU, X., WEBSTER, G., XIE, L., YU, C., LI, Y., LIAO, X. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. **Journal of Microbiological Methods**, v. 99, p. 81–83, abr. 2014.

LIN, D., XIAO, M., ZHAO, J., LI, Z., XING, B., LI, X., KONG, M., LI, L., ZHANG, Q., LIU, Y., CHEN, H., QIN, W., WU, H., & CHEN, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 15 out. 2016.

MACUPHE, N.; OGUNTIBEJU, O. O.; NCHU, F. Evaluating the Endophytic Activities of *Beauveria bassiana* on the Physiology, Growth, and Antioxidant Activities of Extracts of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1178, 9 jun. 2021.

MICHALISKI, L. F., ÍOCA, L. P., OLIVEIRA, L. S., CRNKOVIC, C. M., TAKAKI, M., FREIRE, V. F., & BERLINCK, R. G. S. Improvement of Targeted Fungi Secondary Metabolite Production Using a Systematic Experimental Design and Chemometrics Analysis. **Methods and Protocols**, v. 6, n. 5, p. 77, 29 ago. 2023.

GURGEL, R. S., RODRIGUES, J.G.C., MATIAS, R.R., BATISTA, B.M., OLIVEIRA, R.L., ALBUQUERQUE, P.M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 2, p. 85–93, 29 fev. 2020.

SAUCEDA, A. E. Q., SÁYAGO-AYERDI, S. G., AYALA-ZAVALA, J. F., WALL-MEDRANO, A., DE LA ROSA, L. A., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., & ÁLVAREZ-PARRILLA, E. Biological Actions of Phenolic Compounds. Em: **Fruit and Vegetable Phytochemicals**. [s.l.] Wiley, 2017. p. 125–138.

SINGH, D., THAPA, S., MAHAWAR, H., KUMAR, D., GEAT, N., & SINGH, S. K. Prospecting potential of endophytes for modulation of biosynthesis of therapeutic bioactive secondary metabolites and plant growth promotion of medicinal and aromatic plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 115, n. 6, p. 699–730, 23 jun. 2022.

SMITH, D., KERMODE A., CAFÀ G., BUDDIE A.G, CAINE T.S., RYAN M.J. Strengthening mycology research through coordinated access to microbial culture collection strains. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 2, 23 dez. 2020.

YE, B., WU, Y., ZHAI, X., ZHANG, R., WU, J., ZHANG, C., RAHMAN, K., QIN, L., HAN, T., & ZHENG, C. Beneficial Effects of Endophytic Fungi from the *Anoectochilus* and *Ludisia* Species on the Growth and Secondary Metabolism of *Anoectochilus roxburghii*. **ACS Omega**, v. 5, n. 7, p. 3487–3497, 25 fev. 2020.

ZHU, Z., LI, X., ZHANG, Y., WANG, J., DAI, F., WANG, W. Profiling of phenolic compounds in domestic and imported extra virgin olive oils in China by high performance liquid chromatography-electrochemical detection. **LWT**, v. 174, p. 114424, jan. 2023.